

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL

JÉSSICA DE ARAUJO ISAIAS MULLER

**EFICÁCIA DE USO TÓPICO DE EXTRATO DE *Sebastiania hispida* EM MODELO
DE FERIDA INFECTADA POR *Staphylococcus aureus* resistente à metilina**

**CAMPO GRANDE
2016**

JÉSSICA DE ARAUJO ISAIAS MULLER

EFICÁCIA DE USO TÓPICO DE EXTRATO DE *Sebastiania hispida* EM MODELO DE FERIDA INFECTADA POR *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), como requisito para obtenção do título de Mestre sob a orientação da Prof^a. Dra. Doroty Mesquita Dourado.

**CAMPO GRANDE
2016**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me capacitar e me dar forças para o desenvolvimento do Mestrado, pois Ele vai propiciar que eu faça o Doutorado e além disso abrir novos caminhos na minha vida profissional;

Aos meus pais, principalmente minha mãe Mariângela, que sempre me apoiou para que eu concluísse mais essa etapa da minha vida acadêmica;

Ao meu namorado Jean Marcos, que esteve comigo em todos os momentos, que esteve ao meu lado até nos dias mais difíceis do Mestrado, inclusive me acompanhando à Universidade durante os finais de semana para cuidar dos animais;

À minha orientadora, a Professora Dra Doroty Mesquita Dourado, que me aceitou como sua aluna de Mestrado e me auxiliou durante toda a execução deste trabalho, mostrando formas de ser uma profissional competente;

À equipe do Laboratório de Toxinologia e Plantas Medicinais da Uniderp, em especial meus agradecimentos à Maria Helena por ter-me ensinado a cuidar dos animais e auxiliado em todas as etapas do projeto. Do Laboratório de Produtos Naturais da Uniderp, agradeço à Fernanda da Silva que sempre esteve disposta a me ajudar a cuidar dos animais e à Karen Santos que desde a minha graduação tem sido uma amiga e sempre se esforçou para me ajudar em tudo e à equipe do Laboratório de Microbiologia Humana da Uniderp, que abriram as portas para me ensinar e realizar os experimentos.

À Professora Dra. Rosemary Matias que esteve presente em minha vida acadêmica desde a graduação e que hoje faz parte da finalização do meu Mestrado;

À Professora Dra. Marilena Rodrigues Chang que cedeu a cepa resistente de *Staphylococcus aureus* e sem isso não teria sido possível a realização deste trabalho;

À Farmacêutica-Bioquímica Maria Beatriz Féres por ter disponibilizado seu tempo para o preparo do gel;

À Professora Dra. Inês Aparecida Tozetti que gentilmente cedeu seu laboratório para a realização das capturas das lâminas;

Ao Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP), Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Áreas Úmidas (INAU), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo suporte financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos de mestrado;

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso tópico do gel de *Sebastiania hispida* em modelo animal com ferida infectada por *Staphylococcus aureus*. O extrato bruto etanólico (Ext_{E₁O_H}) das partes aéreas de *S. hispida* foi submetido a análise fitoquímica, a quantificação de flavonoides e fenóis totais, cromatografia líquida de alta eficiência e também à fracionamentos químicos, o que forneceu uma fração semi-pura (F₁₅). O Ext_{E₁O_H} nas concentrações de 0,2% e 2% e a F₁₅ a 0,2% foram utilizados para os testes *in vitro* e *in vivo* e a seguir incorporados no veículo Gel Carbopol® para os testes *in vivo*. Os testes de difusão em disco e de concentração mínima inibitória (CMI) foram realizados com o *S. aureus* (ATCC 25923) e uma cepa de amostra hospitalar resistente à metilicina. Para o ensaio da atividade cicatrizante utilizou-se ratos Wistar nos seguintes grupos (n= 6): grupo controle com solução fisiológica 0,9% (G1: sem bactéria e G2: com bactéria); grupo controle com Carbopol gel 70% (G3); grupo controle com a pomada Kollagenase® (G4); grupo teste do gel do Ext_{E₁O_H} 2,0% (G5); grupo teste do gel do Ext_{E₁O_H} 0,2% (G6); grupo teste do gel da fração F₁₅ 0,2% (G7). Nos animais de todos os grupos inoculou-se a bactéria *S. aureus* resistente à metilicina, exceto G1. Os períodos de tratamento consistiram de 3 e 21 dias, realizando-se análises macroscópica e histopatológica, com dados finais submetidos à Análise de Variância (ANOVA), com p<0,05. Os resultados fitoquímicos e de quantificação indicaram que os compostos fenólicos e flavonoides são os metabolitos majoritários. No teste de difusão em disco, o Ext_{E₁O_H} (2%) e a F₁₅ (0,2%) apresentaram resultados superiores ao controle positivo com a cepa resistente de *S. aureus*. No teste de CMI, o resultado com a F₁₅ (0,2%) foi eficiente e superior ao Ext_{E₁O_H}, para as duas cepas. Não houve diferença na regressão da ferida entre os grupos tratados até 3 dias. Nos grupos de tratamento até 21 dias, a partir do 12º dia havia ausência crosta em todos os grupos. Na avaliação da regressão da ferida intragrupo, os géis do Ext_{E₁O_H} (0,2 e 2,0%) foram mais eficazes no fechamento da ferida do que os demais grupos. Com 21 dias após a lesão, todos os animais tiveram ganho de peso. Na análise histopatológica com 3 dias, o processo inflamatório foi mais intenso nos grupos 05, 06 e 07, e o grupo 07 apresentou melhor epitelização. Aos 21 dias, o grupo 07 apresentou melhores resultados no tamanho da lesão, espessura do epitélio e cristas epidérmicas. Na quantificação das fibras colágenas, os animais de todos os grupos se apresentaram de modo semelhante em relação a quantidade de fibras colágenas espessas. Portanto, a fração F₁₅ foi a que mostrou melhores resultados no combate à infecção e no processo de cicatrização.

Palavras-chave: lesão cutânea; cicatrização; infecção bacteriana, flavonoides.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the topical use of *Sebastiania hispida* gel in an animal model with wound infected with *Staphylococcus aureus*. The ethanol crude extract (Ext_{EtOH}) from the aerial parts of *S. hispida* was submitted to phytochemical analysis, the quantification of flavonoids and phenolic compounds, high performance liquid chromatography and also the chemical fractionation, which provided a semi-pure fraction (F₁₅). The Ext_{EtOH} at concentrations of 0.2% and 2% and the F₁₅ of 0.2% were used for in vitro and in vivo tests and following incorporated at the Carbopol® gel vehicle for the in vivo tests. The diffusion disk tests and minimum inhibitory concentrations (MIC) were performed with *S. aureus* (ATCC 25923) and a strain of methicillin-resistant hospital sample. To test for healing activity was used Wistar rats and the following groups (n = 6): control group with saline solution 0.9% (G1: without bacteria and G2: with bacteria); control group with Carbopol gel 70% (G3); control group with Kollagenase® ointment (G4); gel test group Ext_{EtOH} 2.0% (G5); test group gel Ext_{EtOH} 0.2% (G6); group test gel fraction F₁₅ 0.2% (G7). In the animals of all groups was inoculated the bacteria methicillin resistant *S. aureus*, except G1. The treatment periods consisted of 3 and 21 days, carrying out macroscopic and histopathological analysis, and the data were submitted to analysis of variance (ANOVA), with p <0.05. Phytochemicals and quantification results indicate that the flavonoids and phenolic compounds are the major metabolites. In the disk diffusion test, Ext_{EtOH} (2%) and F₁₅ (0.2%) showed better results than the positive control with the resistant strain of *S. aureus*. In the MIC test, the result with the F₁₅ (0.2%) was efficient and superior to Ext_{EtOH} for the two strains. There was no difference in wound regression between the groups treated up to 3 days. In 21 days treatment groups, from the 12th day there was no crust in all groups. The evaluation of regression of intragroup wound, gels of Ext_{EtOH} (0.2 and 2.0%) were more effective in wound closure than the other groups. At 21 days after injury, all animals had a weight gain. On the analysis of histopathology with 3 days, the inflammatory process was more intense in the groups 05, 06 and 07, and the group 07 showed better epithelialization. On day 21, the group 07 provides the best results in lesion size, thickness of the epithelium and epidermal ridges. The quantification of collagen fibers, the animals of all groups performed similarly over the amount of thick collagen fibers. Therefore, the F₁₅ fraction was found that best results in fighting infection and wound healing process.

Keywords: skin lesion; wound healing; bacterial infection; flavonoids.

Lista de figuras

- Figura 1 - Foto das cromatoplacas A e B da fração F₁₅ (I) e do extrato Ext_{EtOH} (II) e dos padrões: quercetina (III), ácido tânico (IV) ácido gálico (V) rutina (VI). Cromatoplaca A visualizada no comprimento de onda de 254 nm e cromatoplaca B no de 366 nm. 33

Lista de figuras do Capítulo I

- Figura 1 - Resultados da análise fitoquímica do extrato etanólico das partes aéreas de *Sebastiania hispida*, coletada em Campo Grande – MS. 60
- Figura 2 - Espectro UV-DAD (200-400 nm) usando método CLAE. 61
- Figura 3 - Comparação dos pesos entre os animais. 63
- Figura 4 - Comparação dos valores referentes às porcentagens de variação das áreas das feridas. 63
- Figura 5 - Comparação dos valores referentes às áreas das feridas intragrupo para o tratamento de 21 dias. 64
- Figura 6 - Imagem representando hemorragia (seta). 67
- Figura 7 - Imagens representando o processo inflamatório e hemorrágico (setas). 67
- Figura 8 - Comparação intergrupo na camada reticular do tratamento de 21 dias. 68
- Figura 9 - Imagem das lâminas coradas com Picrosirius-hematoxilina (PH) na camada papilar, no tratamento de 3 dias. 68
- Figura 10 - Imagem das lâminas coradas com Picrosirius-hematoxilina (PH) representando as fibras colágenas organizadas na camada papilar, no tratamento de 21 dias. 69

Lista de figuras do Capítulo II

- Figura 1 - Foto da cromatoplaca da fração F₁₅ (I) e dos padrões: quercetina (II), ácido tânico (III) ácido gálico (IV) rutina (V). Cromatoplaca visualizada no comprimento de onda de 366 nm. 82
- Figura 2 - Comparação dos pesos entre os animais por grupo de estudo. 87
- Figura 3 - Comparação dos valores referentes às áreas das feridas no tratamento de 21 dias. 88
- Figura 4 - Imagens representado o processo cicatricial para o tratamento de 21 dias do grupo 07 - gel da fração F₁₅ de *S. hispida* a 0,2%. 92
- Figura 5 - Imagem das lâminas coradas com Picrosirius-hematoxilina (PH). 93

Lista de tabelas

Lista de tabelas do Capítulo I

- Tabela 1 - Valores dos halos de inibição do teste de difusão em disco e das concentrações mínimas inibitórias do crescimento de *Staphylococcus aureus* sensível e resistente à meticilina a partir do teste com o extrato bruto etanólico (Ext_{EtOH}) de *Sebastiania hispida*. 62
- Tabela 2 - Quantificação histopatológica aos 21 dias de tratamento. 66

Lista de tabelas do Capítulo II

- Tabela 1 - Resultado das análises fitoquímicas das frações (F_{Hex}, F_{Acoet} e F_{H/MeOH}) de *Sebastiania hispida*, coletada em Campo Grande – MS 85
- Tabela 2 - Valores dos halos de inibição do teste de difusão em disco e das concentrações mínimas inibitórias do crescimento de *Staphylococcus aureus* sensível e resistente à meticilina a partir do teste com a fração F₁₅ de *Sebastiania hispida*. 86
- Tabela 3 - Quantificação histopatológica aos 21 dias de tratamento. 90

Lista de abreviaturas

AcOEt	Acetato de etila
AMH	Ágar Müeller-Hinton
ANOVA	Análise de variância
CC	Coluna cromatográfica clássica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração mínima inibitória
Ext _{EtOH}	Extrato etanólico bruto
F	Flavonoides
F _{AcOEt}	Fração acetato de etila
F _{H₂O/MeOH}	Fração hidrometanólica
F _{Hex}	Fração hexânica
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FT	Fenóis totais
HE	Hematoxilina-Eosina
MeOH	Metanol
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
PH	Picrosirius-Hematoxilina
UTI's	Unidades de Terapia Intensiva

Lista de apêndices

Apêndice I -	Dados obtidos da coluna cromatográfica clássica da fração acetato de etila	98
Apêndice II -	Dados obtidos da coluna cromatográfica da fração F ₇₀₋₇₁ (C _{1.16})	99
Apêndice III -	Peso inicial e final dos animais do tratamento de 3 dias	100
Apêndice IV -	Peso inicial e final dos animais do tratamento de 21 dias	101
Apêndice V -	Análise histopatológica dos animais dos grupos do tratamento de 3 dias	102
Apêndice VI -	Análise histopatológica dos animais dos grupos do tratamento de 21 dias	103

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Pele	14
2.2	Cicatrização	16
2.3	Infecções cutâneas	20
2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.5	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina	21
2.6	Tratamentos e mecanismos de resistência	22
2.7	Plantas medicinais	23
2.8	Formulações	26
2.9	<i>Sebastiania</i>	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	Local e período da pesquisa	30
4.2	Coleta do material botânico	30
4.3	Preparo do extrato e fracionamento	30
4.3.1	<u>Análise fitoquímica clássica</u>	31
4.3.2	<u>Determinação de fenóis totais flavonoides</u>	31
4.4	Isolamento dos constituintes	32
4.5	Análise em Cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação das condições cromatográficas	33
4.6	Preparo do gel	34
4.7	Atividade <i>in vitro</i> do extrato bruto etanólico e fração	34
4.7.1	<u>Padronização da suspensão bacteriana</u>	35
4.7.2	<u>Método de difusão em disco</u>	35
4.7.3	<u>Método de concentração mínima inibitória</u>	35

4.8	Estudos pré-clínicos das formulações do extrato bruto etanólico e fração	36
4.8.1	<u>Animal Experimental</u>	36
4.8.2	<u>Procedimento pré-operatório</u>	36
4.8.3	<u>Procedimento operatório</u>	37
4.8.4	<u>Grupos avaliados</u>	37
4.9	Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina	38
4.10	Tratamento	38
4.11	Eutanásia	39
4.12	Avaliação histopatológica	39
4.13	Análise estatística	40
5	REFERÊNCIAS	41
	CAPÍTULO I – Avaliação do potencial cicatrizante do extrato bruto de <i>Sebastiania hispida</i> em modelo de ferida infectada por <i>Staphylococcus aureus</i>	54
	CAPÍTULO II – Avaliação do potencial cicatrizante da fração F₁₅ isolada de <i>Sebastiania hispida</i> (Mart.) Pax. em modelo de ferida infectada por <i>Staphylococcus aureus</i>	78
6	CONCLUSÃO	97
	APÊNDICES	98

1 INTRODUÇÃO

As infecções estão frequentemente associadas ao *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e as porcentagens dessas cepas são elevadas em toda a América Latina, sendo que no Brasil esse índice chega a mais de 40% (MEJIA; ZURITA; GUZMAN-BLANCO, 2010). Kopp, Nix e Armstrong (2004) relataram que as infecções com MRSA aumentam aproximadamente 40% o tempo de internação dos pacientes e em torno de 28% no custo quando comparado com infecções causadas por cepas de *S. aureus* sensível.

Neste cenário, um dos grupos suscetíveis à contaminação por bactérias estão os pacientes internados em decorrência de acidentes de trânsito, que no Brasil correspondem a aproximadamente 170 mil internações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Os acidentados em geral possuem feridas de segunda intenção e, por serem abertas, tem probabilidade aumentada de serem infectadas por bactérias, principalmente do gênero *Staphylococcus* (OUMEISH; OUMEISH; BATAINEH, 2000).

O *Staphylococcus aureus* é frequentemente associado à diversos tipos de infecções, dentre elas as cutâneas (SANTOS *et al.*, 2007). Uma das características do *S. aureus* é a capacidade de desenvolver cepas resistentes a várias classes de antibióticos (ALVES *et al.*, 2008) o que leva a indústria farmacêutica a busca de novas moléculas para desenvolver novos antimicrobianos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O uso de espécies vegetais é uma das alternativas por apresentar um arsenal de constituintes químicos que podem contribuir com o controle de cepas resistentes de *S. aureus* no auxílio do processo de cicatrização. O uso de plantas empregadas na medicina tradicional tem sido incentivado pela Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

No entanto, o uso popular não é suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006), sendo importante a comprovação das atividades através de estudos farmacológicos químicos, etnobotânicos e clínicos (MACIEL *et al.*, 2002).

A espécie *Sebastiania hispida*, é uma erva conhecida como mercúrio, de ocorrência no Pantanal e Cerrado do Mato Grosso do Sul (CARDOSO *et al.*, 2000;

POTT *et al.*, 2000). Dentre os metabolitos presentes nesta espécie, estão os flavonoides e taninos (HONDA *et al.*, 1990). A literatura reporta que a esses metabólitos são conferidas atividade antimicrobiana (SILVA; FERNANDES-JÚNIOR, 2010) e cicatrizante (BAHRAMSOLTANI; FARZAEI; RAHIMI, 2014).

O uso de extratos e formulações desta planta em feridas de segunda intenção, isentas de contaminação, foi descrito pelo grupo de pesquisa constituído por pesquisadores da UFMS, Uniderp e Fiocruz/MS (RIZZI *et al.*, no prelo) e a continuidade destes estudos se faz necessário uma vez que as feridas abertas são fontes de infecções e que não foram encontrados registros relatando o uso desta espécie em feridas infectadas.

Assim, este trabalho é constituído pelos seguintes elementos textuais: introdução, revisão de literatura, objetivos, metodologia geral, referências bibliográficas e por dois capítulos. O capítulo I é o artigo intitulado 'Avaliação do potencial cicatrizante do extrato bruto de *Sebastiania hispida* em modelo de ferida infectada por *Staphylococcus aureus*' e é composto pelos resultados da análise química, antibacteriana e histopatológica do processo cicatricial obtidos com o extrato bruto etanólico (Ext_{EtOH}) das partes aéreas de *S. hispida*. E o capítulo II refere-se ao artigo 'Avaliação do potencial cicatrizante da fração F₁₅ isolada de *Sebastiania hispida* (Mart.) Pax. em modelo de ferida infectada por *Staphylococcus aureus*', que contém os resultados das análises realizadas com a fração F₁₅ obtida a partir do extrato Ext_{EtOH}.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pele

A pele é considerada um dos maiores órgãos do corpo humano e recebe em torno de 1/3 do sangue circulante. Apesar de ter uma espessura de poucos milímetros ela tem funções muito importantes, como barreira contra o ambiente externo incluindo a proteção contra agentes danosos e infecciosos, manutenção da temperatura corporal, controle dos processos de desidratação e função neuro-sensorial (STEVENS; LOWE, 2001; SAMPAIO, RIVITTI, 2007).

A pele é composta de duas camadas, a epiderme e a derme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). De acordo com a localização no corpo, a pele é do tipo espessa ou delgada. A pele espessa é encontrada na palma das mãos e planta dos pés e a delgada no restante do corpo (GARTNER; HIATT, 2007).

A diferença entre os dois tipos de pele se dá principalmente pelo fato de a pele espessa apresentar cinco camadas na constituição da epiderme (germinativa ou basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea) e não apresentar folículos pilosos nem glândulas sebáceas na derme. Já a pele delgada ou pilosa possui na epiderme as camadas germinativa ou basal, espinhosa e a granulosa, apresenta camada córnea delgada, e não forma a camada lúcida, além disso, apresenta todas as estruturas anexas e, logo abaixo da pele, encontra-se camada subcutânea ou hipoderme (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Epiderme

A epiderme se origina do folheto ectodérmico (SADLER, 2013), sendo a camada mais externa da pele e é avascular (STEVENS; LOWE, 2001).

As principais células presentes na epiderme são os queratinócitos (mais abundantes), os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel, com funções específicas (ABRAHAM; CHADA; MITCHELL, 1995; GOLDSMITH *et al.*, 2012).

Cada uma das camadas da epiderme possui características específicas (GARTNER; HIATT, 2007).

O estrato basal ou germinativo é uma camada que separa a epiderme da derme. Esta camada é formada por células jovens, em constante mitose e tem a responsabilidade de renovar constantemente as células da epiderme (MONTEIRO-RIVIERE, 2006).

O estrato mais externo da epiderme, denominado de córneo, encontrado na pele espessa e em menor quantidade na pele delgada é o principal responsável por evitar a entrada de substâncias na pele, como patógenos e substâncias químicas, e impedir a perda de água e sais (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008).

Derme

A derme é um tecido conjuntivo de origem mesodérmica (SADLER, 2013), é altamente vascularizado, localizado abaixo da epiderme e com função de proteção e sustentação, sendo o local onde se desenvolvem as glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Também na derme, estão localizados grande quantidade de vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Como a epiderme é avascular, a derme é responsável pelo fornecimento de sangue para esta camada. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A derme é composta por duas regiões. O mais próximo da epiderme é chamado de camada papilar da derme e possui saliências, denominadas papilas dérmicas, que aumentam a superfície de contato entre a derme e a epiderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

E a mais profunda formada por tecido conjuntivo denso não modelado, é a camada reticular da derme, rica em fibras colágenas, elásticas e reticulares, que são responsáveis pela elasticidade e resistência a tensão e estresse da pele, sendo de suma importância para a nutrição da epiderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Hipoderme

Abaixo da derme está a hipoderme, rica em tecido adiposo, cuja função é o isolamento térmico do corpo e proteção mecânica contra impactos, unindo a derme à fáscia muscular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A hipoderme não faz parte da pele, mas está em contato com ela e contribui para a sua força tênsil (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) devido a presença de

fibras colágenas originárias da derme, conectando as camadas superficiais e profundas da pele (STEVENS; LOWE, 2001).

2.2 Cicatrização

Como a pele recobre a superfície corpórea e fica exposta a alterações ambientais, ela é suscetível a danos, denominado lesões ou feridas cutâneas.

A ferida é o rompimento da continuidade da pele e são classificadas como de primeira, segunda e terceira intenção (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008) e a principal diferença entre elas é como ocorre o processo de cicatrização.

As feridas de segunda intenção são grandes e tem elevada perda de tecido mole, podendo ou não estarem contaminadas. Como a aproximação primária das bordas não é possível, as feridas são deixadas abertas e se fecham por meio de contração e epitelização (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Para que ocorra a contração, epitelização e consequente fechamento da ferida, são desencadeadas uma série de eventos, e durante esse processo é formada uma cicatriz (CLARK, 1996).

O processo de cicatrização tem o único objetivo de recuperar a integridade do tecido lesado, e segundo diversos autores (ABBAS; KUMAR; FAUSTO, 2010; COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2010) é possível dividi-lo em três fases sequenciais e que se sobrepõem: inflamatória, proliferativa e de remodelagem.

Fase inflamatória: inicia-se logo após a produção da ferida de segunda intenção. Primeiramente há uma vasoconstrição, desencadeada pela desgranulação de mastócitos que liberam catecolaminas, serotonina, bradicinina e histamina. Ocorrendo o acúmulo de plaquetas que promovem a coagulação do sangue com a formação de um tampão composto por fibrina (HOSGOOD, 2006) que auxiliam na reparação da parede dos vasos sanguíneos rompidos, impedindo o extravasamento de sangue e bloqueando a entrada de micro-organismos (DYSON, 1997), e também organizam a matriz extracelular provisória (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

As plaquetas são as primeiras a chegar no local da lesão e permanecem no sangue por aproximadamente 10 dias, elas têm diversas funções, como a de contribuir para a geração de agentes pró-inflamatórios que atraem neutrófilos e monócitos para o local da ferida (HOSGOOD, 2006) e de secretar mediadores como os fatores de crescimento e citocinas (HOSGOOD, 2006).

Logo após a vasoconstrição, que dura de segundos a poucos minutos, ocorre a vasodilatação mediada pela histamina, serotonina e bradicinina que causam aumento do fluxo sanguíneo local, gerando calor e rubor no local da ferida. Também ocorre extravasamento de líquidos devido ao aumento de permeabilidade capilar, causando edema (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Além das plaquetas, outros fatores atraem os neutrófilos para o local da ferida, como os produtos bacterianos e os agentes quimiotáticos. Os agentes quimiotáticos, como a histamina e a prostaglandina, aumentam a permeabilidade vascular, o que favorece a exsudação plasmática e a chegada dos elementos celulares na ferida e devido a esses processos ocorre uma resposta inflamatória que dura aproximadamente três dias (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Ao chegarem no local da lesão, os neutrófilos atraem mais neutrófilos, atuando no controle da infecção através da fagocitose, destruição de bactérias e lise de tecido danificado (HOSGOOD, 2006). Após algumas horas, a quantidade de neutrófilos diminui e os monócitos, que se diferenciam em macrófagos no momento em que chegam ao local da ferida, passam a exercer a função de degradação e remoção do tecido danificado (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Os macrófagos são as principais células desse processo de reparação. Eles produzem e liberam fatores que controlam a formação do tecido de granulação, influenciam a angiogênese, estimulam a proliferação de células mesenquimais e a migração e proliferação dos fibroblastos. Também produzem enzimas proteolíticas que digerem a fibrina e as fibras colágenas desvitalizadas e removem os restos celulares dos neutrófilos dando lugar à proliferação celular (MANDELBAUM; DI-SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Fase proliferativa: é o momento em que a lesão inicia o seu fechamento e é composta basicamente pelos processos de formação do tecido de granulação (fibroplasia e angiogênese) e epitelização (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Esta fase se inicia em torno do 3º dia após a lesão e vai até o 21º dia (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A angiogênese é iniciada quando agentes quimiotáticos e fatores de crescimento, liberados pelos macrófagos, estimulam a migração e mitose de células endoteliais dos capilares que ficaram intactos na periferia da ferida. As células endoteliais atravessam a parede do vaso sanguíneo e utilizam a matriz extracelular

para migrar até a lesão, aonde irão se diferenciar para formar os tubos capilares (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Os novos vasos têm a função de trazer nutrientes e oxigênio para o tecido e contribuir para o aumento do número de células que chegam ao local (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A matriz extracelular é composta por proteínas estruturais e proteoglicanas, proporcionando sustentação para as células do tecido epitelial (RAITZ, 2008). No início do processo de cicatrização, a matriz extracelular é provisória e composta principalmente por fibrina e fibronectina (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004) provenientes das plaquetas e plasma, e além de dar suporte estrutural, ela serve de arcabouço para a migração celular (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A matriz começa a ser modificada pelos fibroblastos, que substituem a matriz extracelular provisória por um tecido de granulação rico em fibronectina que contribui para a posterior deposição de colágeno (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004).

O tecido de granulação protege a ferida, formando uma barreira contra infecções, além de servir de superfície para a epitelização (HOSGOOD, 2006). Ao final, o tecido de granulação passará a ser constituído por um tecido conjuntivo progressivamente mais denso e menos vascularizado, situado logo abaixo da epiderme já regenerada.

A epitelização consiste no recobrimento da ferida por um novo epitélio, e é baseada na migração e proliferação de queratinócitos presente nas bordas da lesão. Ela é regulada principalmente por fatores de crescimento, integrinas e metaloproteases (SANTORO; GAUDINO, 2005).

Inicialmente o epitélio é composto por uma camada de células, sendo frágil e fino e aos poucos, recupera a estrutura de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, tornando-se mais espesso (HEDLUND, 2007). Aqui as fibras colágenas também têm uma função importante, pois direcionam a migração do epitélio. E além delas, a colagenase contribui separando o epitélio da crosta logo acima dele, a partir do momento em que toda a lesão for fechada (HEDLUND, 2007).

A formação dos fibroblastos, que ocorre por estímulos de citocinas e da matriz extracelular provisória, se dá a partir de células mesenquimais quiescentes presentes no tecido normal (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A fibroplasia é um importante item do processo cicatricial. Os fibroblastos se deslocam através dos filamentos de fibrina e só irão aparecer no local da ferida a partir do 3º dia, quando os neutrófilos e macrófagos já tiverem limpado todo o local da lesão (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A função primordial dos fibroblastos é produzir colágeno (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008) e também passam por uma mudança fenotípica, sendo diferenciados em miofibroblastos, com a função de unir as bordas da ferida, contraindo a ferida (MAJNO; JORIS, 2004).

Os miofibroblastos contribuem na contração da ferida e, além deles, a crosta também contribui, pois ao ressecar ela diminui de tamanho e arrasta o tecido aderido a ela, até que ela se desprenda da pele (MAJNO; JORIS, 2004).

O colágeno tem a função principal de ser uma proteína estrutural dos tecidos e ele também tem a capacidade de guiar a formação de tecidos que estão em desenvolvimento e participar de processos celulares como diferenciação, adesão, migração e proliferação celular (LINSENMAYER, 1991; GELSE; PÖSCHL; AIGNER, 2003).

O colágeno produzido na pele é chamado de fibrilar. No início predominam as fibras colágenas do tipo III, com fibras mais finas e curtas, e, em torno de duas semanas após o início da ferida, ocorre a presença em maior quantidade do tipo I, que são fibras mais longas e grossas (FLEISCHMAJER *et al.*, 1980; HOSGOOD, 2006).

As fibras colágenas são responsáveis pela sustentação e força tênsil da cicatriz. Elas são produzidas e degradadas continuamente pelos fibroblastos, em torno da 4ª semana após a lesão, a taxa de síntese e degradação se equilibra, iniciando a fase maturação das fibras colágenas, que pode durar meses ou anos (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Fase de remodelagem: ocorre a recuperação da estrutura tecidual e o aumento da deposição de colágeno e proteoglicanos, responsáveis pela resistência à tração e elasticidade da ferida, respectivamente (DYSON, 1997). Acontece também a maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, que torna-se definitiva. A maioria dos vasos sanguíneos, fibroblastos e células inflamatórias

desaparece do local por apoptose (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004).

A partir de 21 dias é que se inicia a maturação da ferida, ocorrendo aumento da resistência sem que haja aumento no número de fibras colágenas, mantendo-se em equilíbrio devido à colagenase (HOSGOOD, 2006). Se ocorrer um desequilíbrio na quantidade de fibras de colágeno, a cicatriz formada consistirá em uma cicatriz hipertrófica ou quelóide (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Os anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sebáceas sofrem regeneração limitada (DIPIETRO; BURNS, 2003). E a fase de remodelagem dura a vida inteira, sendo que após um ano cerca de 70% a 80% da pele já está intacta e a força tênsil se estabiliza (HOSGOOD, 2006; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

2.3 Infecções cutâneas

As infecções cutâneas são causadas por fungos, bactérias e/ou vírus (MUSSI-PINHATA; NASCIMENTO, 2001). Os micro-organismos que mais causam as infecções de pele são as bactérias (DAWSON; DELLAVALLE; ELSTON, 2012) e o gênero *Staphylococcus* é o mais frequente (OUMEISH; OUMEISH; BATAINEH, 2000).

O *Staphylococcus* normalmente coloniza a pele sem causar nenhuma patologia, mas quando ocorre o rompimento da barreira de proteção da pele há a oportunidade de tornar-se patogênico (GELATTI *et al.*, 2009), seja na forma de infecções cutâneas, ou disseminando-se pela corrente sanguínea e causando patologias como endocardite, pneumonia, entre outras (LOWY, 1998).

De modo geral, as infecções cutâneas são divididas em comunitárias e hospitalares e a diferença é o local onde foram adquiridas, se dentro ou fora do ambiente hospitalar (BRASIL, 1998).

Segundo o National Healthcare Safety Network quase setenta mil pessoas adquiriram algum tipo de infecção entre 2009 e 2010 somente nos Estados Unidos (SIEVERT *et al.*, 2013). Causando impacto, não somente nos países desenvolvidos, mas principalmente nos países em desenvolvimento, onde geram aumento nos custos e são as principais causas de mortalidade e morbidade no ambiente hospitalar (PITTET *et al.*, 2008).

Quando se trata da bactéria *Staphylococcus aureus* resistente é difícil definir quando e onde ela foi adquirida, pois permanece por meses ou até anos sem causar nenhuma patologia (ZETOLA *et al.*, 2005).

2.4 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, possui 33 espécies e foi descrito pela primeira vez em 1880, em abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston (SANTOS *et al.*, 2007; BUERIS *et al.*, 2008).

Uma das espécies desta família é o *Staphylococcus aureus*, que é um coco gram-positivo, imóvel, não-esporulado e em sua maioria não-encapsulado (TALLY; BARG, 2002).

O *S. aureus* é encontrado no ambiente em geral, sendo o homem o principal hospedeiro. Está presente em várias partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele (BANNERMAN, 2003), e ele tanto pode estar no corpo humano sem causar patologias, como pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (como pneumonia, meningite e endocardite) ou intoxicações como a síndrome do choque tóxico (SCHECHTER, 1998).

Para o seu controle foram utilizados diversos antibióticos, porém conforme surgiram antibióticos, o *S. aureus* desenvolveu mecanismos de resistência a todos eles (SANTOS *et al.*, 2007).

O *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é o maior patógeno em infecções hospitalares (CAVALCANTI *et al.*, 2005) e é considerado multirresistente, pois inativa a ação de vários antibióticos (LOWY, 2003).

2.5 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

O termo MRSA é designado a todas as cepas que são resistentes à meticilina e oxacilina. O primeiro relato da resistência surgiu em 1961, um ano após o antibiótico denominado meticilina ter sido lançado para combater as cepas multirresistentes de *S. aureus* (ROLINSON, 1961). As cepas de MRSA tornaram-se um problema nos Estados Unidos a partir de 1975 (BOYCE; CAUSEY, 1982) e atualmente é um problema global.

Na literatura existem diversos trabalhos, com valores diferenciados da proporção de cepas de MRSA em relação aos outros tipos de bactérias. Especificamente no Brasil, os índices de cepas MRSA em hospitais variam entre 40% e 80%, principalmente em UTIs (MUTO *et al.*, 2003).

Segundo Cosgrove *et al.* (2003) as infecções causadas por MRSA trazem como consequência a morte de mais de 20% dos pacientes. Além da mortalidade, outros problemas decorrentes dessas infecções são o aumento do tempo de internação e consequente elevação do custo econômico (BJÖRHOLT; HAGLIND, 2004; NULENS *et al.*, 2008).

Segundo Kopp, Nix e Armstrong (2004) infecções com MRSA aumentam aproximadamente 40% o tempo de internação e em torno de 28% no custo quando comparado com infecções causadas por cepas de *S. aureus* sensível.

As cepas MRSA são de dois tipos, as adquiridas na comunidade (Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* - CA-MRSA) e as adquiridas no ambiente hospitalar (Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* – HA-MRSA) e elas são fenótipo e genotipicamente diferentes (MILLAR *et al.*, 2007).

Segundo Millar *et al.* (2007), as infecções causadas pelas cepas de HA-MRSA são mais invasivas e sítio operatórias e são consideradas multirresistentes, ou seja resistente a duas ou mais classes de antibióticos. E as infecções causadas por cepas de CA-MRSA são menos invasivas e normalmente acometem a pele e tecidos moles, e as cepas CA-MRSA são resistentes apenas aos antibióticos beta-lactâmicos.

Devido a esses relatos e a ampla disseminação das cepas de MRSA, existe a necessidade já reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), da descoberta e/ou síntese de novos medicamentos para o tratamento dos indivíduos acometidos por infecções cujo agente etiológico é o *S. aureus* (TAVARES, 2002; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2005).

2.6 Tratamentos e mecanismos de resistência

Micro-organismos resistentes são aqueles que não são erradicados com os antibióticos usuais, sendo um problema de difícil resolução. A resistência bacteriana

é um dos principais problemas dos países desenvolvidos, subdesenvolvidos e em desenvolvimento (BURTON; ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2010).

Alguns micro-organismos desenvolvem resistência com facilidade aos antibióticos usuais, como as bactérias MRSA e enterococos resistente à vancomicina (CASADEVALL, 1996).

A resistência a determinado tipo de antibiótico é adquirida devido à mutação em um gene ou a aquisição do gene de resistência através de outro micro-organismo (AMATO-NETO; NICODEMO; LOPES, 2007).

A resistência do *S. aureus* à meticilina foi identificada nos anos 60 pela primeira vez (BARRETT; MCGEHEE; FINLAND, 1968). Os mecanismos envolvidos na resistência de MRSA são: presença da PBP (proteína ligadora de penicilina); hiperprodução de beta-lactamases e modificação na capacidade de ligação das PBPs (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

De acordo com Rybak *et al.* (2009), o problema com as cepas MRSA é que, em sua maioria, elas são multirresistentes, ou seja, são resistentes aos beta-lactâmicos, e a diferentes classes de antibióticos, como os glicopeptídeos, quinolonas e aminoglicosídeos.

Para o tratamento de pacientes com MRSA, uma das poucas opções é a vancomicina, porém existem relatos de falha terapêutica e aumento de mortalidade (MOISE; SCHENTAG, 2000; RYBAK *et al.*, 2009), além disso, a vancomicina apresenta efeitos nefrotóxicos e ototóxicos (GIULIANO; HAASE; HALL, 2010).

Outro antibiótico que foi aprovado pelo Food and Drug Administration nos Estados Unidos foi a linezolida. São raras as cepas resistentes à linezolida, mas assim como a vancomicina, os efeitos tóxicos são vários, além de ter alto custo (CHAMBERS; DELEO, 2009).

A busca por novas formas de tratamento é primordial. E o uso de plantas da medicina tradicional é uma alternativa ao uso dos antibióticos.

2.7 Plantas medicinais

As plantas com fins medicinais são uma das formas mais antigas utilizadas desde o tratamento, cura e prevenção de patologias (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005) e o seu uso vem sendo incentivado pela OMS desde 1978 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1979).

Em 2002, a OMS reportou que 60 a 80% da população mundial, especialmente em países em desenvolvimento, ainda confiavam nos produtos à base de plantas medicinais no tratamento de suas doenças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002) e em 2013, os dados relatados pela OMS demonstraram que mais de 75% da população de países desenvolvidos e com sistema de saúde estabilizado, como Singapura e Coréia, utilizam as plantas medicinais para o combate de diversas patologias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

No Brasil, o uso de plantas medicinais tem influência predominantemente europeia, africana e indígena (RAVAGNANI, 1981) e em Mato Grosso do Sul a população faz uso de inúmeras espécies nativas e exóticas (introduzidas) como tratamento alternativo (CUNHA; BORTOLOTTI, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011), principalmente no tratamento de feridas externas, inflamações e infecções em geral (NUNES *et al.*, 2003).

Em trabalho de revisão, Matias (2010) relatou 57 espécies de plantas, distribuídas em 49 gêneros, com uso popular com atividade cicatrizante apenas na região de Mato Grosso do Sul. Em Campo Grande, capital do estado, são citadas 24 plantas para o tratamento de feridas externas, inflamações e infecções em geral (NUNES *et al.*, 2003; USTULIN *et al.*, 2008). Piriz *et al.* (2014), em revisão, constataram que 46 plantas, de 38 gêneros distintos, utilizadas pela medicina popular de diversos países, apresentavam atividade cicatrizante comprovada.

A partir desses e de outros trabalhos publicados na literatura, é possível observar que trabalhos que comprovem a atividade das plantas medicinais utilizadas para a cicatrização de feridas são incipientes.

Já os estudos de atividade antimicrobiana de plantas são realizados com maior frequência, com diversos relatos na literatura que comprovem essa atividade (DUARTE *et al.*, 2004; MICHELIN *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O uso de plantas empregadas na medicina popular nos tratamentos de feridas contaminadas demonstra ser uma alternativa viável, pois as plantas medicinais são fonte de fito-constituintes, denominados metabólitos secundários, que são responsáveis por diversas atividades farmacológicas (RIZZINI; MORS, 1995).

Os metabólitos não se distribuem igualmente em todas as espécies e são importantes para a propagação vegetal e proteção contra agentes externos, dentre eles temos os compostos fenólicos, taninos e flavonoides (RAVEN; EVERT;

CURTIS, 2007), sendo essas mesmas classes apontadas com atividade antimicrobiana (SILVA; FERNANDES-JÚNIOR, 2010) e cicatrizante (BAHRAMSOLTANI; FARZAEI; RAHIMI, 2014).

Os flavonoides são amplamente investigados devido as diversas atividades farmacológicas que eles apresentam (HAVSTEEN, 2002). Relatos na literatura comprovam que os flavonoides apresentam atividade antibacteriana diante de bactérias sensíveis e multirresistentes (RAUHA *et al.*, 2000; XU; LEE, 2001; PEPELJNJAK; KOSALEC, 2004).

Cushnie e Lamb (2005) em uma revisão de artigos publicados na literatura encontraram mais de 25 tipos de flavonoides com ação antibacteriana comprovada com diferentes bactérias. De acordo com Havsteen (2002) ainda não está bem elucidado como ocorre o efeito bactericida dos flavonoides, mas pode ser devido a perturbações metabólicas.

Cushnie e Lamb (2005) relataram que essas perturbações metabólicas podem ser devido a inibição da síntese do ácido nucléico, inibição da função da membrana citoplasmática e a inibição do metabolismo energético da bactéria. Esses dados demonstram a importância dos estudos com flavonoides e do seu potencial para inibir a propagação de infecções bacterianas.

Diversos autores também correlacionam a atividade cicatrizante das plantas medicinais com a presença dos flavonoides (LIMA *et al.*, 2003; LODHI *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2010). D'Acampora *et al.* (2007) observaram que o flavonóide quercetina apresentou atividade cicatrizante quando injetado em modelos animais de feridas contaminadas.

Suntar *et al.* (2012) isolaram o flavonoide luteolina-7-O-glicosídeo da espécie *Daphne oleoides*, que é utilizada popularmente para o tratamento de feridas e comprovaram que esse flavonoide era o responsável pela atividade cicatrizante *in vivo*.

Ainda não está clara a forma como os flavonoides auxiliam na cicatrização. O sequestro de radicais livres e supressão da peroxidação lipídica são possíveis mecanismos pelos quais os flavonóides favorecem a cicatrização (HAVSTEEN, 2002), já que eles causam danos celulares (BIANCHI; ANTUNES, 1999). A capacidade de atuar como vasodilatador e de reduzir a agregação plaquetária também poderiam contribuir significativamente com a cicatrização (HAVSTEEN, 2002).

Havsteen (2002) também destaca que as atividades antimicrobiana e anti-inflamatória dos flavonoides favorecem a cicatrização de feridas, pois infecções bacterianas e a inflamação intensa são fatores que retardam o fechamento da ferida.

Devido à diversidade de constituintes (principalmente os flavonoides) e a possibilidade de encontrar substâncias bioativas, faz com que as plantas medicinais sejam tão utilizadas (DUARTE *et al.*, 2004; MICHELIN *et al.*, 2005; PESSINI *et al.*, 2003) porém elas devem ser estudadas para conhecer a sua eficácia e risco do uso (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

2.8 Formulações

Para serem utilizadas para o tratamento de lesões cutâneas, as plantas medicinais devem ser padronizadas e incorporadas em formulações (BABY *et al.*, 2007) para que haja uma reprodutibilidade durante a produção. A maioria das formulações utilizadas são tópicas e podem ser líquidas, sólidas ou semissólidas (DEALEY, 2008).

Diversas formulações são semissólidas, como os géis, pomadas, pastas e emulsões. E o que as diferem das formulações totalmente sólidas ou líquidas é a capacidade de aderirem à superfície de aplicação por um período propício para a sua absorção e, ao serem aplicadas, elas se deformam e fluem (LACHMAN; DELUCA; AKERS, 2001).

Atualmente, os géis são utilizados com maior frequência devido a algumas características, como a boa espalhabilidade, não são gordurosos e veiculam diversos tipos de princípios ativos sem que esses percam as suas propriedades (CORRÊA *et al.*, 2005). E eles são divididos em duas classes: os hidrofóbicos e os hidrofílicos.

Os géis hidrofílicos são os mais utilizados em formulações cosméticas (CORRÊA *et al.*, 2005), devido à capacidade de deformar-se no momento da aplicação, tornando-se mais líquidos, o que facilita a aplicação, e logo após serem aplicados, eles voltam à sua forma original, impedindo que ele escorra (AULTON, 2005).

E os géis hidrofílicos denominados Carbopóis® são os mais utilizados em formulações tópicas (BONACUCINA; MARTELLI; PALMIERI, 2004), pois possuem boa fluidez, compatibilidade com diversos princípios ativos, bioadesivos, estáveis a

mudanças de temperatura (ISLAM *et al.*, 2004) e possuem validade maior que a de outros géis (MARTIN, 1993).

De acordo com Gennaro (2004) os géis, quando comparados com cremes e pomadas, na maioria das vezes liberam a droga de forma mais rápida.

2.9 *Sebastiania*

O gênero *Sebastiania* pertence à família Euphorbiaceae (LORENZI; MATOS, 2002). Na literatura são encontrados poucos relatos de estudos com as espécies desse gênero.

A espécie com mais estudos na literatura é a *S. chamaelea*, em que são reportadas atividades antidiabética (YASODAMMA; SREE; ALEKHYA, 2013a), antibacteriana (SREE; YASODAMMA; PARAMAGEETHAM, 2010), antidiarreica (YASODAMMA; SREE; ALEKHYA, 2013b), antimalárica (GARCIA-ALVAREZ *et al.*, 2013), antioxidante (KANDEPU *et al.*, 2012; YASODAMMA *et al.*, 2013a) e antifúngica (YASODAMMA *et al.*, 2013b).

A ocorrência de compostos fenólicos (gallicina, ácido gálico, ácido siríngico, ácido caféico) e flavonóides (quercetina, canferol; campesterol; Isoramnetina; isoquercitrina) foram relatadas para as espécies *S. brasiliensis*; *S. argutidens* e *S. commersoniana* (PENNA *et al.*, 2001; BRANCO; PIZZOLATTI, 2002; HNATYSZYN *et al.*, 2007). Segundo Gaertner *et al.* (1999) os triterpenos, moretenone eglutinol, presentes nas raízes de *S. schottiana* tem atividade analgésica.

Lima *et al.* (1995) detectaram nas partes aéreas de *S. schottiana* a presença da xantoxilina, uma substância com atividade antifúngica. E, segundo Hnatyszyn *et al.* (2007), a espécie *S. commersoniana* apresentou atividade antimicrobiana a diversos fungos.

O extrato metanólico, a fração clorofórmica e um ativo isolado da espécie *S. corniculata* foram ativos para *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* e *Staphylococcus aureus* (YANG; PARK; LEE, 2013).

A espécie *S. brasiliensis* mostrou atividade antibacteriana para as bactérias gram negativas e positivas (KOTT *et al.*, 1998). Sree, Yasodamma e Paramageetham (2010) também observaram que a espécie *S. chamaelea* tem atividade contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (gram positivas) e *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (gram negativas), visto que as folhas

são utilizadas popularmente como antibióticos, principalmente para curar feridas externas. A espécie *S. commersoniana* também é conhecida por ser antiséptica e é usada em feridas externas (HNATYSZYN *et al.*, 2007).

Sebastiania hispida

A espécie *Sebastiania hispida* ocorre na região do pantanal (CARDOSO *et al.*, 2000) e na região do Cerrado de Mato Grosso do Sul (POTT *et al.*, 2000). Conhecida como mercúrio, ela apresenta características de erva a arbusto e é descrita como uma planta invasora e comum em épocas de secas (POTT; POTT, 1994).

Herbívoros evitam se alimentar dessa espécie, sendo consumida apenas em épocas de escassez de alimentos e isso pode estar relacionado com a presença dos metabólitos secundários (SAITO *et al.*, 2004a). Honda *et al.* (1990) observaram que as folhas dessa espécie são ricas em triterpenoides, saponinas, flavonoides e taninos, sendo os dois últimos detectados tanto nas folhas como nos caules.

Dados da literatura demonstram a atividade farmacológica da espécie em reduzir o processo inflamatório induzido pela injeção de veneno bruto de *Bothrops moojeni* (BRITTO; MACHADO; DOURADO, 2010). E ela não apresentou ação inibidora de alimentação com as lagartas *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis* (SAITO *et al.*, 2004b).

O uso de extratos e formulações desta planta em feridas de segunda intenção, isentas de contaminação, foi descrito pelo grupo de pesquisa constituído por pesquisadores da UFMS, Uniderp e Fiocruz/MS (RIZZI *et al.*, no prelo). Considerando o potencial cicatrizante e anti-inflamatório do extrato aquoso e etanólico desta espécie, e que feridas abertas são fontes de infecção, justifica-se a continuidade dos estudos de atividade cicatrizante em feridas infectadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

3.1.1 Avaliar o efeito do uso tópico do gel de *Sebastiania hispida* em modelo animal com ferida infectada por *Staphylococcus aureus*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Realizar estudo químico do extrato bruto etanólico (Ext_{EtOH}) e das frações das partes aéreas de *S. hispida*;

3.2.2 Verificar *in vitro* a atividade antibacteriana do extrato Ext_{EtOH} e fração de *S. hispida* em *S. aureus* e amostra hospitalar resistente à metilicina;

3.2.3 Avaliar macroscopicamente as feridas contaminadas por *S. aureus* resistente à metilicina em amostras de tecido tratado por via tópica com o gel à base do extrato Ext_{EtOH} e da fração de *S. hispida*;

3.2.4 Avaliar histologicamente o processo cicatricial das feridas cutâneas dos diferentes tratamentos;

3.2.5 Avaliar morfometricamente a quantidade de fibras de colágeno durante o processo de cicatrização das feridas cutâneas dos diferentes tratamentos.

4 METODOLOGIA

4.1 Local e período da pesquisa

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Imunologia Básica e Biologia Molecular de Vírus da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) e nos Laboratórios de Toxinologia e Plantas Medicinais, Produtos Naturais e Microbiologia Humana da Universidade Anhanguera-Uniderp campus agrárias e os dados secundários que embasaram este trabalho foram obtidos na UFMS.

4.2 Coleta do material botânico

As partes aéreas (folhas e caules) de *Sebastiania hispida* foram coletadas em áreas com vegetação nativa de Campo Grande (20°27'S e 54°35'O), Mato Grosso do Sul, acondicionadas em sacos de polietileno (em forma de câmara úmida) e transportadas para o Laboratório de Morfologia Vegetal, Universidade Anhanguera-Uniderp, onde foram identificadas e um exemplar foi catalogado e incorporado ao acervo com o número 7826. A coleta e identificação foram realizadas pela professora Eloty Justina Dias Schleder.

O material coletado, após a exclusão de folhas velhas e/ou danificados, foi seco em estufa circuladora de ar 40 °C (MARCONI®, Modelo MA35), triturado em moinho de facas de aço inoxidável (MARCONI®, Modelo MA048) e armazenado em frascos hermeticamente fechados protegido da luz e do calor e rotulado.

4.3 Preparo do extrato e fracionamento

Para obtenção do extrato etanólico bruto (Ext_{EtOH}), as partes aéreas moídas foram pesadas (890,0 g) e extraídas com etanol (99,5%). A extração foi feita em duas etapas, primeiro em aparelho de ultrassom (UNIDQUE®, 1450) por 60 minutos, seguido por 24 horas de extração por maceração, repetindo-se este procedimento, à temperatura ambiente, até exaustão (10 dias). As soluções resultantes após filtração foram concentradas, em evaporador rotativo (Tecnal, Modelo MA120), fornecendo o extrato bruto em etanol (31,1 g Ext_{EtOH}).

Parte do extrato Ext_{EtOH} (24,8 g) foi suspenso em 200 mL de uma mistura de metanol/água 1:1 (250 mL) e submetido à partição sucessivamente em hexano (800,0 mL) e acetato de etila (600,0 mL). Após remoção dos solventes obteve-se as

frações hexânica ($F_{\text{Hex}}= 9,4 \text{ g}$), acetato de etila ($F_{\text{AcOEt}}= 5,2 \text{ g}$) e a fração hidrometanólica ($F_{\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}}= 10,2 \text{ g}$).

A partir do extrato Ext_{EtOH} e das frações foram realizadas as análises fitoquímicas e a quantificação de fenóis totais e flavonoides.

4.3.1 Análise fitoquímica clássica

Para a análise fitoquímica utilizou-se uma solução à 20% do extrato Ext_{EtOH} e das frações (F_{Hex} , F_{AcOEt} e $F_{\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}}$), as quais foram submetidas aos ensaios fitoquímicos de: compostos fenólicos, taninos, flavonóides, cumarinas livres, antocianinas, antraquinonas, esteroides, triterpenos, alcaloides, saponinas, glicosídeos cardiotônicos, glicosídeos cianogênicos e açúcares redutores, seguindo metodologia adaptada de MATOS (2009). Essas análises foram realizadas em triplicatas, via úmida e seca, por meio de ensaios colorimétricos e/ou precipitação, os quais tiveram caráter qualitativo.

Os resultados foram comparados com o grupo controle (extrato Ext_{EtOH} e frações) e também entre si para visualizar alteração de cor e/ou precipitação (COSTA, 2002). As alterações na cor, para cada teste foram classificadas como sendo parcial (\pm), baixa (+), moderada (++) e alta intensidade (+++) e negativa (-). Os testes com formação de precipitado (compostos fenólicos, taninos e açúcares redutores) foram realizados em tubos graduados (Pyrex[®], N^o8080) e considerados como parcial (menos que 0,2 cm), baixo (0,2 a 0,5 cm), moderado (0,5 a 07 cm) e alta intensidade (0,7 a 1 cm) (FONTOURA *et al.*, 2015).

4.3.2 Determinação de fenóis totais e flavonoides

O teor de fenóis totais (FT) foi determinado pelo Método Folin-Ciocalteu's utilizando 100 mg do extrato Ext_{EtOH} e das frações. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro na região de 750 nm (SOUSA *et al.*, 2007), em cubetas de quartzo. A análise foi executada por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração ($y = 0,0021x + 0,6691$; $R^2 = 0,9978$), construída com padrões de ácido gálico (EAG 10 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Para quantificação dos flavonoides (F) utilizou-se metodologia descrita por Peixoto Sobrinho *et al.* (2008) e como padrão a quercetina para construir a curva de calibração ($y = 0,0209 + 0,02783x$; $r^2= 0,9993$). As análises foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425 nm, em cubetas de quartzo, e

executadas em triplicata, o cálculo das médias foi acompanhado do desvio padrão. Sendo a equação da reta obtida pela curva de calibração e o teor de flavonóides na amostra calculado pela inclinação da reta.

4.4 Isolamento dos constituintes

Para o direcionamento do isolamento químico, as frações (F_{Hex} , F_{AcOEt} e $F_{H_2O/MeOH}$) foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatoplaças de sílica gel GF₂₅₄ com suporte de alumínio (0,2 mm, Merck®).

A visualização dos compostos em CCD foi realizada por irradiação com lâmpada ultravioleta (UV: 366 nm e 254 nm), e por aspersion com solução de ácido sulfúrico/metanol (1:1), seguida de aquecimento. Para a detecção de flavonóides empregou-se uma solução de ácido bórico, ácido oxálico e metanol (1:1:95) com posterior aquecimento (1 minuto) e visualização em lâmpada ultravioleta (UV:366 nm e 254 nm), adaptada de Wagner e Bladt (2009).

Das frações analisadas em CCD (F_{Hex} , F_{AcOEt} e $F_{H_2O/MeOH}$) a fração F_{AcOEt} (3,6 g), por apresentar teste positivo para flavonoides, foi selecionada para o fracionamento em coluna clássica (CC) de sílica gel (\varnothing 0,063 - 0,2 mm - Merck®; 75,22 g; \varnothing 4,4 cm), eluída com hexano/ CH_2Cl_2 , $CH_2Cl_2/CHCl_3$, $CHCl_3/AcOEt$, $AcOEt/MeOH$ e $MeOH/H_2O$ fornecendo 101 frações de aproximadamente 13 mL cada. As frações foram reunidas em 27 novas frações conforme semelhança apresentada em CCD (Apêndice I).

Após recristalização com metanol e acetona e análise em CCD para flavonoides, a fração C_{16} (2,1 g) foi selecionada para ser submetida a uma nova CC de sílica gel (\varnothing 0,04 – 0,63 mm, Merck®, 47,9 g; \varnothing 3,1 cm). Os solventes utilizados foram hexano, CH_2Cl_2 , $CH_2Cl_2/CHCl_3$, $CHCl_3/AcOEt$, $AcOEt/MeOH$ e $MeOH$ fornecendo 271 frações de aproximadamente 13 mL cada. As frações foram reunidas em 38 novas frações conforme semelhança apresentada em CCD (Apêndice II).

Após recristalização com metanol e acetona e análise em CCD para flavonoides, uma fração semi-pura F_{15} (0,4724 g) foi selecionada para a realização dos testes *in vitro* e *in vivo*. Na figura 1 está apresentada a cromatoplaça da análise em CCD, do extrato Ext_{EtOH} e da fração F_{15} solubilizados em metanol, a fase móvel

foi uma mistura de acetato de etila, etanol, água e ácido fórmico (9:0,1:0,5:0,5) e utilizado um revelador para flavonoides e as bandas observadas por irradiação com lâmpada ultravioleta (UV: 366 nm e 254 nm) (WAGNER; BLADT, 2009). O ácido gálico, quercetina, ácido tânico e rutina foram utilizados como padrões para compostos fenólicos e flavonoides.

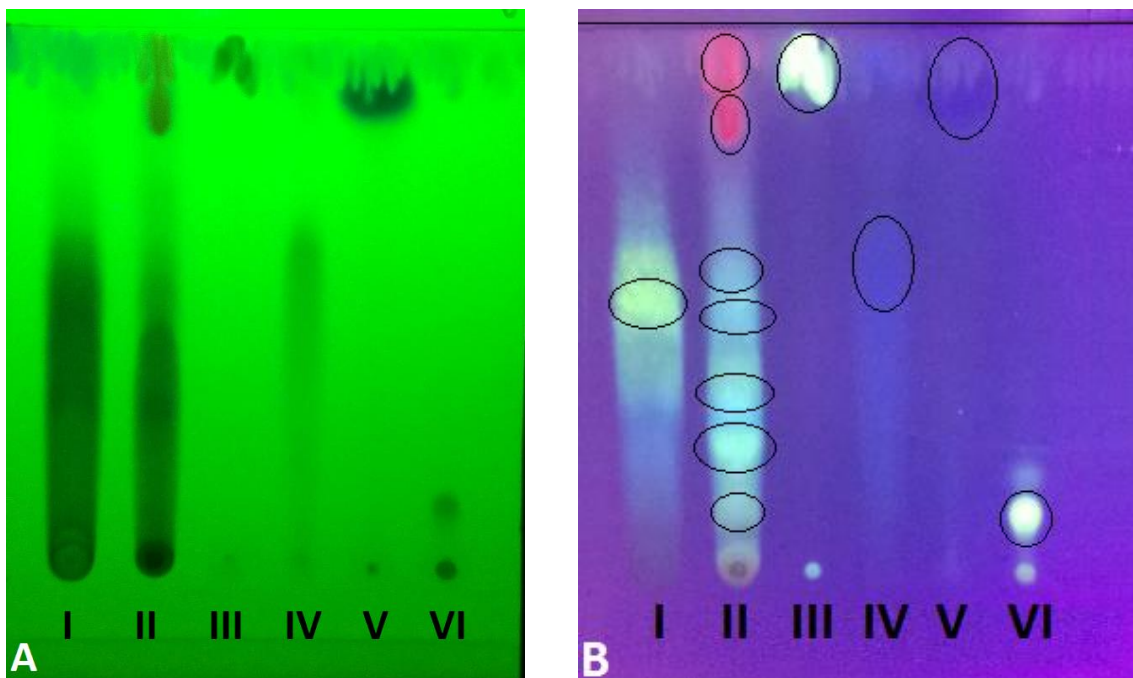


Figura 1. Foto das cromatoplas A e B da fração F_{15} (I) e do extrato Ext_{EtOH} (II) e dos padrões: quercetina (III), ácido tânico (IV) ácido gálico (V) rutina (VI). Cromatoplasca A visualizada no comprimento de onda de 254 nm e cromatoplasca B no de 366 nm.

4.5. Análise em cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação das condições cromatográficas

O extrato Ext_{EtOH} foi diluído com metanol para uma concentração final de 10 mg mL^{-1} e, em seguida, submetido a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em um cromatógrafo a líquido Shimadzu, equipado com desgaseificador DGU-14A, bomba binário LC-10AD, CTO- forno 10AS, auto-injetor SIL-10AF e um detector díodos SPD-M10A. As análises foram realizadas em fase reversa LiChrospher-100 coluna RP-18 Merck (250 mm x 4,6 mm di; 5 μm de tamanho de partícula; Darmstadt, Alemanha) equipado com uma coluna de guarda da Merck (10 mm x 4,0 mm id) empacotada com o mesmo material de embalagem e colocado antes da entrada da coluna analítica. Um gradiente de água ultrapura acidificada com ácido

acético glacial (pH = 3,0) (A) e acetonitrilo (B) foi utilizado como segue: 0 minutos = 95% (A) / 5% (B); 80 minutos = 5% (A) / 95% (B); e, em seguida, 95% (A) / 5% (B) com 10 minutos de tempo de equilíbrio. Taxa de fluxo foi fixado em 1,0 mL/min, temperatura do forno foi fixada em 50 °C e a detecção foi realizada a 220 nm e 340 nm, A fase móvel foi previamente filtrada através de um filtro de 0,45 mm (Millipore, Bedford, MA) e desgaseificou-se em banho de ultra-sons durante 15 minutos. O sistema está acoplado a um detector espectrofotométrico UV/visível Shimadzu (modelo SCL-10AVP). A análise foi realizada na Fiocruz/RJ e os cromatogramas visualizados e manipulados em software Class-VP.

4.6 Preparo do gel

O preparo do gel foi realizado pela Farmacêutica-Bioquímica Maria Beatriz Féres na empresa Drogaderma, localizada na Rua Maracaju, nº 1087, Centro, Campo Grande/MS.

Foi utilizado o extrato Ext_{EtOH} de *S. hispida* e a fração F₁₅, que foram, separadamente, incorporados no veículo a base de Gel Carbopol (70%). A concentração estabelecida foi de 0,2% de extrato Ext_{EtOH} (99,8% do veículo), 2% extrato Ext_{EtOH} (98,0% do veículo) e 0,2% de fração F₁₅ (99,8% do veículo).

O veículo gel Carbopol foi selecionado com base na literatura, pois de acordo com Sadik, Ghamrawy e El-Galil (2015) a eficácia da cicatrização pode estar correlacionada com o ambiente úmido na lesão, e os géis proporcionam esse tipo de ambiente.

4.7 Atividade *in vitro* do extrato bruto etanólico e fração

O ensaio de avaliação da atividade antibacteriana foi desenvolvido aplicando-se o teste de suscetibilidade para a determinação da atividade antibacteriana (teste de difusão em disco) e da concentração mínima inibitória (CMI).

O micro-organismo utilizado para os ensaios foi a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e uma cepa de amostra hospitalar resistente à meticilina cedida pela Dra. Marilene Rodrigues Chang do Laboratório de Pesquisas Microbiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

4.7.1 Padronização da suspensão bacteriana

A partir da cultura de 24 horas em ágar Müller-Hinton (AMH) (DIFCO®), foi preparada uma suspensão contendo a amostra bacteriana em salina estéril (NaCl – 0,85%). A densidade foi ajustada por comparação ao tubo n° 0,5 da escala McFarland segundo recomendação do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012a).

4.7.2 Método de difusão em disco

O teste de difusão em disco seguiu as recomendações do documento M02-A11 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012a). Foi realizado utilizando discos de papel (Whatman) com 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL das amostras, nas concentrações de 0,2 e 2% para o extrato Ext_{EtOH} e 0,2% para a fração F₁₅. Os discos foram secos à temperatura ambiente em cabine de segurança biológica (FANEM®, 002CB).

As suspensões bacterianas foram inoculadas em placas contendo AMH com o auxílio de um *swab* estéril. Após este procedimento, os discos previamente preparados foram transferidos para meios contendo a bactéria. As placas foram incubadas a 34 °C±1, durante 24 horas. Após este período, as placas foram inspecionadas quanto à presença de halos de inibição (diâmetro medido em mm). Todo o procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica.

O delineamento experimental foi de três repetições para cada concentração, para o controle positivo (cefotaxima-µg/disco) e controle negativo (etanol:água). Neste trabalho foram considerados ativos halos acima de 7mm.

4.7.3 Método de concentração mínima inibitória

As amostras foram diluídas em caldo Mueller-Hinton, obtendo uma série de concentrações, na ordem de 20 mg a 9,7 µg mL⁻¹ para o extrato Ext_{EtOH} a 2% e concentração na ordem de 2 mg a 0,97 µg mL⁻¹ para o extrato Ext_{EtOH} e fração F₁₅ a 0,2%.

A suspensão padronizada foi diluída em 1:10. Alíquotas de 10 μL da suspensão de bactérias foram adicionadas a cada poço da placa de microdiluição contendo 100 μL das diluições decimais da amostra. O mesmo procedimento foi desenvolvido com o controle negativo (etanol:água) e com o controle positivo (cefexotina). Sendo que todo o experimento foi realizado em triplicata.

As placas foram incubadas à 34°C por 24 horas e a leitura para determinação do CMI foi definida como a menor concentração onde ocorreu inibição do crescimento, ou seja, ausência de turvação, quando comparado com o controle, seguindo recomendação do documento M07-A9 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012b).

4.8 Estudos pré-clínicos das formulações do extrato bruto etanólico e fração

4.8.1 Animal Experimental

Nos experimentos de avaliação da atividade terapêutica do gel à base do extrato Ext_{EtOH} e da fração F_{15} de *Sebastiania hispida* foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos (pesando entre 200 e 300 g e com idade entre 8 e 10 semanas), os quais foram mantidos em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro) e temperatura (média de 23 °C).

Os animais receberam água e ração comercial Nuvital® *ad libitum*. A cada três dias foi realizada a limpeza das gaiolas e durante o experimento, foi higienizada diariamente.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas preconizadas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2015) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Anhanguera-Uniderp e foi autorizado sob o parecer 2941 (25 de junho de 2014).

4.8.2 Procedimento pré-operatório

Os animais foram anestesiados com cloridrato de Ketamina (75 mg kg^{-1}) e Xilazina (10 mg kg^{-1}), sendo 0,2 mL a cada 100 g do peso do animal, via intramuscular (FLECKNELL, 2009).

Os animais já anestesiados foram posicionados em decúbito ventral e uma área de 2 cm por 2 cm da região dorsolateral foi delimitada e tricotomizada.

4.8.3 Procedimento operatório

Para indução da ferida foi utilizado um punch metálico de diâmetro 8 mm. Com esse instrumento, foi retirado um fragmento cutâneo de forma circular no centro da área delimitada. A lesão foi realizada até a exposição da fáscia muscular superficial ou externa e nenhuma medida de antissepsia foi adotada na ferida desses animais.

4.8.4 Grupos avaliados

Os animais foram separados aleatoriamente e distribuídos em sete grupos totalizando 84 animais (n=6) que receberam identificações individuais. Os ratos foram pesados no início e no final do tratamento. Os diferentes tratamentos ocorreram diariamente nos períodos de três e 21 dias. O tempo de tratamento dos animais foi selecionado com o objetivo saber como estará a ferida no início e no final do processo de cicatrização.

G1: Grupo controle negativo sem contaminação (GSC-SF) com Solução Fisiológica 0,9% (foi aplicado 0,2 mL na lesão);

G2: Grupo controle negativo com contaminação (GCC-SF) com Solução Fisiológica 0,9% (foi aplicado 0,2 mL na lesão);

G3: Grupo negativo com contaminação (GCC-Car) com Carbopol em gel 70% (foi aplicado 0,2 mL na lesão);

G4: Grupo controle positivo com contaminação (GCC+CC) tratado com a pomada Colagenase a 0,6 U/g + Cloranfenicol a 0,01 g (foi aplicado 0,2 g na lesão);

G5: Grupo teste positivo com contaminação (GT+Sh 2%) com gel do extrato Ext_{EtOH} de *S. hispida* a 2,0%, com o veículo Carbopol em gel 70% (foi aplicado 0,2 mL na lesão);

G6: Grupo teste positivo com contaminação (GT+Sh 0,2%) com gel do extrato Ext_{EtOH} de *S. hispida* a 0,2%, com o veículo Carbopol em gel 70% (foi aplicado 0,2 mL na lesão);

G7: Grupo teste positivo com contaminação (GT+FSh) com gel da fração F₁₅ de *S. hispida* a 0,2% com o veículo Carbopol em gel 70% (foi aplicado 0,2 mL na lesão).

A pomada comercial Kollagenase® (Colagenase 0,6 U/g + Cloranfenicol 0,01 g) foi selecionada como grupo controle positivo, pois ela é utilizada para o tratamento de feridas cutâneas infectadas por micro-organismos. O Cloranfenicol é um antimicrobiano de amplo espectro e a Colagenase age na cicatrização contribuindo com a formação do tecido de granulação, pois degrada o colágeno desnaturado, sem afetar o colágeno recém-formado (KOLLAGENASE COM CLORANFENICOL, 2015).

4.9 Infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

Nos grupos determinados como contaminados foi inoculada a bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. A suspensão bacteriana foi padronizada conforme o item 4.7.1 e inoculada na lesão dos grupos descritos como contaminados por meio de micropipeta na região central da ferida, com um total de 8 µL (ALMEIDA, 2011).

4.10 Tratamento

Logo após a indução da ferida e contaminação dos grupos determinados, todos os animais receberam o tratamento por aplicação tópica, com auxílio de um swab nos grupos que utilizaram gel/pomada e auxílio de um conta-gotas nos grupos tratados com solução fisiológica.

As feridas foram observadas diariamente e mensuradas a cada 3 dias através de imagem fotográfica (Câmera Digital Sony Cyber-shot DSC-W510, 12,1 MP), com altura padronizada (16 cm), a partir do 1º dia de experimento. As imagens fotográficas de cada animal foram analisadas no programa ImageJ 1.49, para o cálculo da regressão da ferida.

Durante o tratamento também foi realizada uma análise macroscópica da ferida nos seguintes termos: ocorrência de hemorragia, secreção e crosta.

4.11 Eutanásia

De acordo com os períodos de avaliação, foi realizada a eutanásia dos animais por meio da administração, via intramuscular, de dose letal de anestésico cloridrato de Ketamina+Xilazina (0,4 mL a cada 100 g).

Amostras de pele contendo o centro e os bordos da lesão (com a distância de 1 cm de pele além da lesão e sem atingir a musculatura), foram retiradas através de secção com bisturi frio lâmina nº 15.

Após a eutanásia, os animais foram congelados em freezer a -30 °C e, no dia de coleta, descartados em um contêiner para descarte de dejetos localizado na Universidade Anhanguera-Uniderp, campus Agrárias. A empresa Spielmann&Spielmann LTDA (Atitude), localizada na Avenida Engenheiro Annes Salim Saad, nº 479, Lote-17-Quadra 12, Bairro Polo Empresarial, Campo Grande-MS, será responsável pelo recolhimento e incineração do material.

4.12 Avaliação histopatológica

As amostras de pele retiradas foram identificadas e fixadas em formol tamponado 10%. Após uma semana o material foi processado em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluído em parafina histológica. Das amostras de pele foram confeccionadas secções transversais de 5 µm de espessura com o auxílio de micrótomo rotativo (Microm HM320). As secções obtidas foram coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) (LUNA, 1968; BEHMER; TOLOSA; FREITAS-NETO, 1976) e Picrosirius-Hematoxilina (PH) (MICHALANY, 1980).

A captura das imagens das lâminas coradas com PH foi realizada em fotomicroscópio Carl Zeiss acoplado a uma microcâmera Samsung conectada a um computador com placa de captura de imagens. E com as lâminas coradas com HE foi utilizado utilizando um microscópio ótico Nikon Eclipse E200 conectado a um computador com o software Motic Image Plus 2.0.

Na análise histológica das lâminas coradas com Hematoxilina-eosina (HE) foi verificada a reparação tecidual conforme o período de tratamento. Para o tratamento de 3 dias foram considerados os seguintes parâmetros: processo inflamatório, neovascularização, presença de crosta, hemorragia e epitelização. Já para o tratamento de 21 dias foram considerados: cristas epidérmicas, tamanho da lesão, anexos e epitélio.

Os resultados histológicos foram agrupados qualitativamente, utilizando-se escala de símbolos, sendo: 0 ausente; + leve; ++ moderado e +++ intenso; para crosta foi determinado se estava ausente (0) ou presente (+); para o tamanho da lesão: + pequeno, ++ médio e +++ grande; para o epitélio: + fino, ++ normal e +++ espesso (SHIMIZU *et al.*, 2009).

As lâminas coradas com Picrosirius-hematoxilina (PH) foram utilizadas para quantificar o percentual de fibras colágenas presentes na região da cicatrização. A partir de cada lâmina, foram capturadas 10 imagens da camada papilar e 10 imagens da camada reticular que foram analisadas no software IMAGELAB, que quantifica a porcentagem da região de cicatrização ocupada por fibras colágenas, identificadas através de sua coloração.

As fibras de colágeno espessas apresentam coloração que varia do vermelho ao amarelo brilhante com intensa birrefringência e supõem-se que sejam fibras colágenas do tipo I e as finas apresentam coloração esverdeada e sugere-se que sejam fibras colágenas do tipo III (MARTINS; TAMASO; GUERRA, 2002).

Foi construída uma planilha para o registro dos dados referentes às características dos animais utilizados em cada grupo (apêndices III-VI).

4.13 Análise estatística

As medidas das variáveis da regressão da ferida e análise histológica foram expressas em média \pm desvio padrão. Os resultados foram tabulados de maneira a se observar a disposição dos valores referentes à avaliação das áreas das feridas entre os grupos e períodos analisados. A análise de normalidade foi feita utilizando-se o teste de *Shapiro-Wilk*.

As comparações intragrupos foram realizadas através do teste *t* de *Student* para amostras relacionadas nas distribuições normais e do teste de *Wilcoxon* nas amostras de distribuição não normal.

A magnitude de variação intergrupos foi avaliada através da Análise de Variância (ANOVA) com *post hoc test* de *Tukey* nas amostras de distribuição normal e do teste de Kruskal-Wallis com *post hoc test* de *Dunn* nas amostras de distribuição não normal.

Foi realizado ANOVA do tipo fatorial para o teste de atividade antibacteriana *in vitro* e ANOVA seguida pelo teste Tukey para análise dos dados de Fenóis totais e flavonoides.

Consideraram-se como estatisticamente significativas as comparações com $p < 0,05$. Para tabulação dos dados foi utilizado o *software* Microsoft Office Excel 2010 e a análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism 4.

5 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. Tecido de renovação e reparação: regeneração, cicatrização e fibrose. In: ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. (Ed.). **Patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap. 3, p. 91-124.

ABRAHAM, M. K.; CHADA, H. S.; MITCHELL, R. C. The factors that influence skin penetration of solutes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 8-16, Jan. 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Projeto de implantação da rede nacional de monitoramento da resistência microbiana em serviços de saúde**, jan. 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/hsentinelaprojeto_rede_microbiana.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução-RDC nº 48, de 16 de março de 2004. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004. Disponível em: <<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/docs/Resolucao%20RDC%2048%20de%2016%20032004.PDF>>. Acesso em: 2 abr. 2014.

ALMEIDA, M. J. G. T. **Análise da efetividade da terapia fotodinâmica sobre feridas cutâneas infectadas por *Staphylococcus aureus*, em Ratos**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos-SP, 2011.

ALVES, D. F. S.; CABRAL-JUNIOR, F. C.; CABRAL, P. P. A. C.; OLIVEIRA-JUNIOR, R. M.; REGO, A. C. M.; MEDEIROS, A. C. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 188-193, maio/jun. 2008.

AMATO-NETO, V.; NICODEMO, A. C.; LOPES, H.V. **Antibióticos na prática médica**. 6. ed. São Paulo: Sarvier, 2007.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BABY, A. R.; MIGLIATO, K. F.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. O.; SALGADO, H. R. N.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, Sept. 2007.

BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M. H.; RAHIMI, R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. *Archives of Dermatological Research*, v. 306, n. 7, p. 601-617, Sep. 2014.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, jan./mar. 2005.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that aerobically. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington, DC: Amer Society for Microbiology Press, 2003. vol. 1, p. 384-404.

BARRETT, F. F.; MCGEHEE, R. F.; FINLAND, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City hospital. **The New England Journal of Medicine**, v. 279, n. 9, p. 441-448, Aug. 1968.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, May/Aug. 1999.

BJÖRHOLT, I.; HAGLIND, E. Cost-savings achieved by eradication of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA)-16 from a large teaching hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, n. 9, p. 688-695, Sep. 2004.

BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G. F. Rheological, mucoadhesive and release properties of carbopols gels in hydrophilic cosolvents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 115-130, July 2004.

BOYCE, J. M.; CAUSEY, W. A. Increasing occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 3, n. 5, p. 377-383, Sep./Oct. 1982.

BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M. G. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sebastiania argutidens* (EUPHORBIACEAE). **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 15-19, jan./fev. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde: Portaria 2.616, de 12 de Maio de 1998. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 maio 1998. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html>. Acesso em: 26 de março de 2015.

- BRITTO, W. L. M.; MACHADO, A. P.; DOURADO, D. M. Caracterização do processo de reparo do músculo sóleo de ratos Wistar injetado com veneno bruto de *Bothrops moojeni*, tratado com o extrato aquoso da planta *Sebastiania hispidia* (Euphorbiaceae) e laser de baixa potência. In: PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – CIÊNCIAS AGRÁRIAS, BIOLÓGICAS E DA SAÚDE, 2010, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: UNIDERP, 2010. p. 4
- BUERIS, V.; MOREIRA, C. G.; TEIXEIRA, L. M.; SANTOS, K. R. N. DOS.; TRABULSI, L. R. *Staphylococcus epidermis* e outras espécies de *Staphylococcus*, *Microcococcus* e *Rothia*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 21, p. 183-187.
- BURTON, G. R. W.; ENGELKIRK, P. G.; DUBEN- ENGELKIRK, J. L. **Microbiology for the health sciences**. 9. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2010.
- CARDOSO, E. L.; CRISPIM, S. M. A.; RODRIGUES, C. A. G.; BARIONI J. W. Composição e dinâmica da biomassa aérea após a queima em savana gramíneo-lenhosa no Pantanal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 11, p. 2309-2316, nov. 2000.
- CASADEVALL, A. Antibody-based therapies for emerging infectious diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 200-208, Jul./Sep. 1996.
- CAVALCANTI, S. M. M.; FRANÇA, E. R. DE.; CABRAL, C.; VLELA, M. A.; MONTENEGRO, F.; MENEZES, D.; MEDEIROS A. C. R. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 56-63, Feb. 2005.
- CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629-641, Sep. 2009.
- CLARK, R. A. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1996.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Ninth Edition. Approved standard M07-A9. CLSI, Wayne, PA, 2012b.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard—Eleventh Edition. Approved standard M02-A11. CLSI, Wayne, PA, 2012a.
- CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). **Normativas do CONCEA**: Para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação. 2015. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238271.pdf>. Acesso em: 10 de Janeiro de 2016.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO JUNIOR, B. C.; IGNACIO, R. F.; LEONARDI, G. C. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 73-78, jan./mar. 2005.

COSGROVE, S. E.; SAKOULAS, G.; PERENCEVICH, E. N.; SCHWABER, M. J.; KARCHMER, A. W.; CARMELI, Y. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 53-59, Jan. 2003.

COSTA, A. F. **Farmacognosia Experimental**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. (Ed.). **Robbins – Patologia: estrutural e funcional**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

CUNHA, S. A.; BORTOLOTO, I. M. Etnobotânica de Plantas Medicinais no Assentamento Monjolinho, município de Anastácio, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 3, p. 685-698, Jul. 2011.

CUSHNIE, T. P., LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, Nov. 2005.

DAWSON, A. L.; DELLAVALLE, R. P.; ELSTON, D. M. Infectious Skin Diseases: A Review and Needs Assessment. **Dermatologic Clinics**, v. 30, n. 1, p. 141-151, Jan. 2012.

D'ACAMPORA, A. J.; TRAMONTE, R.; BURGER, D.; BURGER, P. J. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 36, n. 1, p. 69-75, 2007. Disponível em: <<http://www.acm.org.br/revista/pdf/artigos/476.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2014.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

DIPIETRO, L. A.; BURNS, A. L. **Wound healing: methods and protocols**. New Jersey: Humana Press, 2003.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, supl. 1, p. 6-8, 2004.

DYSON, M. Advances in wound healing physiology: the comparative perspective. **Veterinary Dermatology**, v. 8, n. 4, p. 227-233, Dec. 1997.

FLECKNELL, P. Examples of dilutions of anaesthetic mixtures for small rodents. In: FLECKNELL, P. (Ed.). **Laboratory animal anesthesia**. 3. ed. New York: Academic Press, 2009. Ap. 3, p. 283-286.

FLEISCHMAJER, R.; GAY, S.; PERLISH, J. S.; CESARINI, JP. Immunoelectron microscopy of type III collagen in normal and scleroderma skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 75, n. 2, p. 189-191, Aug. 1980.

FONTOURA, F. M.; MATIAS, R.; LUDWIG, J.; OLIVEIRA, A. K. M.; BONO, J. A. M.; MARTINS, P. F. R. B.; CORSINO, J.; GUEDES, N. M. R. Seasonal effects and antifungal activity from bark chemical constituents of *Sterculia apetala*(Malvaceae) at Pantanal of Miranda, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 3, p. 283-292, Jul./Sep. 2015.

GAERTNER, M.; MULLER, L.; ROOS, J. F.; CANI, G.; SANTOS, A. R. S.; NIETO, R.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; CECHINEL-FILHO, V. Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. **Phytomedicine**, v. 6, n. 1, p. 41-44, Mar. 1999.

GARCIA-ALVAREZ, M. C.; MOUSSA, I.; NJOMNANGSOH, P.; NONGONIERMA, R.; ABDOULAYE, A.; NICOLAU-TRAVERS, M. L.; FABRE, A.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; AHOND, A.; POUPAT, C.; IKHIRI, K.; BENOIT-VICAL, F. Both plants *Sebastiania chamaelea* from Niger and *Chrozophora senegalensis* from Senegal used in African traditional medicine in malária treatment share a same active principle. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 676-684, Oct. 2013.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia: em cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

GELATTI, L. C., BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; D'AZEVEDO, P. A. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p.501-506, Out. 2009.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1531-1546, Nov. 2003.

GENNARO, A. R. **Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GIULIANO, C.; HAASE, K.K.; HALL, R. Use of vancomycin pharmacokinetic–pharmacodynamic properties in the treatment of MRSA infections. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 1, p. 95-106, Jan. 2010.

GOLDSMITH, L.; KATZ, S.; GILCHREST, B.; PALLER, A.; LEFFELL, D.; WOLFF, K. **Fitzpatrick Dermatology in General Medicine**. 8. ed. New York: McGraw Hill Professional, 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes, **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, Fev. 2010.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 67-202, Nov./Dec. 2002.

HEDLUND, C. S. Surgery of the integumentary system. In: FOSSUM, T. W. **Small animal surgery**. 3. ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2007. cap. 15, p. 161-259.

HNATYSZYN, O.; JUAREZ, S.; OUVINA, A.; MARTINO, V.; ZACCHINO, S.; FERRARO, G. Phytochemical analysis and antifungal evaluation of *Sebastiania commersoniana*: extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 5, p. 404-406, Jan. 2007.

HONDA, N. K.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; CONCEIÇÃO, C. A. Estudo químico de plantas de Mato Grosso do Sul I: triagem fitoquímica. **Revista Científica e Cultural UFMS**, v. 5, n. 1, p. 37-46, 1990.

HOSGOOD, G. Stages of Wound Healing and Their Clinical Relevance. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 36, n. 4, p. 667-685, July 2006.

ISLAM, M. T.; HORNEDO, N. R.; CIOTTI, S.; ACKERMANN, C. Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 7, July 2004.

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

KANDEPU, N.; KESHAVAMURTHY, S. R.; SHARADAMMA, K. C.; KUMAR, S.; KUMAR-PAI, V. K.; RADHAKRISHNA, P. M. Comparative *in vitro* antioxidant potential of different spray dried extracts of aerial parts of *Sebastiania chamaelea* Muell. Arg. **Journal of Natural Product and Plant Resources**, v. 2, n. 3, p. 419-422, 2012.

KOLLAGENASE COM CLORANFENICOL: pomada. Responsável técnico José Carlos Módolo. São Paulo: Cristália, 2015

KOPP, B. J.; NIX, D. E.; ARMSTRONG, E. P. Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* infections. **The Annals of pharmacotherapy**, v. 38 n. 9, p. 1377-1382, Sep. 2004.

KOTT, V.; BARBINI, L.; CRUANES, M.; MUÑOZ, J. D.; VIVOT, E.; CRUANES, V.; MARTINO, G.; FERRARO, L.; CAVALLARO, L.; CAMPOS, R. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 1, p. 78-84, Jan. 1998.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN H. A.; KANIG, J. L. (Ed.) **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. 2. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian. v. 2, cap. 26. 2001.

LIMA, A. K.; AMORIM, E. L. C.; AQUINO, T. M.; LIMA, C. S. A.; PIMENTEL, R. M. M.; HIGINO, J. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Estudo farmacognóstico de *Indigofera*

microcarpa Desv. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 4, p. 373-379, Out./Dez. 2003.

LIMA, E. O.; MORAIS, V. M. F.; GOMES, S. T. A.; CECHINEL-FILHO, V.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A. Evaluación preliminar de actividad antifúngica de la Xantolina. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 14, n. 3, p. 213-216, 1995.

LINSENMAYER, T. F. **Cell biology of extracellular Matrix**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1991.

LODHI, S.; PAWAR, R. S.; JAIN, A. P.; SINGHAI, A. K. Wound healing potential of *Tephrosia purpurea* (Linn.) Pers. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 2, p. 204-210, Nov. 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. 1. ed. São Paulo: Plantarum, 2002.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, May 2003.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, Aug. 1998.

LUNA, L. G. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, May 2002.

MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, tissues and disease: principles of general pathology**. 2. ed. Nova York: Oxford University Press, 2004.

MANDELBAUM, S. H.; DI-SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, jul./ago. 2003.

MARTIN, A. **Physical Pharmacy**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

MARTINS, A. M. C. R. P. F.; TAMASO, E.; GUERRA, J. L. Histochemical study of fibrillar proteins of the extracellular matrix in benign and malignant mammary neoplasms in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 1, p. 43-49, 2002.

MATIAS R. **Contribuição para o estudo químico e atividade antibacteriana e cicatrizante das plantas *Equisetum pyramidale*, *Piper amalago* e *Piper aduncum***. (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR; 2010. 290f.

MATOS, J. F. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 2 ed. Fortaleza: UFC. p. 141, 2009.

MEJIA, C.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M. Epidemiologia e vigilância de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, supl. 2, p. 79-86, Dec. 2010.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-262, Jul. 2009.

MICHALANY, J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária, 1980.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 316-320, out./dez. 2005.

MIDWOOD, K. S.; WILLIAMS, L. V.; SCHWARZBAUER, J. E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 6, p. 1031-1037, Jun. 2004.

MILLAR, B. C.; LOUGHREY, A.; ELBORN, J. S.; MOORE, J. E. Proposed definitions of community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **The Journal of Hospital Infection**, v. 67, n. 2, p. 109-113, Oct. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Segurança no trânsito em defesa da vida**. 2015. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/31/Proposta-Plano-Acao-Moto-29Julho-PR.pdf> >. Acesso em: 02 out. 2015.

MOISE, P. A.; SCHENTAG, J. J. Vancomycin treatment failures in *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, supl. 1, p. 31-34, Nov. 2000.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Structure and function of skin. In: RIVIERI, J. E. (Ed.) **Dermal absorption models in toxicology and pharmacology**. New York: CRC Press, 2006. cap. 1, p. 1-19.

MUSSI-PINHATA, M. M.; NASCIMENTO, S. D. Infecções neonatais hospitalares. **Jornal de Pediatria**, v. 77, supl. 1, p. S81-S96, 2001.

MUTO, C. A.; JERNIGAN, J. A.; OSTROWSKY, B. E.; RICHET, H. M.; JARVIS, W. R.; BOYCE, J. M.; FARR, B. M. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 24, n. 5, p. 362-386, May 2003.

NULENS, E.; BROEX, E.; AMENT, A.; DEURENBERG, R. H.; SMEETS, E.; SCHERES, J.; VAN TIEL, F. H.; GORDTS, B.; STOBBERINGH, E. E.; Cost of the meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* search and destroy policy in a Dutch

university hospital. **The Journal of Hospital Infection**, v. 68, n. 4, p. 301-307, Apr. 2008.

NUNES, G. P.; SILVA, M. F.; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J. M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 83-92, Nov. 2003.

OLIVEIRA, A. K. M.; OLIVEIRA, N. A.; RESENDE, U. M.; MARTINS, P. F. R. B. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, suppl. 1, p. 283-289, Apr. 2011.

OLIVEIRA, D. F.; PEREIRA, A. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; CARVALHO, D. A.; SILVA, G.; NUNES, A. S.; ALVES, D. S.; CARVALHO, H. W. P. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. **Fitoterapia**, v. 78, n. 2, p. 142-145, Feb. 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE/UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (OMS/UNICEF). **Cuidados Primários de Saúde**: relatório da Conferência Internacional sobre Cuidados Primários da Saúde, Alma-Ata, URSS, 6 a 12 de setembro de 1978. Brasília: Ministério da Saúde, 1979.

OUMEISH, I.; OUMEISH, O. Y.; BATAINEH, O. Acute bacterial skin infections in children. **Clinics in Dermatology**, v. 18, n. 6, p. 667-678, Nov./Dec. 2000.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n. 4, p.683-689, 2008.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V.; Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 37-40, Sept. 2001.

PEPELJNJAK, S.; KOSALEC, I. Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, n.1, 111-116, Nov. 2004.

PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl. 1, p. 21-24, 2003.

PIRIZ, M. A.; LIMA, C. A. B.; JARDIM, V. M. R.; MESQUITA, M. K.; SOUZA, A. D. Z.; HECK, R. M. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 628-636, Mar. 2014.

PITTET, D.; ALLEGRANZI, B.; STORR, J.; NEJAD, S. B.; DZIEKAN, G.; LEOTSAKOS, A.; DONALDSON, L. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. **The Journal of Hospital Infection**, v. 68, n. 4, p. 285-292, Apr. 2008.

POTT, A.; ABDON, M. M.; SILVA, J. S. V.; SOBRINHO, A. A. B.; POTT, V. J. Dinâmica da flora na planície de inundação do baixo Taquari, Pantanal, MS. In: III SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL OS DESAFIOS DO NOVO MILÊNIO, 2000, Corumbá-MS. **Anais...** Corumbá: Embrapa Pantanal, p.1-18, 2000.

POTT, A; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. 1. ed. Corumbá: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1994.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J-M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063-1072, Dec. 2008.

RAITZ, R. Extracellular matrix role on the wound healing of oral lesions. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 26, n. 3, p. 351-356, 2008.

RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KAHKONEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 3-12, May 2000.

RAVAGNANI, O. M. Subsídios para o estudo da medicina popular no Brasil. **Perspectivas**, v. 4, p. 65-73, 1981.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

RIZZI, E. S.; DOURADO, D. M.; MATIAS, R.; MULLER, J. A. I.; GUERRERO, A. T. G.; GUILHERMINO, J. F.; MOREIRA, D. L.; SILVA, B. A. K.; BARBOSA-FERREIRA, M. Wound-healing potential of *Sebastiania hispida* (Mart.) Pax (Euphorbiaceae) ointment compared to low power laser in rats. **Brasilian Journal of Biology**, Curitiba, prelo.

RIZZINI, T. C.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. 2. ed. São Paulo: Âmbito Cultural, 1995.

ROLINSON, G. N. "Celbenin" - resistant Staphylococci. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5219, p. 125-126, Jan. 1961.

RYBAK, M.; LOMAESTRO, B.; ROTSCHAFFER, J. C.; MOELLER-JR, R.; CRAIG, W.; BILLETER, M.; DALOVISIO, J. R.; LEVINE, D. P. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: A consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 66, n. 1, p. 82-98, Jan. 2009.

SADIK, A. O.; GHAMRAWY, T. A.; EL-GALIL, T. I. A. The Effect of Mesenchymal Stem Cells and Chitosan Gel on Full Thickness Skin Wound Healing in Albino Rats: Histological, Immunohistochemical and Fluorescent Study. **Plos One**, v. 10, n. 9, p. 1-19, Sep. 2015.

SADLER, T. W. **Langman: Embriologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

SAITO, M. L.; POTT, A.; FERRAZ, J. M. G.; NASCIMENTO, R. S. **Avaliação da atividade inseticida em espécies de plantas do Pantanal Matogrossense** (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento). Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004a.

SAITO, M. L.; POTT, A.; FERRAZ, J. M. G.; NASCIMENTO, R. S. Avaliação de plantas com atividade deterrente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) e *Anticarsia gemmatalis* Hubner. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 14, Jan./Dez. 2004b.

SAMPAIO, S.; RIVITTI, A. **Dermatologia**. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2007.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cell Research**, v. 304, n. 1, p. 274-286, Mar. 2005.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. L.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007.

SCHECHTER, M. Antibióticoterapia. In: SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. (Ed.). **Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 1, p. 1-73.

SHIMIZU, B. J.; EURIDES, D.; BELETTI, M. E.; FREITAS, P. M. C.; CHANG, R. Extrato de barbatimão a 5% em gel de hidroxietilcelulose aplicado em feridas cutâneas, produzidas experimentalmente em camundongos. **Veterinária Notícias**, v. 15, n. 1, p. 21-27, Jan./Jun. 2009.

SIEVERT, D. M.; RICKS, P.; EDWARDS, J. R.; SCHNEIDER, A.; PATEL, J.; SRINIVASAN, A.; KALLEN, A.; LIMBAGO, B.; FRIDKIN, S. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease

Control and Prevention, 2009–2010. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 34, n. 1, p. 1-14, Jan. 2013.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES-JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2010.

SOUSA, C. M. M. S.; SILVA, H. R.; VEIERA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; CHARLLYTON, L. S. C.; DELTON, S. A.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAUJO, P. B. M.; BRANDRÃO, M.S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 27-36, Jan./Abr. 2005.

SREE, S.; YASODAMMA, N.; PARAMAGEETHAM, C. H. Phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of the methanolic leaf extract: *Sebastiania chamaelea* Muell. **The Bioscan**, v. 5, n. 1, p. 173-175, 2010.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia humana**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001.

SUNTAR, I.; AKKOL, E. K.; KELES, H.; YESILADA, E.; SARKER, S. D.; ARROO, R.; BAYKAL, T. Efficacy of *Daphne oleoides* subsp. *kurdica* used for wound healing: Identification of active compounds through bioassay guided isolation technique. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 1058-1070, Jun. 2012.

TALLY, F. P.; BARG, N. L. Estafilococos: abscessos e outras doenças. In: SCHAECHTER, M.; ENGLERBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. (Ed.). **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 11, p. 120 a 127.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002.

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

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 189-306, abr./jun. 2006.

USTULIN, M. FIGUEIREDO, B. B.; TREMEA, C.; POTT, A.; POTT, V. J.; BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O. Plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal

de Campo Grande-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 805-813, Nov. 2008.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, Fev. 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Traditional Medicine Strategy 2002–2005**, Geneva, 2002. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67163/1/WHO_EDM_TRM_2002.1.pdf?ua=1>. Acesso em: 22 mar. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Traditional Medicine Strategy 2014–2023**, Geneva, 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 11 nov. 2015.

XU, H. X.; LEE, S. F. Activity of Plant Flavonoids Against Antibiotic-Resistant Bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 1, p. 39-43, Feb. 2001.

YANG, J. Y.; PARK, J. H.; LEE, H. S. Isolation of 8-hydroxyquinoline from *Sebastiania corniculata* and antimicrobial activity against food-borne bacteria. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 763-766, Dec. 2013.

YASODAMMA, N.; SREE, K. S. S.; ALEKHYA, C. Antidiabetic activity of *Sebastiania chamaelea* Muell. Arg. leaf extracts in alloxan induced diabetic albino rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 577-583, May. 2013a.

YASODAMMA, N.; SREE, K. S. S.; ALEKHYA, C. Antidiarrhoeal activity of *Sebastiania chamaelea* Muell. Arg. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, supl. 2, p. 169-171, Mar. 2013b.

YASODAMMA, N.; SREE, K. S. S.; ALEKHYA, C.; BINNY, A. J. R. *In-vitro* antioxidant activity and quantitative analysis of total phenolic and flavonoid compounds of *Sebastiania chamaelea* Muell. Arg. LEAF EXTRACTS. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 2, p. 623-629, Apr. 2013a.

YASODAMMA, N.; SREE, K. S. S.; NAGAMALLESWARI, K.; CHAITHRA, D.; ALEKHYA, C. Antifungal activity of *Sebastiania chamaelea* Muell. Arg. leaf crude and fractional extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, supl. 2, p. 241-244, Apr. 2013b.

ZETOLA, N.; FRANCIS, J. S.; NUERMBERGER, E. L.; BISHAI, W. R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 275-286, May 2005.

Capítulo I

Avaliação do potencial cicatrizante do extrato bruto de *Sebastiania hispida* em modelo de ferida infectada por *Staphylococcus aureus*

Resumo

As plantas medicinais representam uma alternativa para melhora das infecções causadas por bactérias e auxiliam no processo de cicatrização de feridas. Assim, o objetivo foi avaliar a eficácia do uso de *Sebastiania hispida* foi submetido a análise fitoquímica e quantificação dos metabólitos. A atividade antibacteriana foi realizada com *S. aureus*. Para o ensaio da atividade cicatrizante foram utilizados ratos Wistar e os grupos avaliados foram os géis do Ext_{EtOH} nas concentrações de 0,2 e 2% comparados grupos controle, e os animais foram inoculados com a bactéria *S. aureus* resistente à metilina. Os períodos de tratamento foram de 3 e 21 dias e realizou-se análises macroscópica e microscópica e os dados submetidos à Análise de Variância ($p < 0,05$). A fitoquímica e quantificação indicou que os compostos fenólicos e flavonoides são os metabólitos majoritários. O extrato Ext_{EtOH} 0,2% foi mais eficaz no combate do crescimento das cepas de *S. aureus*. Na análise histopatológica e de regressão da ferida, os géis do Ext_{EtOH} (0,2 e 2%) foram semelhantes e mais eficazes no auxílio da cicatrização. Na quantificação de fibras colágenas, os animais de todos os grupos apresentaram elevada quantidade de fibras colágenas espessas. Os géis do extrato Ext_{EtOH} das partes aéreas de *S. hispida* podem ser utilizados no tratamento de feridas contaminadas por *S. aureus*, e a cicatrização mais eficaz pode ser devido ao potencial antibacteriano e ao elevado teor de compostos fenólicos e flavonoides.

Palavras-chave: Cicatrização; Agente antibacteriano; Planta medicinal

Introdução

A ferida é o rompimento da continuidade da pele e é classificada como de primeira, segunda ou terceira intenção (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). Nas feridas de segunda intenção não ocorre a aproximação primária das bordas, e as feridas são deixadas abertas (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Devido à ferida estar aberta, ela tem alta probabilidade de ser infectada por bactérias, como o *Staphylococcus aureus* (SANTOS *et al.*, 2007; GELATTI *et al.*, 2009), que tem a capacidade de desenvolver cepas resistentes a várias classes de antibióticos (ALVES *et al.*, 2008).

No Brasil, as porcentagens de cepas de *S. aureus* resistente à metilina nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI's) variam de 40% a 80% (MUTO *et al.*, 2003). O que leva a indústria farmacêutica à busca de novas moléculas para combater os micro-organismos e auxiliar no fechamento das feridas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O uso de espécies vegetais empregadas na medicina tradicional é uma das alternativas por apresentar um arsenal de constituintes químicos. No entanto, o uso popular não é suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Uma das espécies investigadas com este fim é a *Sebastiania hispida*, de ocorrência no Pantanal e Cerrado do Mato Grosso do Sul (CARDOSO *et al.*, 2000; POTT *et al.*, 2000), rica em flavonoides e compostos fenólicos (RIZZI *et al.*, no prelo). A literatura reporta que esses metabólitos têm potencial antimicrobiano (SILVA; FERNANDES-JÚNIOR, 2010) e cicatrizante (BAHRAMSOLTANI; FARZAEI; RAHIMI, 2014).

Além disso, o extrato etanólico das partes aéreas desta planta apresentou atividade cicatrizante em feridas induzidas em modelos experimentais isentos de contaminação em comparação ao laser de baixa potência (RIZZI *et al.*, no prelo).

Com base nestas informações e considerando que feridas abertas são fontes de infecções de bactérias resistentes, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do uso tópico de uma formulação a base de extrato etanólico das partes aéreas de *S. hispida* em modelo animal com ferida infectada por *S. aureus*.

Métodos

Coleta do material botânico e extração

As partes aéreas (folhas e caules) de *Sebastiania hispida* foram coletadas em áreas com vegetação nativa de Campo Grande no Mato Grosso do Sul, Brasil. Após identificação, um exemplar foi catalogado e incorporado ao acervo da Universidade Anhanguera-Uniderp, sob o número 7826. O material coletado, foi seco e extraído em etanol (99,5%) para obtenção do extrato etanólico bruto (Ext_{EtOH}).

Análise fitoquímica e quantificação

Para as análises fitoquímicas, executadas em triplicatas, seguiu os procedimentos descrito por Matos (2009) e ocorreram via úmida, por meio de reações de precipitação e/ou mudança de cor. Os resultados foram comparados e contrastados observando a alteração de cor e de precipitação com os extratos originais e a leitura foi com base em Fontoura *et al.* (2015) que classifica resultados

em: negativo (-), parcial (\pm), baixo (+), moderado (++) e alta intensidade (+++), sendo 0%, 10%, 25%, 50% e 100% de frequência respectivamente.

O teor de fenóis totais (FT) foi determinado pelo Método Folin-Ciocalteu's utilizando 100 mg do extrato Ext_{EtOH} (SOUSA *et al.*, 2007) utilizando o ácido gálico como padrão. Para quantificação dos flavonoides (F) utilizou-se metodologia descrita por Peixoto Sobrinho *et al.* (2008) e como padrão a quercetina.

Análise em cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação das condições cromatográficas

O extrato Ext_{EtOH} foi diluído com metanol para uma concentração final de 10 mg mL⁻¹ e, em seguida, submetido a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em um cromatógrafo a líquido Shimadzu. As análises foram realizadas em fase reversa LiChrospher-100 coluna RP-18 Merck (250 mm x 4,6 mm di; 5 μ m de tamanho de partícula; Darmstadt, Alemanha) equipado com uma coluna de guarda da Merck (10 mm x 4,0 mm id). O sistema é acoplado a um detector espectrofotométrico UV/visível Shimadzu (modelo SCL-10AVP), e os cromatogramas visualizados e manipulados em software Class-VP.

Atividade antibacteriana *in vitro*

Micro-organismos

O micro-organismo utilizado para os ensaios foi a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e uma cepa de amostra hospitalar resistente à meticilina. Como controle positivo foi utilizado a cefoxitina e o controle negativo o etanol:água (1:1) e os ensaios foram realizados de acordo com as recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

Para a realização dos testes foi preparada uma suspensão contendo a amostra bacteriana em salina estéril (NaCl – 0,85%), a partir da cultura de 24 horas em ágar Müeller-Hinton (AMH) (DIFCO®). A densidade foi ajustada por comparação ao tubo n° 0,5 da escala McFarland.

Teste de difusão em disco

O teste de difusão em disco foi realizado utilizando discos de papel (Whatman) impregnados com o extrato Ext_{EtOH} diluído nas concentrações de 0,2 e 2%.

As placas contendo as suspensões bacterianas e os discos de papel foram incubadas a 34 °C/24h, e após este período foram inspecionadas quanto à presença de halos de inibição. O delineamento experimental foi de três repetições e foram considerados ativos halos acima de 7 mm.

Teste de concentração mínima inibitória

As amostras foram diluídas em caldo Mueller-Hinton, obtendo uma série de concentrações, na ordem de 20 mg a 9,7 µg mL⁻¹ para o extrato Ext_{EtOH} a 2% e na ordem de 2 mg a 0,97 µg mL⁻¹ para o extrato Ext_{EtOH} a 0,2%.

As placas de microdiluição contendo a suspensão bacteriana e as amostras foram incubadas à 34 °C/24h e a leitura para determinação da concentração mínima inibitória foi definida como a menor concentração onde ocorreu inibição do crescimento, ou seja, ausência de turvação.

Atividade cicatrizante *in vivo*

Para a atividade cicatrizante *in vivo* foi utilizado o extrato Ext_{EtOH} incorporado no veículo a base de Gel Carbopol (70%). A concentração estabelecida foi de 0,2% e 2 % de extrato Ext_{EtOH} de *S. hispida*.

Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, os quais foram mantidos em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro) e temperatura (média de 23 °C). Os animais receberam água e ração comercial Nuvital® *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas preconizadas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2015) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Anhanguera-Uniderp e foi autorizado sob o parecer 2941.

Procedimentos

Antes do procedimento operatório, os animais foram anestesiados com cloridrato de Ketamina e Xilazina, via intramuscular (FLECKNELL, 2009). A ferida foi induzida até a exposição da fáscia muscular utilizando-se um punch metálico de diâmetro 8 mm e nenhuma medida de antisepsia foi adotada na ferida desses animais.

Os grupos avaliados foram (n= 6): grupo controle com solução fisiológica 0,9 % (grupo 01: sem bactéria e grupo 02: com bactéria); grupo controle com Carbopol em gel 70 % (grupo 03); grupo controle com a pomada Kollagenase® (grupo 04); grupo teste do gel do Ext_{EIOH} a 2,0 % (grupo 05); grupo teste do gel do Ext_{EIOH} a 0,2 % (grupo 06).

Os animais de todos os grupos foram inoculados com a bactéria *S. aureus* resistente à oxacilina, exceto grupo 01. Os tratamentos tópicos ocorreram diariamente nos períodos de 3 e 21 dias, as feridas foram mensuradas a cada 3 dias e diariamente foi realizada a análise macroscópica da ferida. A eutanásia foi realizada nos períodos do tratamento, com dose letal do anestésico.

Avaliação histopatológica

Amostras de pele foram retiradas, processadas e coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) e Picrosirius-Hematoxilina (PH). A captura das imagens das lâminas coradas com PH foi realizada em fotomicroscópio Carl Zeiss acoplado a uma microcâmera Samsung conectada a um computador com placa de captura de imagens. A captura das imagens das lâminas coradas com HE foi realizada utilizando um microscópio ótico Nikon Eclipse E200 conectado a um computador com o software Motic Image Plus 2.0.

Na análise histológica das lâminas coradas com HE foi verificada a reparação tecidual conforme o período de tratamento e os resultados histológicos foram agrupados qualitativamente, utilizando-se escala de símbolos. As lâminas coradas com PH foram analisadas no software IMAGELAB para quantificar o percentual de fibras colágenas presentes na região da cicatrização.

Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 4. Foi

realizada Análise de Variância (ANOVA) do tipo fatorial para o teste de atividade antibacteriana *in vitro* e ANOVA seguida pelo teste Tukey para análise dos dados de fenóis totais e flavonoides.

As comparações intragrupos dos testes *in vivo* foram realizadas através do teste *t* de Student para amostras relacionadas nas distribuições normais e do teste de Wilcoxon nas amostras de distribuição não normal. A magnitude de variação intergrupos foi avaliada através da ANOVA com post hoc test de Tukey nas amostras de distribuição normal e do teste de Kruskal-Wallis com post hoc test de Dunn nas amostras de distribuição não normal.

Consideraram-se como estatisticamente significativas as comparações com $p < 0,05$.

Resultados

Análise fitoquímica e quantificação de compostos fenólicos e flavonóides

Os resultados da análise fitoquímica do extrato Ext_{E10H} das partes aéreas de *S. hispida* estão apresentados na figura 1.

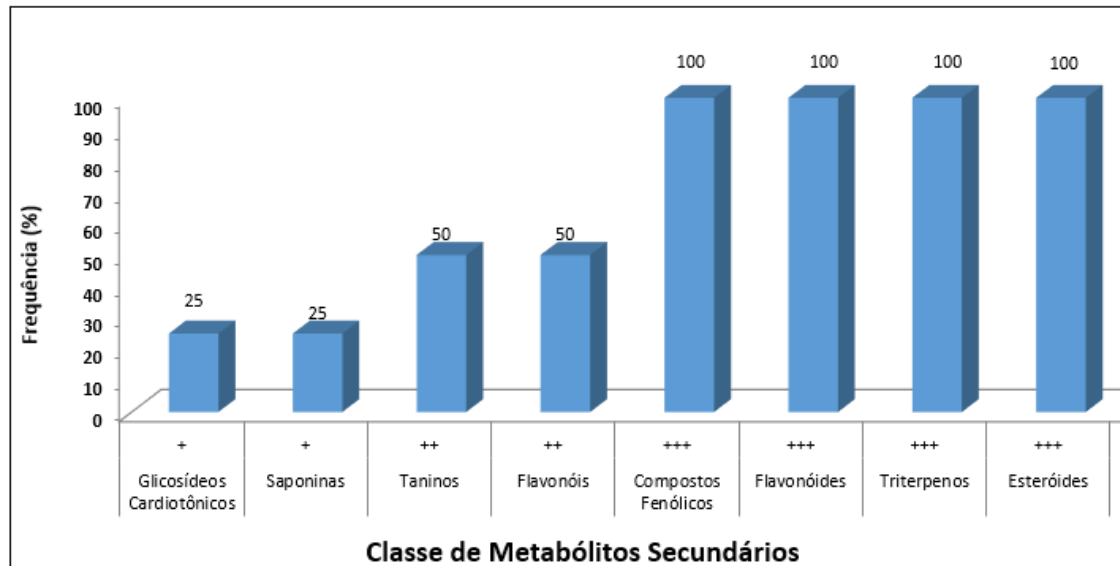


Figura 1. Resultados da análise fitoquímica do extrato etanólico das partes aéreas de *Sebastiania hispida*, coletada em Campo Grande – MS.

O extrato Ext_{E10H} apresentou oito classes de metabólitos secundários com predominância dos compostos fenólicos, flavonóides, triterpenos e esteróides. O teor de compostos fenólicos ($238,8a \pm 0,9 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$) e flavonoides ($168,6a \pm 1,2 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$) para o Ext_{E10H} de *S. hispida* foram considerados altos.

A presença de compostos fenólicos e flavonoides foram confirmadas por cromatografia líquida de alta eficiência como constituintes majoritários no extrato etanólico. Os sinais entre 10 e 25 minutos indicam que este extrato é rico em compostos de média polaridade (Figura 2A, B). Os espectros de UV dos sinais 220 nm e 270 nm sugerem compostos fenólicos orgânicos (Figura 2C) e os sinais em 246 nm e 350 nm indicam a presença do esqueleto benzopirona, característico de flavonoides (Figura 2D) (MARSTON, 2007; ZERAÍ; YARIWAKE, 2010).

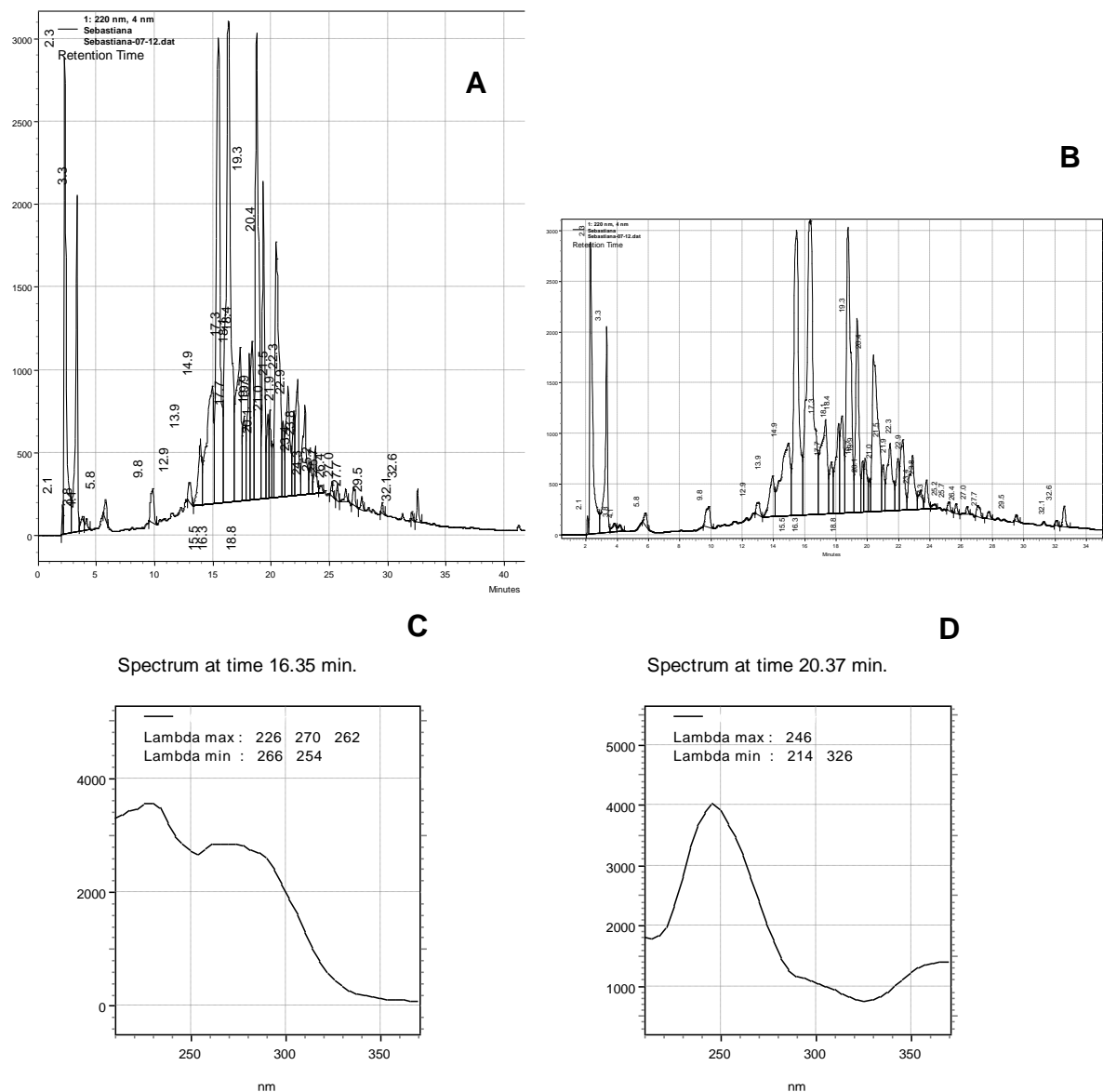


Figura 2. Espectro UV-DAD (200-400 nm) usando método CLAE. A - perfil do extrato etanólico bruto (Ext_{EtOH}) das partes aéreas de *S. hispida*. B – expansão, $tr = 16.28$ min. C e D - cromatograma e espectro UV dos compostos majoritários do extrato etanólico bruto (Ext_{EtOH}) das partes aéreas de *Sebastiania hipida*.

Atividade antibacteriana *in vitro*

A tabela 1 apresenta os resultados da atividade antibacteriana de *S. hispida* com as cepas de *S. aureus* sensível e resistente à metilina.

Tabela 1. Valores dos halos de inibição do teste de difusão em disco e das concentrações mínimas inibitórias do crescimento de *Staphylococcus aureus* sensível e resistente à metilina a partir do teste com o extrato bruto etanólico (Ext_{EtOH}) de *Sebastiania hispida*.

	Difusão em disco		CMI	
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Sensível (mm)	Resistente (mm)	Sensível (µg mL ⁻¹)	Resistente (µg mL ⁻¹)
Extrato Ext_{EtOH} 2%	10 ± 0 ^{bA}	10.6 ± 0.34 ^{aA}	2500	1250
Extrato Ext_{EtOH} 0,2%	Inativo ^{cA}	Inativo ^{cA}	500	500
Controle positivo (cefotina)	32.3 ± 5.34 ^{aA}	Inativo ^{cB}	62.5	1000
Controle negativo (etanol:água)	Inativo ^{cA}	Inativo ^{cA}	-	-

Ext_{EtOH}: extrato bruto etanólico. ANOVA fatorial ao nível de 1% de probabilidade. Letras minúsculas para colunas, e letras maiúsculas para linhas. Letras diferentes indicam diferença estatística.

No teste de difusão em disco, o extrato Ext_{EtOH} a 0,2% não inibiu o crescimento das cepas de *S. aureus*, já o extrato Ext_{EtOH} a 2% apresentou halo de inibição significativo com a cepa sensível, porém inferior ao controle positivo. Já para a cepa resistente, a atividade apresentada foi estatisticamente superior ao controle.

No teste de concentração mínima inibitória, o extrato Ext_{EtOH} a 0,2% se comportou de modo semelhante nas duas cepas de *S. aureus* (500 µg mL⁻¹) e apresentou atividade superior ao extrato Ext_{EtOH} a 2% em que foram necessários 1250 µg mL⁻¹ para inibir o crescimento da cepa resistente e 2500 µg mL⁻¹ para a cepa sensível. Portanto o extrato Ext_{EtOH} a 0,2% foi mais eficaz que a cefotina (controle positivo) no combate do crescimento do *S. aureus* resistente à metilina.

Atividade cicatrizante *in vivo*

Análise macroscópica

A crosta fibrinoleucocitária esteve presente em todos os animais dos grupos do tratamento de 3 dias. Nos grupos do tratamento de 21 dias, a presença de crosta não foi observada a partir do décimo segundo dia de tratamento.

O peso dos animais também foi avaliado e a figura 3 apresenta a quantidade de gramas que os animais ganharam/perderam durante o experimento.

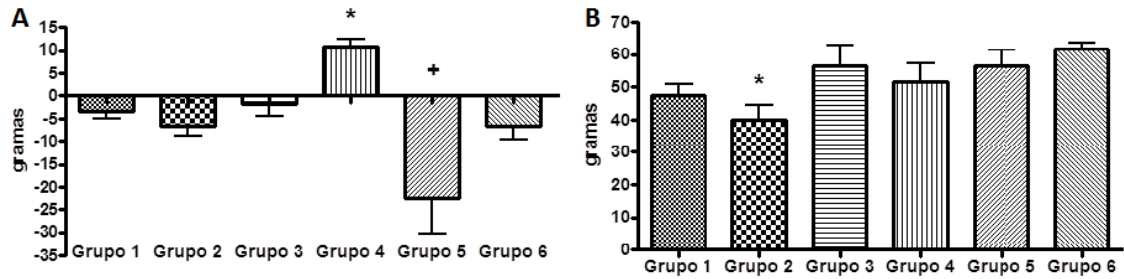


Figura 3. Comparação dos pesos entre os animais. A – tratamento de 3 dias (ANOVA, $p = 0,0455$; “*” $p < 0,05$ em relação ao grupo 02; “+” $p < 0,001$ em relação ao grupo 04). B – tratamento de 21 dias (Kruskal-Wallis, $p = 0,0013$; “*” $p < 0,05$ em relação ao grupo 06). Grupo 01 - controle sem contaminação; grupo 02 – controle com contaminação; grupo 03 – tratado com Carbool gel 70%; grupo 04 - tratado com Kollagenase; grupo 05 - gel do extrato etanólico bruto; grupo 06 - gel do extrato etanólico bruto (Ext_{EtOH}) de *S. hispidus* a 0,2%.

É possível observar na figura 3A, que no experimento de 3 dias, apenas o grupo 04 ganhou peso após o tratamento e o grupo 05 foi o que mais perdeu peso. Já no experimento de 21 dias, todos os animais ganharam peso, sendo que o grupo 02 foi o que teve menor ganho de peso, diferindo do grupo 06, que obteve o maior ganho de peso (Figura 3B).

Apesar da perda de peso no tratamento de 3 dias, os animais tratados com o gel do extrato Ext_{EtOH} a 0,2 % obtiveram ganho de peso significativo após 21 dias de tratamento.

A contração da ferida também foi avaliada, pois ela pode indicar como está o processo de cicatrização. Para a contração da ferida foram calculadas as porcentagens de regressão nos tratamentos de 3 e 21 dias (Figura 4).

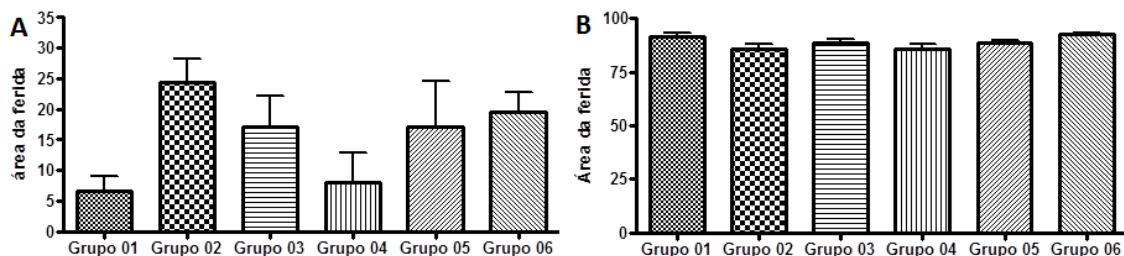


Figura 4. Comparação dos valores referentes às porcentagens de variação das áreas das feridas. A – tratamento de 3 dias (Kruskal-Wallis; $p = 0,0237$). B – tratamento de 21 dias (Kruskal-Wallis; $p = 0,0237$). Grupo 01 - controle sem contaminação; grupo 02 – controle com contaminação; grupo 03 – tratado com Carbool gel 70%; grupo 04 - tratado com Kollagenase; grupo 05 - gel do extrato etanólico bruto; grupo 06 - gel do extrato etanólico bruto (Ext_{EtOH}) de *S. hispidus* a 0,2%.

Todos os grupos apresentaram baixa porcentagem de regressão da ferida no tratamento de 3 dias e com 21 dias apresentaram alta porcentagem de regressão, o que caracteriza as duas fases da cicatrização, a fase inflamatória inicial no tratamento de 3 dias e com 21 dias a fase de maturação da ferida denominada remodelagem (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A análise da regressão da ferida intragrupo, foi realizada apenas para o tratamento de 21 (Figura 5).

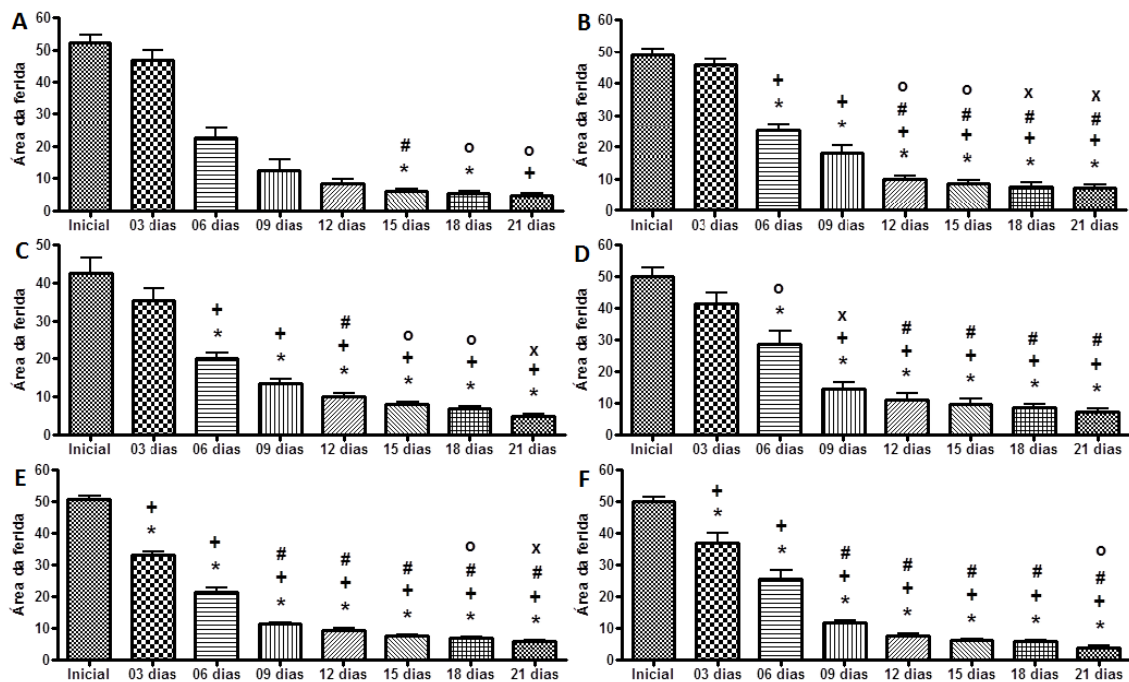


Figura 5. Comparação dos valores referentes às áreas das feridas intragrupo para o tratamento de 21 dias. A - grupo 01 - controle sem contaminação (Kruskal-Wallis; $p < 0,0001$; “*” $p < 0,01$ em relação ao tempo inicial, “+” $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial, “#” $p < 0,05$ em relação aos 03 dias, “o” $p < 0,01$ em relação aos 03 dias). B - grupo 02 – controle com contaminação (ANOVA; $p < 0,0001$, “*” $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial, “+” $p < 0,001$ em relação aos 03 dias, “#” $p < 0,001$ em relação aos 06 dias, “o” $p < 0,05$ em relação aos 09 dias, “x” $p < 0,01$ em relação aos 09 dias). C - grupo 03 – tratado com Carbóil gel 70% (ANOVA; $p < 0,0001$, “*” $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial, “+” $p < 0,001$ em relação aos 03 dias, “#” $p < 0,05$ em relação aos 06 dias, “o” $p < 0,01$ em relação aos 06 dias, “x” $p < 0,001$ em relação aos 06 dias). D - grupo 04 - tratado com Kollagenase (ANOVA; $p < 0,0001$, “*” $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial, “+” $p < 0,001$ em relação aos 03 dias, “o” $p < 0,05$ em relação aos 03 dias, “x” $p < 0,01$ em relação aos 06 dias, “#” $p < 0,001$ em relação aos 06 dias). E - grupo 05 - gel do extrato etanólico bruto (Ext_{EtOH}) de *S. hispidus* a 2,0% (ANOVA; $p < 0,0001$, “*” $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial, “+” $p < 0,001$ em relação aos 03 dias, “#” $p < 0,001$ em relação aos 06 dias, “o” $p < 0,05$ em relação aos 09 dias, “x” $p < 0,01$ em relação aos 09 dias). F - grupo 06 - gel do extrato etanólico bruto (Ext_{EtOH})

de *S. hispidus* a 0,2% (ANOVA; $p < 0,0001$, “*” $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial, “+” $p < 0,001$ em relação aos 03 dias, “#” $p < 0,001$ em relação aos 06 dias, “o” $p < 0,05$ em relação aos 09 dias).

O grupo 01 apresentou apenas uma regressão significativa, que ocorreu no 15° após a indução da lesão, e os grupos 02, 03 e 04 se comportaram de forma semelhante, com apenas duas regressões significativas, que se iniciaram após o 6° da indução da lesão.

Os géis dos extratos Ext_{EtOH} (0,2 e 2%) foram semelhantes, tendo quatro regressões significativas no tamanho da ferida, apresentando um processo cicatricial constante e progressivo. Além disso, a regressão significativa nesses dois grupos se iniciou ao 3° dia após a lesão

Análise histopatológica

No período de tratamento de 3 dias, todos os animais apresentaram hemorragia e neovascularização. Já o processo inflamatório foi mais frequente e intenso nos grupos tratados com os géis do extrato Ext_{EtOH}, diferindo do grupo controle sem contaminação.

A área de epitelização foi maior no grupo tratado com o gel do extrato Ext_{EtOH} a 2% em comparação com o grupo controle sem contaminação, e os animais tratados com a menor concentração do gel do extrato Ext_{EtOH}, ou seja 0,2%, apresentaram área com maior epitelização que a concentração de 2%.

Os parâmetros avaliados nos grupos do tratamento de 21 dias estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Quantificação histopatológica aos 21 dias de tratamento.

Variável	p-valor	
Tamanho da lesão	0.0039	G2 versus G1 p = 0.0008 G2 versus G3 p = 0.0123 G2 versus G6 p = 0.0008 G4 versus G6 p = 0.0449
Epitélio	<0.0001	G1 versus G3 p = 0.0123 G1 versus G4 p = 0.0037 G1 versus G5 p = 0.0037 G1 versus G6 p = 0.0123 G2 versus G3 p = 0.0123 G2 versus G4 p = 0.0037 G2 versus G5 p = 0.0037
Cristas epidérmicas	<0.0001	G2 versus G6 p = 0.0123 G1 versus G2 p = 0.0123 G1 versus G3 p = 0.0008 G2 versus G5 p = 0.0375 G3 versus G5 p = 0.0037 G3 versus G6 p = 0.0123
Anexos	0.3684	-

Teste G de independência, p<0,05. G1 (grupo 01): controle sem contaminação; G2 (grupo 02): controle com contaminação; G3 (grupo 03): tratado com gel carbopol; G4 (grupo 04): tratado com Kollagenase®; G5 (grupo 05): tratado com o gel de *S. hispida* à 2; G6 (grupo 06): tratado com o gel de *S. hispida* 0,2%.

O tamanho da lesão está atrelado à reconstituição original do tecido epitelial, e é baseado no tamanho do sitio de lesão que ainda não apresenta fibras colágenas completamente reorganizadas e epitélio completamente restaurado. Os grupos 01, 03 e 06 apresentaram tamanho de lesão menor que o grupo 02, e o grupo 06 apresentou uma lesão menor que o grupo 04.

Todos os animais com algum tipo de tratamento (gel carbopol, pomada Kollagenase e os tratados com os géis do extrato Ext_{EIOH}) apresentaram epitélio mais espesso do que os animais dos grupos controle com e sem contaminação.

A presença das cristas epidérmicas foi superior nos grupos 02 e 03 em relação ao grupo 01. O grupo 05 apresentou maior presença de crista com relação aos grupos 02 e 03, e o grupo 06 foi superior ao grupo 03. Os anexos estiveram presentes em todos os grupos, em maior ou menor grau, não ocorrendo diferenças estatísticas entre eles.

Alguns animais do grupo 04 apresentaram hemorragia, alteração essa não esperadas para 21 dias após a lesão (Figuras 6) e os animais dos grupos 05 e 06 apresentaram processo inflamatório e hemorrágico, que segundo Cotran, Kumar e Robbins (2010) podem retardar o processo de cicatrização (Figura 7).

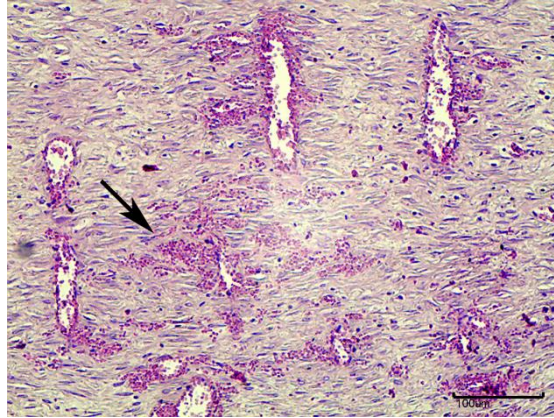


Figura 6. Imagem representando hemorragia (seta). Animais do grupo 04 - tratado com Kollagenase®. Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x. Barra de 100 μm.

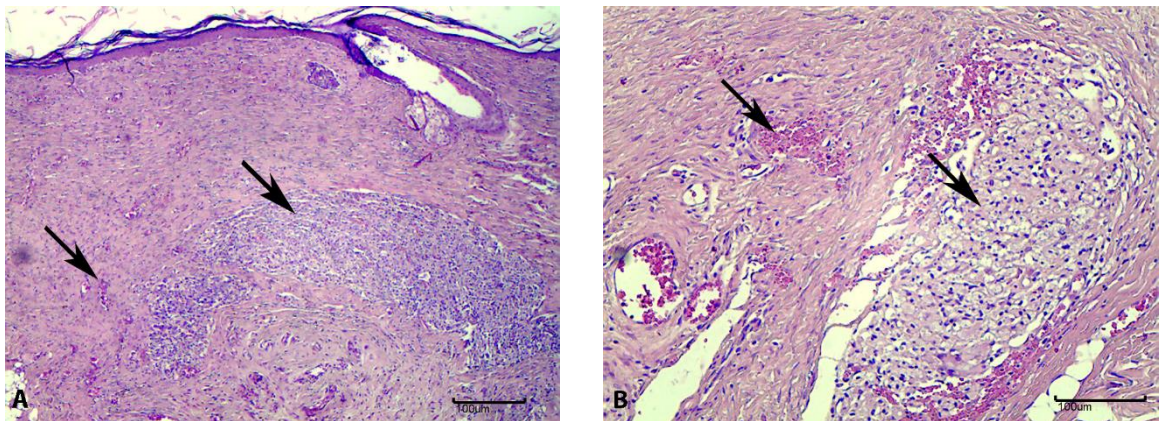


Figura 7. Imagens representando o processo inflamatório e hemorrágico (setas). Hematoxilina-Eosina. Barra de 100 μm. A - grupo 05 - gel do extrato etanólico bruto (Ext_{EiOH}) a 2,0%. Aumento de 40x. Hematoxilina-Eosina. Barra de 100 μm. B - grupo 06 - gel do extrato etanólico bruto (Ext_{EiOH}) a 0,2%. Aumento de 100x. Hematoxilina-Eosina. Barra de 100 μm.

As fibras colágenas espessas e finas foram quantificadas na camada papilar e reticular dos animais dos tratamentos de 3 e 21 dias. Os animais de todos os grupos em relação à espessura das fibras colágenas na camada papilar e reticular foram semelhantes, com maior presença de fibras colágenas espessas do que finas.

Na camada papilar, não houve diferença entre os grupos na quantidade de fibras colágenas espessas e finas nos tratamentos de 3 dias e 21 dias. Da mesma forma, não houve diferença na quantidade de fibras colágenas espessas e finas no tratamento de 3 dias na camada reticular.

Já com 21 dias, os grupos 05 e 06 foram estatisticamente diferentes na camada reticular. A quantidade de fibras colágenas espessas foi inferior e de fibras colágenas finas foi superior nos grupos 05 e 06, em comparação com o grupo 01,

demonstrando que os géis do extrato Ext_{EtOH} interfeririam negativamente no espessamento das fibras colágenas (Figura 8).

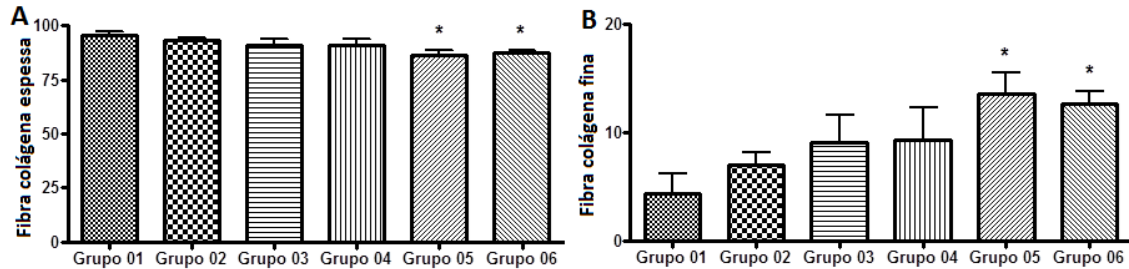


Figura 8. Comparação intergrupo na camada reticular do tratamento de 21 dias.

Legenda: A – contagem de fibras colágenas espessas (Kruskal-Wallis; $p = 0,0139$; * $p < 0,05$ em relação ao grupo 01 – controle sem contaminação). B - contagem de fibras colágenas finas (Kruskal-Wallis; $p = 0,0137$; * $p < 0,05$ em relação ao grupo 01 – controle sem contaminação). Grupo 01 - controle sem contaminação; grupo 02 – controle com contaminação; grupo 03 – tratado com Carbool gel 70%; grupo 04 - tratado com Kollagenase; grupo 05 - gel do extrato etanólico bruto; grupo 06 - gel do extrato etanólico bruto (Ext_{EtOH}) de *S. hispida* a 0,2%.

As camadas papilar e reticular foram semelhantes quanto à organização das fibras colágenas. Com 03 dias de tratamento, as fibras colágenas apresentavam-se mais desorganizadas nos grupos 01, 02, 03 e 04 e mais organizadas nos grupos 05 e 06 (Figura 9). Já com 21 dias a organização das fibras colágenas estavam semelhantes em todos os grupos (Figura 10).

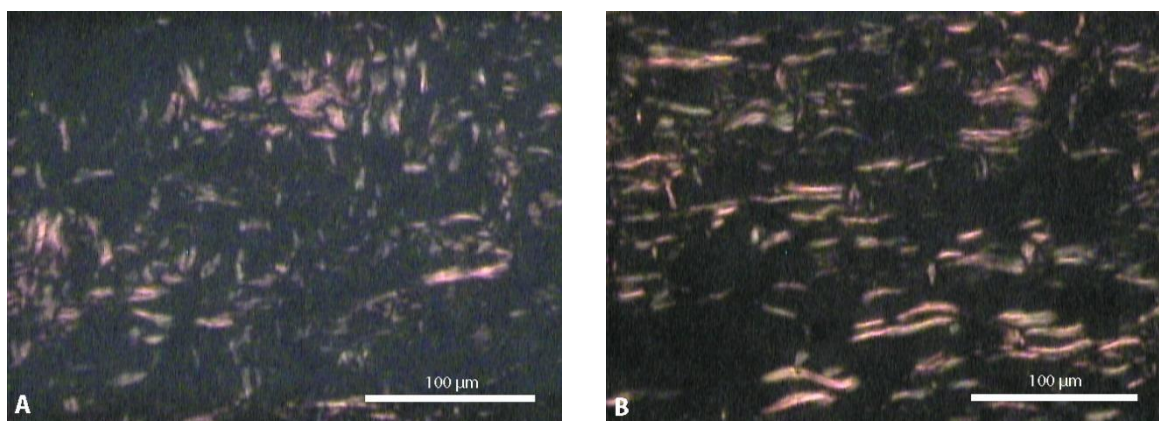


Figura 9. Imagem das lâminas coradas com Picrosirius-hematoxilina (PH) na camada papilar, no tratamento de 3 dias. A - fibras colágenas desorganizadas no grupo 01 - controle sem contaminação. B - fibras colágenas organizadas do grupo 06 - tratado com o gel de *S. hispida* à 0,2%. Barra de 100 µm. Aumento de 200x.

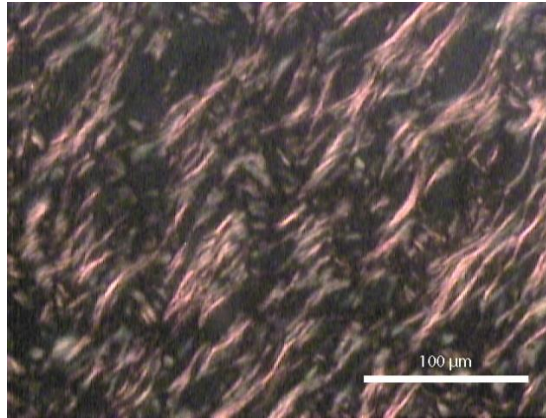


Figura 10. Imagem das lâminas coradas com Picrosirius-hematoxilina (PH) representando as fibras colágenas organizadas na camada papilar, no tratamento de 21 dias. Barra de 100 μm . Aumento de 200x.

Discussão

Os metabólitos triterpenóides, flavonóides, taninos e saponinas presentes nas partes aéreas de *S. hispida* também foram encontrados nos estudos de Honda *et al.* (1990) com a mesma espécie. Os teores de compostos fenólicos e flavonoides foram superiores aos descritos por Rizzi *et al.* (no prelo) para a espécie em estudo, onde os valores foram de $160,4 \pm 0,2 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e $90,3 \pm 0,3 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, para compostos fenólicos e flavonoides, respectivamente.

No teste da atividade antibacteriana foi utilizado o antibiótico cefoxitina, pois segundo o CLSI a cefoxitina é a mais indicada para a realização dos testes a fim de comprovar a resistência à metilina, e de fato foi comprovada a sensibilidade da cepa padrão ATCC 25923 e a resistência da amostra hospitalar.

O resultado com o extrato Ext_{EtOH} de *S. hispida* com o *S. aureus* sensível corrobora com os resultados encontrados na literatura com outras espécies do gênero (KOTT *et al.*, 1998; SREE; YASODAMMA; PARAMAGEETHAM, 2010), sendo provável que a elevada concentração de flavonoides ($168,6 \pm 1,2 \text{ mg g}^{-1}$) presente no extrato Ext_{EtOH} esteja diretamente relacionada com a atividade antibacteriana (CHOI *et al.*, 2006; CASTRO; CURY; ROSALEN, 2007).

Os resultados com o Ext_{EtOH} a 0,2% foram superiores aos encontrados com as espécies *Rhamnus californica* e *Umbellularia californica* com cepas de *S. aureus* sensível e resistente à metilina, sendo necessário, aproximadamente, um extrato 10 vezes mais concentrado para inibir o crescimento bacteriano (CARRANZA *et al.*, 2015).

Pode-se sugerir que ocorreu sinergismo/antagonismo entre os metabólitos secundários presentes no extrato Ext_{EtOH}. Possivelmente os metabolitos do Ext_{EtOH} a 2% apresentaram antagonismo e quando este extrato estava mais diluído, ou seja a 0,2%, ocorreu um sinergismo entre os compostos, pois segundo Pappa *et al.* (2007) a concentração dos compostos está correlacionada com o sinergismo/antagonismo entre os mesmos. O que justificaria a maior atividade antibacteriana do extrato Ext_{EtOH} a 0,2% em comparação com a concentração de 2%.

Na análise da atividade cicatrizante, no tratamento de 3 dias, a perda de peso provavelmente está interligada ao pós-operatório, em que os animais ficam mais debilitados e se alimentam menos. Na literatura, há relatos de perda de peso após a realização de lesões cutâneas, como Batista *et al.* (2012) que observaram a perda de peso apenas nos primeiros dias após a lesão e Sarmiento *et al.* (2014) que relataram perda de peso em todos os animais até o final dos tratamentos.

A regressão da ferida ocorre através dos miofibroblastos, que possuem filamentos de actina no citoplasma que tem a capacidade de se expandir e contrair (ABBAS; KUMAR; FAUSTO, 2010; MAJNO; JORIS, 2004). A elevada presença dos miofibroblastos poderia ter sido a causa da regressão eficaz das feridas dos animais tratados com os géis dos extratos Ext_{EtOH} a 0,2 e 2%, pois foram os únicos a apresentarem o fechamento da ferida constante e progressivo.

O início do processo de regressão dos animais tratados com os géis dos extratos Ext_{EtOH} a 0,2 e 2% também foi considerado precoce, pois de acordo com Mott *et al.* (2003), o período exponencial de regressão da ferida ocorre entre o 6° e o 15° dias após a lesão, e nesses animais o período de regressão se iniciou ao 3° dia após a indução da ferida.

Na análise histopatológica do tratamento de 3 dias, o processo inflamatório observado nos animais tratados com os géis dos dois extratos Ext_{EtOH} a 0,2 e 2% é importante para o processo cicatricial (HOSGOOD, 2006), se persistir por muitos dias, a inflamação pode retardar a cicatrização (PINTO *et al.*, 1997), no entanto o processo inflamatório não retardou o processo cicatricial dos animais tratados com os géis do extrato Ext_{EtOH}.

A epitelização é o recobrimento da ferida por um epitélio novo, ocorrendo a partir das bordas da lesão (SANTORO; GAUDINO, 2005). Ela se inicia em torno do 3° dia após a lesão (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008), o que ocorreu apenas com os grupos tratados com os géis dos dois extratos Ext_{EtOH} a 0,2 e 2%.

Já com 21 dias a ferida está saindo da fase proliferativa e entrando na fase de remodelagem (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008), como essas fases podem se sobrepor (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), é provável que processos característicos de uma fase estejam ocorrendo na fase anterior.

O que pode ter ocorrido com os anexos, pois de acordo com Dipietro e Burns (2003), eles sofrem regeneração limitada a partir da fase de remodelagem, mas em nosso trabalho, estiveram presentes em todos os grupos.

O epitélio mais espesso de todos os grupos com algum tipo de tratamento aumenta a resistência à novos rompimentos no local da lesão (HEDLUND, 2007).

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a correlação entre as cristas epidérmicas e a cicatrização. Mas as cristas epidérmicas são resultado das projeções da camada da derme que está em contato com a epiderme. As projeções dérmicas têm a função de aumentar a área de contato entre a derme e a epiderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Assim, as cristas epidérmicas estariam relacionadas com um epitélio organizado e regenerado.

Também não foram encontrados na literatura trabalhos que analisam o tamanho da lesão microscopicamente. Porém, a diminuição do tamanho da lesão diferenciou do teste de regressão da ferida, pois macroscopicamente, ao final do tratamento de 21 dias, as lesões apresentavam-se semelhantes em todos os grupos, e observando o processo microscópico é possível detectar a diferença entre os grupos.

Evidenciando, que externamente a ferida pode estar fechada, mas internamente o processo de regeneração tecidual ainda está ocorrendo e que nem todo o tecido lesionado foi recuperado, e os grupos com tamanho de lesão menor, ou seja os grupos 03 e 06, apresentaram regeneração tecidual mais rápida e concordante com o observado macroscopicamente.

Os animais tratados com os géis do extrato Ext_{E₁O_H} a 0,2 e 2% foram semelhantes entre si e auxiliaram o processo de cicatrização, sendo mais eficazes que os controles utilizados. O controle positivo utilizado foi a Kollagenase e essa pomada é composta por colagenase que auxilia na cicatrização e cloranfenicol que é um antimicrobiano de amplo espectro, apesar disso, ela apresentou atividade inferior ao extrato Ext_{E₁O_H}.

Os altos teores de flavonoides e compostos fenólicos podem ter contribuído com a atividade do extrato Ext_{E₁O_H}, principalmente os flavonoides pois apresentam

elevado potencial cicatrizante (D'ACAMPORA *et al.*, 2007; SUNTAR *et al.*, 2012). A correlação entre os metabolitos majoritários de uma planta e o seu potencial cicatrizante foi apontada nos estudos de Gebrehiwot *et al.* (2015), em que apontaram os terpenoides como os possíveis responsáveis pela atividade cicatrizante da espécie *Commiphora guidottii*.

Em alguns aspectos como a epitelização ao 3º dia e o tamanho da lesão com 21 dias, o grupo tratado com a menor concentração do extrato (0,2%) apresentou melhores resultados que o grupo tratado com a concentração de 2%, comprovando que a concentração do extrato Ext_{EtOH} pode estar correlacionada com o sinergismo/antagonismo entre os metabólitos secundários presentes na espécie.

As fibras colágenas foram quantificadas pois tem papel importante no processo de cicatrização, direcionando a migração do epitélio (HEDLUND, 2007) e tendo função estrutural (LINSENMAYER, 1991; GELSE; PÖSCHL; AIGNER, 2003).

Os tipos de colágenos mais frequentes na pele são os colágenos fibrilares I e III (LINSENMAYER, 1991). O tipo III é mais fino e está presente no início do processo de cicatrização, e durante a cicatrização ele é substituído pelas fibras de colágeno tipo I, que são mais longas e grossas (FLEISCHMAJER *et al.*, 1980; HOSGOOD, 2006).

As fibras colágenas coradas pela técnica de Picrosirius-hematoxilina (PH), apresentam coloração que varia do vermelho ao amarelo brilhante com intensa birrefringência quando são espessas e apresentam coloração esverdeada quando são finas (MARTINS; TAMASO; GUERRA, 2002), sendo possível sugerir o tipo de colágeno presente, fibras espessas sugere-se que sejam fibras colágenas do Tipo I e fibras finas sugere-se que sejam do Tipo III.

A maior quantidade de fibras espessas do que finas presente em todos os grupos caracteriza a maturação da ferida (HEDLUND, 2007).

A proporção entre fibras colágenas do Tipo I e Tipo III, no tecido cutâneo sadio, é de 4:1, e em cicatrizes do tipo quelóide ou imaturas, a proporção entre as fibras colágenas é de 2:1 (STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998). Sugerindo-se que fibras colágenas espessas sejam o Tipo I e as finas o Tipo III, é possível apontar que todos os grupos analisados apresentaram a proporção de 4:1 ou uma proporção ainda maior, o que caracteriza a cicatrização eficaz.

Como foi relatado, alguns animais tratados com os géis do extrato Ext_{EtOH} a 0,2 e 2% apresentaram processo inflamatório no período de 21 dias após a lesão, o

que pode explicar a quantidade estatisticamente inferior de fibras colágenas espessas e superior de fibras colágenas finas na camada reticular em relação ao grupo controle sem contaminação, pois de acordo com Cotran, Kumar e Robbins (2010) a inflamação elevada e demasiadamente longa inibe a proliferação de fibroblastos, interferindo na produção de colágeno, principalmente de fibras colágenas espessas, que está presente em uma cicatriz madura.

Conclusão

O extrato Ext_{EtOH} das partes aéreas de *S. hispida* apresentaram atividade antibacteriana com a bactéria *S. aureus* sensível e resistente à metilicina. Os géis do extrato Ext_{EtOH} de *S. hispida* à 0,2% e 2% proporcionaram uma cicatrização e regressão da ferida mais eficaz que a pomada comercial Kollagenase, o que pode ser devido ao elevado teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes nas partes aéreas da espécie e à sua atividade antibacteriana. Assim, os géis do extrato Ext_{EtOH} das partes aéreas de *S. hispida* podem ser utilizados no tratamento de feridas contaminadas por *S. aureus* resistente à metilicina.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas (INAU), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo suporte financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

Referências

Abbas AK, Kumar V, Fausto N. Tecido de renovação e reparação: regeneração, cicatrização e fibrose. In: Abbas AK, Kumar V, Fausto N, editors. Patologia: bases patológicas das doenças. 3rd ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p. 91-124.

- Alves DFS, Cabral-Junior FC, Cabral PPAC, Oliveira-Junior RM, Rego ACM, Medeiros AC. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. Rev Col Bras Cir. 2008;35:188-93.
- Bahramsoltani R, Farzaei MH, Rahimi R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. Arch Dermatol Res. 2014;306:601-17.
- Batista LLV, Campesatto EA, Assis MLB, Barbosa APF, Grillo LAM, Dornelas CB. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. Rev Col Bras Cir. 2012;39:515-20.
- Carranza MG, Sevigny MB, Banerjee D, Fox-Cubley L. Antibacterial activity of native California medicinal plant extracts isolated from *Rhamnus californica* and *Umbellularia californica*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015;14:1-6.
- Cardoso EL, Crispim SMA, Rodrigues CAG, Barioni JW. Composição e dinâmica da biomassa aérea após a queima em savana gramíneo-lenhosa no Pantanal. Pesqui Agropec Bras. 2000;35:2309-16.
- Castro ML, Cury JA, Rosalen PL. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. Quím Nova. 2007;30:1512-6.
- Choi YM, Noh DO, Cho SY, Suh HJ, Kim KM, Kim JM. Antioxidant and antimicrobial activities of própolis from several regions of Korea. LWT - Food Sci Technol. 2006;39:756-61.
- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Normativas do CONCEA: Para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação. 2015.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins – Patologia: estrutural e funcional. 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
- D'Acampora AJ, Tramonte R, Burger D, Burger PJ. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. ACM Arq Catarin Med. 2007;36:69-75.
- Dipietro LA, Burns AL. Wound healing: methods and protocols. New Jersey: Humana Press; 2003.

- Flecknell P. Examples of dilutions of anaesthetic mixtures for small rodents. In: Flecknell P, editor. Laboratory animal anesthesia. 3rd ed. New York: Academic Press; 2009. p. 283-286.
- Fleischmajer R, Gay S, Perlish JS, Cesarini JP. Immunoelectron microscopy of type III collagen in normal and scleroderma skin. *J Invest Dermatol.* 1980;75:189-91.
- Fontoura FM, Matias R, Ludwig J, Oliveira AKM, Bono JAM, Martins PDFRB, Guedes NMR. Seasonal effects and antifungal activity from bark chemical constituents of *Sterculia apetala* (Malvaceae) at Pantanal of Miranda, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Amaz.* 2015;45:283–92.
- Gebrehiwot M, Asres K, Bisrat D, Mazumder A, Lindemann P, Bucar F. Evaluation of the wound healing property of *Commiphora guidottii* Chiov. ex. Guid. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15:282.
- Gelatti LC, Bonamigo RR, Becker AP, D'azevedo PA. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. *An Bras Dermatol.* 2009;84:501-506.
- Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 55, n. 12, p. 1531-1546, Nov. 2003.
- Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes, *Quím Nova.* 2010;33:667-79.
- Hedlund CS. Surgery of the integumentary system. In: Fossum TW, editor. Small animal surgery. 3rd ed. Missouri: Mosby Elsevier; 2007. p. 161-259.
- Honda NK, Garcez WS, Garcez FR, Conceição CA. Estudo químico de plantas de Mato Grosso do Sul I: triagem fitoquímica. *Revista Científica e Cultural UFMS.* 1990;5:37-46.
- Hosgood G. Stages of Wound Healing and Their Clinical Relevance. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2006;36:667-85.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica.* 12th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
- Kott V, Barbini L, Cruanes M, Muñoz JD, Vivot E, Cruanes V, Martino G, Ferraro L, Cavallaro L, Campos R. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 1998;64:78-84.

- Linsenmayer TF. Cell biology of extracellular Matrix. 2nd ed. New York: Plenum Press; 1991.
- Majno G, Joris I. Cells, tissues and disease: principles of general pathology. 2nd ed. Nova York: Oxford University Press; 2004.
- Marston A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry*. 2007;68:2785-97.
- Martins AMCRPF, Tamasso E, Guerra JL. Histochemical study of fibrillar proteins of the extracellular matrix in benign and malignant mammary neoplasms in dogs. *Braz J Vet Res An Sci*. 2002;39:43-49.
- Matos JFA. Introdução a Fitoquímica Experimental. 2nd ed. Fortaleza: UFC; 2009.
- Mott KJ, Clark DP, Stelljes LS. Regional variation in wound contraction of Mohs surgery defects allowed to heal by second intention. *Dermatol Surg*. 2003;29:712-22.
- Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, Farr BM. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003;24:362-86.
- Pappa G, Strathmann J, Löwinger M, Bartsch H, Gerhäuser C. Quantitative combination effects between sulforaphane and 3,3'-diindolylmethane on proliferation of human colon cancer cells *in vitro*. *Carcinogenesis*. 2007;28:1471-7.
- Peixoto Sobrinho TJS, Silva CHTP, Nascimento JE, Monteiro JM, Albuquerque UP, Amorim ELC. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Rev Bras Cienc Farm*. 2008;44:683-9.
- Pinto LP, Souza LB, Freitas RA, Figueiredo CRLV, Galvão HC, Câmara MLAS, Carvalho RA. Patologia básica. Natal: Editora da UFRN; 1997.
- Pott A, Abdon MM, Silva JSV, Sobrinho AAB, Pott VJ, editors. Dinâmica da flora na planície de inundação do baixo Taquari, Pantanal, MS. III Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal: os Desafios do Novo Milênio; 2000 Nov 27-30; Corumbá, MS. 2000.
- Rizzi ES, Dourado DM, Matias R, Muller JAI, Guerrero ATG, Guilhermino JF, Moreira DL, Silva BAK, Barbosa-Ferreira M. Wound-healing potential of *Sebastiania hispida* (Mart.) Pax (Euphorbiaceae) ointment compared to low power laser in rats. *Braz J Biol*, Curitiba, no prelo.

- Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res.* 2005;304:274-86.
- Sarmiento PA, Ataíde TR, Barbosa APF, Araújo-Júnior JX, Lúcio IML, Bastos MLA. Evaluation of the extract of *Zeyheria tuberculosa* with a view to products for wound healing. *Rev Latino-Am Enfermagem.* 2014;22:165-72.
- Silva NCC, Fernandes-Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2010;16:402-13.
- Sousa CMMS, Silva HR, Veiera-Jr GM, Ayres MCC, Charllyton LSC, Delton SA, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araujo PBM, Brandrão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím Nova.* 2007;30:351-5.
- Sree S, Yasodamma N, Paramageetham CH. Phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of the methanolic leaf extract: *Sebastiania chamalea* Muell. *Bioscan.* 2010;5:173-5.
- Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and Healing Dynamics of Chronic Cutaneous Wounds. *Am J Surg.* 1998;176 Suppl. 2A:26-38.
- Suntar I, Akkol EK, Keles H, Yesilada E, Sarker SD, Arroo R, Baykal T. Efficacy of *Daphne oleoides* subsp. *kurdica* used for wound healing: Identification of active compounds through bioassay guided isolation technique. *J Ethnopharmacol.* 2012;141:1058-70.
- Tazima MFGS, Vicente YAMVA, Moriya T. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina (Ribeirão Preto).* 2008;41:259-64.
- Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Rev Bras Cienc Farm.* 2006;42:189-306.
- Zeraik ML, Yariwake JH. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. *Microchem J.* 2010;96:86–91.

Capítulo II

Atividade cicatrizante da fração F₁₅ isolada de *Sebastiania hispida* (Mart.) Pax. em modelo de ferida infectada por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

Resumo

As infecções interferem no processo de cicatrização de feridas e o *Staphylococcus aureus* é frequentemente associado às essas infecções. As plantas medicinais são uma alternativa no auxílio da cicatrização de feridas contaminadas, e a espécie *Sebastiania hispida* demonstrou ter atividade cicatrizante em feridas isentas de contaminação. Desta forma o propósito deste estudo foi avaliar a eficácia do uso tópico da formulação de uma fração isolada do extrato de *S. hispida* em modelo animal com ferida infectada por *S. aureus* resistente à meticilina. O extrato bruto etanólico de *S. hispida* e três frações obtidas a partir dele foram submetidas à análise fitoquímica e quantificação de flavonoides e fenóis totais. Uma das frações foi submetida a fracionamentos químicos e obtida uma fração semi-pura (F₁₅). A fração F₁₅ na concentração de 0,2% foi utilizada no teste *in vitro* de atividade antibacteriana e para o ensaio da atividade cicatrizante foi utilizada a fração F₁₅ a 0,2% incorporada no veículo gel Carbopol em ratos Wistar. Os períodos de tratamento foram de 3 e 21 dias e realizou-se análises macroscópica e histopatológica. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), com $p < 0,05$. A fração F₁₅ apresentou atividade antibacteriana significativa com as duas cepas de *S. aureus*, sendo necessários 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para inibir o crescimento da cepa sensível e com a cepa resistente a atividade foi superior ao controle positivo, sendo necessários 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na análise histopatológica dos períodos de tratamento de 3 e 21 dias, os animais tratados com a formulação da fração F₁₅ de *S. hispida* a 0,2% apresentaram resultados superiores ao controle positivo (Kollagenase) nos parâmetros de tamanho da lesão, epitélio e cristas epidérmicas, o que contribuiu com a melhora do processo de cicatrização. Assim, a formulação da fração F₁₅ a 0,2% tem atividade cicatrizante sobre feridas contaminadas por *S. aureus* resistente à meticilina e essa atividade é devido à composição da fração, que é uma mistura de flavonoides.

Palavras-chave

Flavonoides; Antibacteriano; Cicatrização.

Introdução

O processo de cicatrização tem o objetivo de recuperar a estrutura original de um tecido lesionado (Abbas *et al.*, 2010). Um dos fatores que interferem no processo de cicatrização são as infecções, e o *Staphylococcus aureus* é frequentemente associado às infecções cutâneas (SANTOS *et al.*, 2007).

Uma das características do *S. aureus* é a capacidade de desenvolver cepas resistentes a várias classes de antibióticos (Alves *et al.*, 2008). As infecções causadas pelas cepas resistentes de *S. aureus* aumentam o tempo e o custo das

internações quando comparadas com as infecções causadas por cepas sensíveis de *S. aureus* (Kopp *et al.*, 2004).

As plantas medicinais são uma alternativa no auxílio do processo de cicatrização de feridas contaminadas, por apresentarem um arsenal de constituintes químicos com atividade farmacológica. A espécie *Sebastiania hispida*, conhecida como mercúrio e de ocorrência no Pantanal e Cerrado do Mato Grosso do Sul (Cardoso *et al.*, 2000; Pott *et al.*, 2000), apresentou atividade cicatrizante em feridas de segunda intenção, isentas de contaminação (Rizzi *et al.*, no prelo).

O gel do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *S. hispida* apresentou atividade antimicrobiana e cicatrizante em feridas de segunda intenção contaminadas (dados não publicados), porém não foram encontrados relatos do isolamento dos compostos desta espécie aos quais pudessem ser atribuídas as suas atividades farmacológicas.

Fazendo-se necessária a continuidade dos estudos com a espécie *S. hispida*, o presente estudo teve por objetivo avaliar a eficácia do uso tópico da formulação de uma fração isolada de *S. hispida* em modelo animal com ferida infectada por *S. aureus* resistente a metilina.

Métodos

Material botânico

As partes aéreas (folhas e caules) de *Sebastiania hispida* (Mart.) Pax. foram coletadas em áreas com vegetação nativa de Campo Grande, Mato Grosso do Sul e transportadas para a Universidade Anhanguera - Uniderp, identificadas e um exemplar foi catalogado e incorporado ao acervo com o número 7826. O material coletado foi seco em estufa circuladora de ar 40 °C (MARCONI®, Modelo MA35), triturado e armazenado.

Preparo do extrato e fracionamento

Para obtenção do extrato etanólico bruto (Ext_{EtOH}), as partes aéreas moídas foram pesadas (890,0 g) e extraídas com etanol (99,5%). A extração foi feita em duas etapas, primeiro em aparelho de ultrassom (UNIDQUE®, 1450) por 60 minutos, seguido por 24 horas de extração por maceração, repetindo-se este procedimento, à temperatura ambiente, até exaustão (10 dias). As soluções

resultantes após filtração foram concentradas, em evaporador rotativo (Tecnal, Modelo MA120), fornecendo o extrato bruto em etanol (31,1 g Ext_{EtOH}).

Parte do extrato Ext_{EtOH} (24,8 g) foi suspenso em 200 mL de uma mistura de metanol/água 1:1 (250 mL) e submetido à partição sucessivamente em hexano (800,0 mL) e acetato de etila (600,0 mL). Após remoção dos solventes obteve-se as frações hexânica (F_{Hex}= 9,4 g), acetato de etila (F_{AcOEt}= 5,2 g) e a fração hidrometanólica (F_{H₂O/MeOH} = 10,2 g).

A partir das frações realizou-se as análises fitoquímicas seguindo metodologia adaptada de Matos (2009) e quantificação de fenóis totais (Sousa *et al.*, 2007) e flavonoides (Peixoto Sobrinho *et al.*, 2008).

Isolamento dos constituintes

Para o direcionamento do isolamento químico, as frações (F_{Hex}, F_{AcOEt} e F_{H₂O/MeOH}) foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) e a visualização dos compostos foi realizada por irradiação com lâmpada ultravioleta (UV: 366 nm e 254 nm), e por aspensão com solução de ácido sulfúrico/metanol (1:1), seguida de aquecimento e para a detecção de flavonoides seguiu-se metodologia adaptada de Wagner e Bladt (2009).

Das frações analisadas em CCD, a fração F_{AcOEt} (3,6 g), por apresentar teste positivo para flavonoides, foi selecionada para o fracionamento em coluna clássica (CC) de sílica gel (Ø 0,063 - 0,2 mm - Merck®; 75,22 g; Ø 4,4 cm), eluída com hexano/CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/CHCl₃, CHCl₃/AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH/H₂O fornecendo 101 frações de aproximadamente 13 mL cada. As frações foram reunidas em 27 novas frações conforme semelhança apresentada em CCD.

Após recristalização com metanol e acetona e análise em CCD para flavonoides, a fração C₁₆ (2,1 g) foi selecionada para ser submetida a uma nova CC de sílica gel (Ø 0,04 – 0,63 mm, Merck®, 47,9 g; Ø 3,1 cm). Os solventes utilizados foram hexano, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/CHCl₃, CHCl₃/AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH fornecendo 271 frações de aproximadamente 13 mL cada. As frações foram reunidas em 38 novas frações conforme semelhança apresentada em CCD.

Após recristalização com metanol e acetona e análise em CCD para flavonoides, a fração F₁₅ (0,4724 g), por apresentar uma mistura de flavonoides (Figura 1), foi selecionada para a realização dos testes *in vitro* e *in vivo*. De acordo

com os resultados dos testes com o extrato bruto etanólico das partes aéreas de *S. hispida* (dados não publicados), foi selecionada a menor concentração que apresentou atividade cicatrizante de feridas contaminadas, ou seja, a concentração de 0,2%.

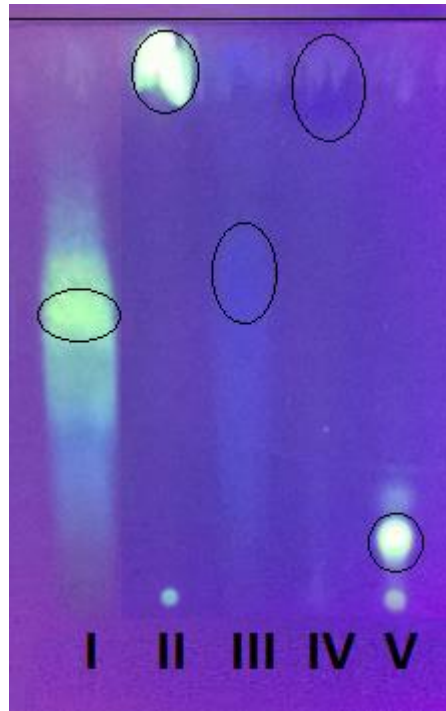


Figura 1. Foto da cromatoplaça da fração F₁₅ (I) e dos padrões: quercetina (II), ácido tânico (III) ácido gálico (IV) rutina (V). Cromatoplaça visualizada no comprimento de onda de 366 nm.

Atividade antibacteriana *in vitro*

Micro-organismos

O micro-organismo utilizado para os ensaios foi a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e uma cepa de amostra hospitalar resistente à meticilina. Como controle positivo foi utilizado a cefoxitina e o controle negativo o etanol:água (1:1) e os ensaios foram realizados de acordo com as recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Para a realização dos testes foi preparada uma suspensão bacteriana com densidade ajustada por comparação ao tubo n° 0,5 da escala McFarland.

Teste de difusão em disco

O teste de difusão em disco foi realizado em placas contendo as suspensões bacterianas e discos de papel (Whatman) impregnados com a fração F₁₅. Após 24h

as placas foram inspecionadas quanto à presença de halos de inibição. O delineamento experimental foi de três repetições e foram considerados ativos halos acima de 7 mm.

Teste de concentração mínima inibitória

A fração F₁₅ foi diluída obtendo uma série de concentrações na ordem de 2 mg a 0,97 µg mL⁻¹. As placas de microdiluição contendo a suspensão bacteriana e a fração foi incubada por 24h e a leitura para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração onde ocorreu inibição do crescimento, ou seja, ausência de turvação.

Atividade cicatrizante *in vivo*

Para a atividade cicatrizante *in vivo* foi utilizada uma formulação da fração F₁₅ incorporada no veículo a base de Gel Carbopol (70%), na concentração de 0,2%.

Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, os quais foram mantidos em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro) e temperatura (média de 23 °C). Os animais receberam água e ração comercial Nuvital® *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas preconizadas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Anhanguera-Uniderp e foi autorizado sob o parecer 2941.

Procedimentos

Antes do procedimento operatório, os animais foram anestesiados com cloridrato de Ketamina e Xilazina, via intramuscular (Flecknell, 2009). A ferida foi induzida até a exposição da fáscia muscular utilizando-se um punch metálico de diâmetro 8 mm e nenhuma medida de antissepsia foi adotada na ferida desses animais.

Os grupos avaliados foram (n= 6): grupo controle com solução fisiológica 0,9% (grupo 01: sem bactéria e grupo 02: com bactéria); grupo controle com

Carbopol em gel 70% (grupo 03); grupo controle com a pomada Kollagenase® (grupo 04); grupo teste da formulação da fração F₁₅ a 0,2% (grupo 07).

Os animais de todos os grupos foram inoculados com a bactéria *S. aureus* resistente à oxacilina, exceto grupo 01. Os tratamentos tópicos ocorreram diariamente nos períodos de 3 e 21 dias, as feridas foram mensuradas a cada 3 dias e diariamente foi realizada a análise macroscópica da ferida. A eutanásia foi realizada nos períodos do tratamento, com dose letal do anestésico.

Avaliação histopatológica

Amostras de pele foram retiradas, processadas e coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) e Picrosirius-Hematoxilina (PH). A captura das imagens das lâminas coradas com PH foi realizada em fotomicroscópio Carl Zeiss acoplado a uma microcâmera Samsung. E a captura das coradas com HE foi realizada utilizando um microscópio ótico Nikon Eclipse E200.

Na análise histológica das lâminas coradas com HE foi verificada a reparação tecidual conforme o período de tratamento e os resultados histológicos foram agrupados qualitativamente, utilizando-se escala de símbolos. As lâminas coradas com PH foram analisadas para quantificar o percentual de fibras colágenas presentes na região da cicatrização.

Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 4. Foi realizada Análise de Variância (ANOVA) do tipo fatorial para o teste de atividade antibacteriana *in vitro* e ANOVA seguida pelo teste Tukey para análise dos dados de fenóis totais e flavonoides.

As comparações intragrupos dos testes *in vivo* foram realizadas através do teste *t* de *Student* para amostras relacionadas nas distribuições normais e do teste de *Wilcoxon* nas amostras de distribuição não normal. A magnitude de variação intergrupos foi avaliada através da ANOVA com *post hoc test* de *Tukey* nas amostras de distribuição normal e do teste de Kruskal-Wallis com *post hoc test* de *Dunn* nas amostras de distribuição não normal.

Consideraram-se como estatisticamente significativas as comparações com $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Análise fitoquímica e quantificação de compostos fenólicos e flavonoides

Nos resultados da análise fitoquímica das frações (F_{Hex} , F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$) é possível observar que a fração F_{Acoet} em comparação com as demais frações apresentou a maior diversidade de compostos químicos (7 classes) com destaque aos compostos fenólicos, flavonóides e triterpenos, seguida da $F_{H/MeOH}$ (6 classes), sendo os compostos fenólicos e taninos com maior intensidade. Na F_{Hex} foram detectadas 4 classes de metabólitos secundários com predominância dos triterpenos e esteroides (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado das análises fitoquímicas das frações (F_{Hex} , F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$) de *Sebastiania hispida*, coletada em Campo Grande – MS

Metabólitos Secundários	Frações		
	F_{Hex}	F_{Acoet}	$F_{H/MeOH}$
Compostos Fenólicos	+	+++	+++
Taninos	-	+	+++
Flavonóides	+	+++	++
Flavonóis	-	++	+
Antraquinonas	-	+	-
Triterpenos	++	+++	-
Esteróides	+++	++	-
Glicosídeos Cardiotônicos	-	-	+
Saponinas	-	-	++
F. T. (mg de equivalentes de ácido gálico/g)	55,4b ± 0,4	226,2c ± 1,1	112,8d ± 0,1
F. (mg de equivalentes de quercetina/g)	36,6b ± 0,8	148,3c ± 0,7	99,4d ± 0,5

Fração Hexânica= F_{Hex} ; Fração acetato de etila= F_{Acoet} ; Fração hidrometanólica= $F_{H/MeOH}$. + (menor intensidade), ++ (média intensidade), +++ (maior intensidade), (-) Negativo. F. T. = fenóis totais em mg de equivalentes de ácido gálico/g). F.= flavonoides totais em mg de equivalentes de quercetina/g.

O teor de fenóis totais e flavonoides foi estatisticamente superior na fração F_{Acoet} (F.T. = $226,2 \pm 1,1$ mg $100g^{-1}$, F. = $148,3 \pm 0,7$ mg $100g^{-1}$), em relação às demais frações. Com esses dados é possível observar que os flavonoides representam mais de 60% dos compostos fenólicos presentes na F_{Acoet} .

Um estudo fitoquímico realizado com o extrato bruto etanólico de *S. hispida* mostrou que essa espécie é rica em compostos fenólicos, flavonóides, triterpenos e esteroides (dados não publicados). Branco e Pizzolatti (2002) identificaram a presença de esteroides e triterpenos no extrato hexânico de *S. argutidens*, assim como observado na fração F_{Hex} de *S. hispida*.

Atividade antibacteriana *in vitro*

A tabela 2 apresenta os resultados da atividade antibacteriana de *Sebastiania*

hispida.

Tabela 2. Valores dos halos de inibição do teste de difusão em disco e das concentrações mínimas inibitórias do crescimento de *Staphylococcus aureus* sensível e resistente à metilicina a partir do teste com a fração F₁₅ de *Sebastiania hispida*.

	Difusão em disco		CMI	
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Sensível (mm)	Resistente (mm)	Sensível ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Resistente ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Fração F₁₅ 0,2%	9,3 ± 0,34 bA	8,3 ± 0,34 bA	250	125
Controle positivo (cefoxitina)	32,3 ± 5,34 aA	Inativo cB	62,5	1000
Controle negativo (etanol:água)	Inativo cA	Inativo cA	-	-

CMI – concentração mínima inibitória. ANOVA fatorial ao nível de 1% de probabilidade. Letras minúsculas para colunas, e letras maiúsculas para linhas. Letras diferentes indicam diferença estatística.

No teste da atividade antibacteriana foi utilizada a cefoxitina, pois segundo o CLSI a cefoxitina é o antibiótico mais indicado para a realização de testes a fim de comprovar a resistência à metilicina. E de fato, nos dois testes foi comprovada a sensibilidade da cepa padrão ATCC 25923 e a resistência da amostra hospitalar.

Nos dois testes a fração F₁₅ apresentou atividade inibitória do crescimento das duas cepas. No teste de difusão em disco essa atividade foi semelhante, já no teste de CMI a fração F₁₅ foi estatisticamente superior ao controle positivo, sendo necessário apenas 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o inibir o crescimento da cepa de *S. aureus* resistente a metilicina.

A atividade antibacteriana da fração F₁₅ foi superior à ação apresentada pelo extrato bruto etanólico da mesma espécie, pois foram necessários 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato bruto etanólico a 0,2% para inibir o crescimento das cepas de *S. aureus* sensível e resistente à metilicina (dados não publicados).

Esses dados demonstram que apesar da pequena quantidade de extrato bruto etanólico necessária para inibir o crescimento do *S. aureus*, com a fração F₁₅ a concentração necessária foi menor ainda. Comprovando que os compostos presentes no extrato bruto etanólico apresentavam antagonismo, diminuindo a sua atividade antibacteriana (dados não publicados), e o isolamento de uma mistura de flavonoides proporcionou a mesma atividade com uma concentração menor.

Eom *et al.* (2016) observaram que uma sub-fração isolada da fração acetato de etila da espécie *Poncirus trifoliata* apresentou elevada atividade antibacteriana com cepas de *S. aureus* resistente à metilicina com valores de CMI semelhantes aos encontrados em nosso estudo, sendo que a fração F₁₅ também foi isolada de uma fração acetato de etila.

Os flavonoides que compõem a fração F₁₅ são os responsáveis pela atividade antibacteriana, pois vários autores relatam que diversos tipos de flavonoides têm ação antibacteriana, inclusive com cepas resistentes (Rauha *et al.*, 2000; Xu e Lee, 2001). Cushnie e Lamb (2005) relataram que a atividade antibacteriana dos flavonoides ocorre através da inibição da síntese do ácido nucléico, inibição da função da membrana citoplasmática e/ou a inibição do metabolismo energético das bactérias.

De acordo com Arima *et al.* (2002), em um trabalho realizado com *Bacillus cereus* e *Salmonella enteritidis*, foi comprovado que flavonoides distintos, ao serem unidos, apresentaram maior atividade antibacteriana do que quando estes flavonoides estavam isolados. O que pode ter contribuído para a ação da fração F₁₅, pois ela é composta por uma mistura de flavonoides.

Atividade cicatrizante *in vivo*

Análise macroscópica

A hemorragia esteve presente apenas no dia da realização da lesão e os animais do grupo tratado com a formulação da fração F₁₅ de *S. hispidus* a 0,2% apresentaram crosta até o 12º dia após a lesão. Os animais também foram avaliados quanto ao peso no início e final dos tratamentos de 3 e 21 dias e a figura 2 apresenta a quantidade de gramas que os animais ganharam/perderam durante os experimentos.

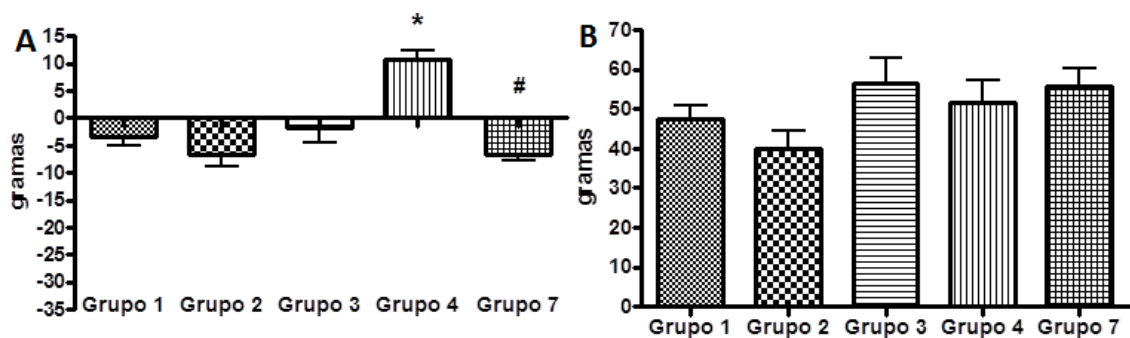


Figura 2. Comparação dos pesos entre os animais por grupo de estudo. A – tratamento de três dias (ANOVA, $p = 0,0455$; “*” $p < 0,05$ em relação ao grupo 02; “#” $p < 0,05$ em relação ao grupo 04). B – tratamento de 21 dias. Grupo 01 - controle sem contaminação; grupo 02 – controle com contaminação; grupo 03 – tratado com Carbool gel 70%; grupo 04 - tratado com Kollagenase; grupo 07 - formulação da fração F₁₅ de *S. hispidus* a 0,2%.

No experimento de 3 dias, apenas o grupo 04 ganhou peso após o

tratamento e o grupo 07 foi o que mais perdeu peso. Já no experimento de 21 dias, todos os animais ganharam peso.

No tratamento de 3 dias, a perda de peso pode estar relacionada o pós-operatório, pois os animais ficam mais debilitados e se alimentam menos após a cirurgia e anestesia. Na literatura, há relatos de perda de peso após a realização de lesões cutâneas, e Batista *et al.* (2012), observaram a perda de peso apenas nos primeiros dias após a lesão, semelhante ao observado em nossos estudos.

Os resultados da análise de peso foram semelhantes aos encontrados com o gel do extrato bruto etanólico de *S. hispida*, em que os animais apresentaram perda de peso apenas no tratamento de 3 dias (dados não publicados).

A avaliação da contração da ferida pode indicar como está o processo de cicatrização e não houve diferença significativa nas porcentagens de regressão nos tratamentos de 3 e 21 dias e apenas para o tratamento de 21 dias foi realizada a análise da regressão da ferida intragrupo, medida a cada três dias (Figura 3).

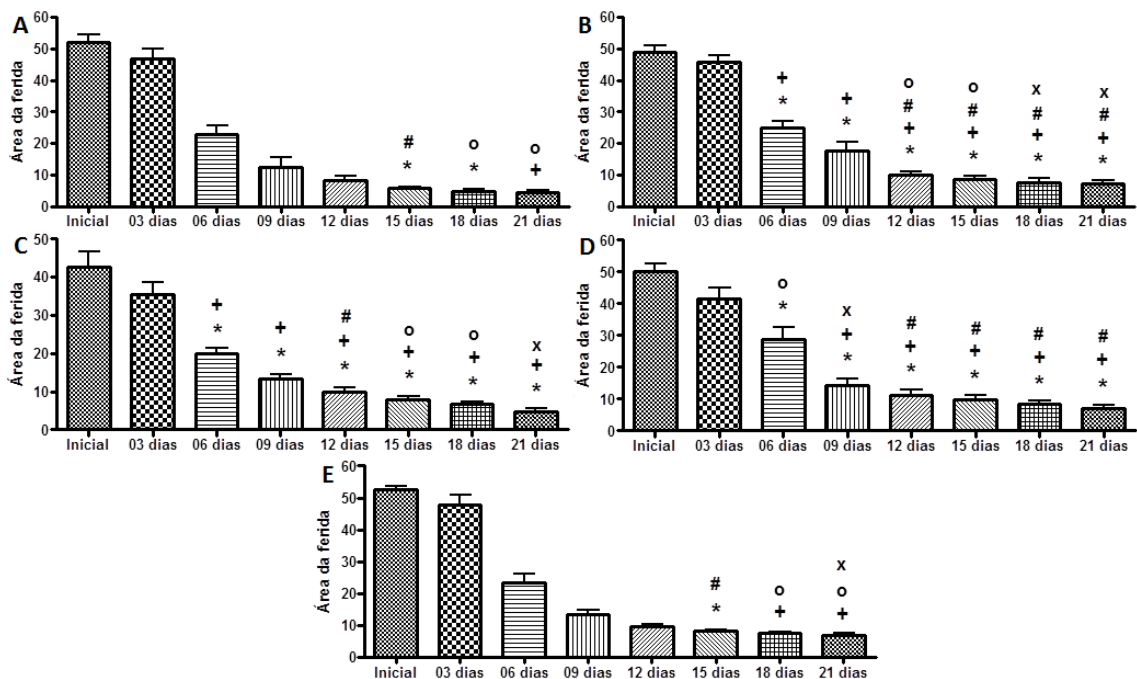


Figura 3. Comparação dos valores referentes às áreas das feridas no tratamento de 21 dias.

A - o grupo 01 – controle sem contaminação (Kruskal-Wallis; $p < 0,0001$; “*” $p < 0,01$ em relação ao tempo inicial, “+” $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial, “#” $p < 0,05$ em relação aos 03 dias, “o” $p < 0,01$ em relação aos 03 dias). B - grupo 02 – controle com contaminação (ANOVA; $p < 0,0001$, “*” $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial, “+” $p < 0,001$ em relação aos 03 dias, “#” $p < 0,001$ em relação aos 06 dias, “o” $p < 0,05$ em relação aos 09 dias, “x” $p < 0,01$ em relação aos 09 dias). C - grupo 03 – tratado com Carbopol gel 70% (ANOVA; $p < 0,0001$, “*” $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial, “+” $p < 0,001$ em relação aos 03 dias, “#” $p < 0,05$ em relação aos 06 dias, “o” $p < 0,01$ em relação aos 06 dias, “x” $p < 0,001$ em relação aos 06 dias). D - grupo 04 - tratado com Kollagenase (ANOVA; $p < 0,0001$, “*” $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial, “+” $p < 0,001$ em relação aos 03 dias, “o” $p < 0,05$ em relação aos 03 dias, “x” $p < 0,01$ em relação aos 06 dias, “#” $p < 0,001$ em relação aos 06 dias). E - grupo 07 -

formulação da fração F₁₅ de *S. hispida* a 0,2% (Kruskal-Wallis; p<0,0001, “*” p<0,01 em relação ao tempo inicial, “+” p<0,001 em relação ao tempo inicial, “#” p<0,05 em relação aos 03 dias, “o” p<0,01 em relação aos 03 dias, “x” p<0,05 em relação aos 06 dias).

Os grupos 02, 03 e 04 se comportaram de forma semelhante, com apenas duas regressões significativas.

O grupo 07, apesar de ter apresentado duas regressões, se mostrou similar ao grupo 01 (com apenas uma regressão), pois a diferença entre o tamanho da lesão, nesses dois grupos, só foi significativa a partir do 15º dia.

De acordo com Ferguson *et al.* (2004) os flavonoides têm atividade anti-proliferativa em células tumorais e, devido à essa atividade, eles poderiam retardar a proliferação de células no local da lesão. Esse fator pode ter contribuído para a contração da ferida mais lenta nos animais tratados com a formulação da fração F₁₅.

A formulação da fração F₁₅ apresentou atividade inferior ao gel do extrato bruto etanólico de *S. hispida*, sendo que o extrato bruto auxiliou a regressão da ferida com o início da regressão significativa a partir do 3º dia após a lesão (dados não publicados), demonstrando que a fração obtida não possui os metabólitos secundários do extrato bruto responsáveis pelo fechamento da ferida.

Análise histopatológica

Na análise histopatológica dos animais do tratamento de 3 dias, foi possível observar que os animais de todos os grupos apresentaram hemorragia e neovascularização.

O processo inflamatório foi mais frequente e intenso no grupo tratado com a formulação da fração de *S. hispida*, diferindo do grupo controle sem contaminação e do grupo tratado com o gel Carbopol. Como o processo inflamatório ocorre normalmente durante um período de três dias (Tazima *et al.*, 2008), a inflamação presente nos animais tratados com a formulação da fração, nesse período de tratamento, não interferiu negativamente no processo cicatricial.

Os animais tratados com a formulação da fração F₁₅ de *S. hispida* a 0,2% se destacaram quanto à epitelização, apresentando maior área com epitélio em formação do que todos os grupos, o que cooperou com a rapidez do processo de fechamento da ferida.

Os parâmetros avaliados nos grupos do tratamento de 21 dias estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Quantificação histopatológica aos 21 dias de tratamento.

Variável	p-valor	
Tamanho da lesão	0,0039	G2 versus G1, p = 0,0008 G2 versus G3, p = 0,0123 G2 versus G7, p = 0,0008
Epitélio	<0,0001	G1 versus G3, p = 0,0123 G1 versus G4, p = 0,0037 G1 versus G7, p = 0,0008 G2 versus G3, p = 0,0123 G2 versus G4, p = 0,0037 G2 versus G7, p = 0,0008 G3 versus G7, p = 0,0008 G4 versus G7, p = 0,0037
Cristas epidérmicas	<0,0001	G1 versus G2, p = 0,0123 G1 versus G3, p = 0,0008 G1 versus G7, p = 0,0008 G2 versus G7, p = 0,0008 G3 versus G7, p = 0,0008 G4 versus G7, p = 0,0037
Anexos	0,3684	-

Teste G de independência, $p < 0,05$. G1 (grupo 01): controle sem contaminação; G2 (grupo 02): controle com contaminação; G3 (grupo 03): tratado com gel carbopol; G4 (grupo 04): tratado com Kollagenase®; G7 (grupo 07): tratado com a formulação da fração F15 de *S. hispida* à 0,2%.

O tamanho da lesão está atrelado à reconstituição original do tecido epitelial, e é baseado no tamanho do sitio de lesão que ainda não apresenta fibras colágenas completamente reorganizadas e epitélio completamente restaurado. Os grupos 01, 03 e 07 apresentaram tamanho de lesão menor que o grupo 02.

Apesar da diminuição no tamanho da lesão ter diferido da regressão da ferida observada macroscopicamente, em que ao final do tratamento de 21 dias, as lesões apresentavam-se semelhantes em todos os grupos, não foi possível atribuir à algum tratamento em específico a capacidade de interferir no tamanho da lesão. Porém, a contaminação e a falta de tratamento dos animais do grupo 02, pode ter influenciado negativamente na reconstituição do epitélio.

Todos os animais com algum tipo de tratamento (sejam o gel Carbopol, a pomada Kollagenase, ou o grupo tratado com a formulação da fração F15 de *S. hispida*) apresentaram um epitélio mais espesso do que os animais dos grupos controle com e sem contaminação.

Assim como observado no tratamento de 3 dias, em que a epitelização estava maior nos animais do grupo tratado com a formulação da fração F15 de *S. hispida* a 0,2%, esse grupo também se destacou no 21º dia de tratamento, pois o epitélio apresentou-se mais espesso que dos animais dos outros grupos. Portanto, o uso da formulação da fração F15 de *S. hispida* a 0,2%, favoreceu o espessamento

do epitélio, tornando a ferida mais resistente a novos rompimentos.

Quanto às cristas epidérmicas, o grupo tratado com a formulação da fração F₁₅ de *S. hispida* a 0,2% apresentou maior presença de cristas que todos os outros grupos. Não foram encontrados relatos na literatura sobre a correlação entre as cristas epidérmicas e a cicatrização. Mas as cristas epidérmicas são projeções da camada da epiderme que tem a função de aumentar a área de contato entre a derme e a epiderme (Junqueira e Carneiro, 2013). Assim, as cristas epidérmicas estariam relacionadas com um epitélio organizado e regenerado.

De acordo com Dipietro e Burns (2003) os anexos sofrem regeneração limitada a partir da fase cicatricial denominada remodelagem, que se inicia em torno de 21 dias após a lesão, entretanto os animais de todos os grupos possuíam anexos.

Em diversos parâmetros a formulação da fração F₁₅ de *S. hispida* a 0,2% foi superior à pomada comercial Kollagenase. Essa pomada, além de ser cicatrizante, possui em sua composição um antimicrobiano de amplo espectro, entretanto ela foi inferior aos flavonoides que compõem a fração F₁₅. A formulação da fração F₁₅ também foi mais eficaz que o extrato bruto etanólico de *S. hispida* nos parâmetros epitélio e cristas epidérmicas (dados não publicados).

A formulação da fração F₁₅ de *S. hispida* a 0,2% foi superior a todos os grupos nos parâmetros de tamanho da lesão, epitélio e cristas epidérmicas, o que contribuiu com a melhora do processo de cicatrização. A composição da fração, uma mistura de flavonoides, poderia ter contribuído pois diversos trabalhos evidenciam que os flavonoides apresentam elevado potencial cicatrizante (D'Acampora *et al.*, 2007; Suntar *et al.*, 2012).

Hayouni *et al.* (2011) observaram que o sequestro de radicais livres e a supressão da peroxidação lipídica do extrato de *Punica granatum* tem correlação com a ação cicatrizante dessa espécie e de acordo com Havsteen (2002), os flavonoides tem a capacidade de sequestrar radicais livres e de suprimir a peroxidação lipídica, o que poderia auxiliar na cicatrização.

A capacidade de atuar como vasodilatador e de reduzir a agregação plaquetária também poderiam contribuir significativamente com o auxílio da cicatrização, além das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória de diversos flavonoides, já que a inflamação e as infecções retardam o processo de cicatrização (Havsteen, 2002).

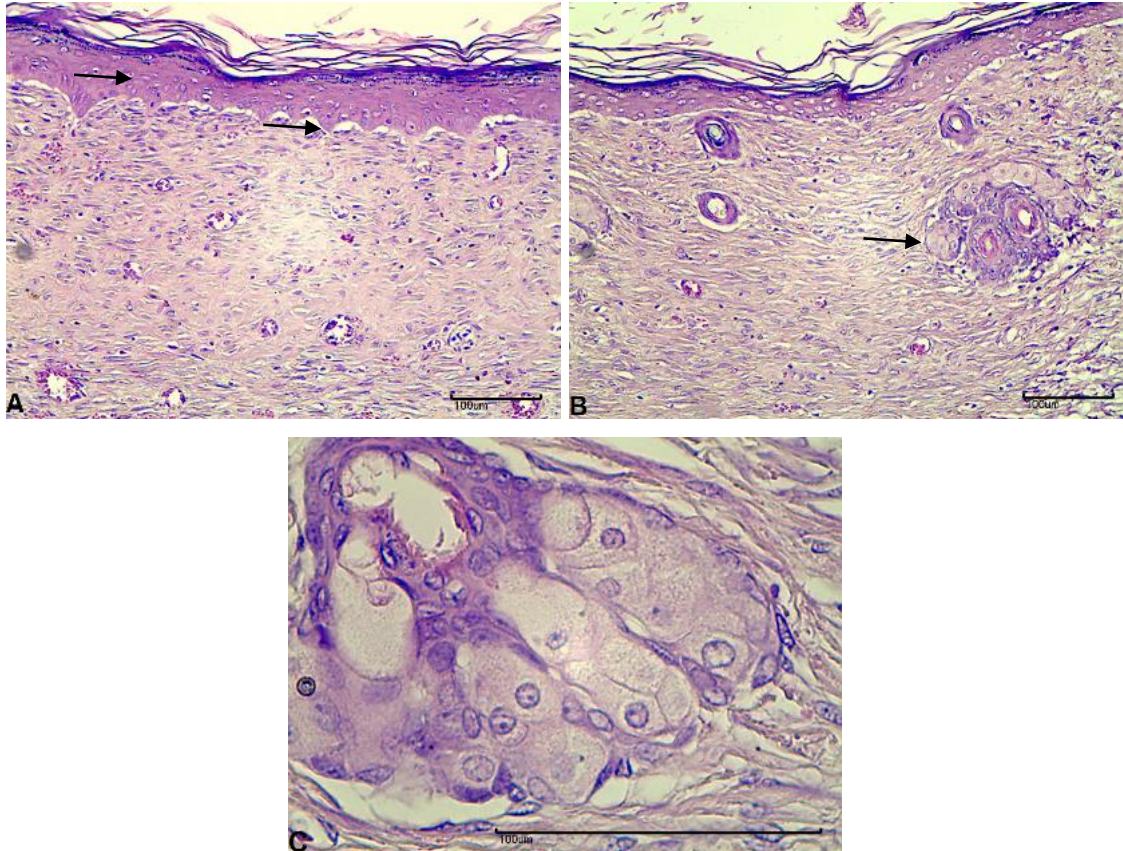


Figura 4. Imagens representado o processo cicatricial para o tratamento de 21 dias do grupo 07 - formulação da fração F₁₅ de *S. hispida* a 0,2%. A – setas indicando o epitélio espesso e a presença de cristas epidérmicas. Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento de 100x. Barra de 100 µm. B – seta indicando a presença de anexos. HE. Aumento de 100x. Barra de 100 µm. C – imagem evidenciando a formação de glândula sebácea. HE. Aumento de 400x. Barra de 100 µm.

A quantificação de fibras colágenas pode indicar como está o processo de cicatrização, devido a sua capacidade de direcionar a migração do epitélio (Hedlund, 2007), além de ter função estrutural (Gelse *et al.*, 2003). Os tipos de colágenos mais frequentes na pele são o colágeno fibrilar tipo III que possui fibras finas e está presente no início do processo cicatrização, e é substituído, durante esse processo, pelas fibras de colágeno do tipo I, que são mais longas e grossas (Hosgood, 2006).

Os animais de todos os grupos se comportaram de modo semelhante na camada papilar e reticular quanto à espessura e quantidade de fibras colágenas nos tratamentos de 3 e 21 dias, apresentando maior quantidade de fibras colágenas espessas do que finas, o que caracteriza a maturação da ferida (Hedlund, 2007).

Com 03 dias de tratamento, as fibras colágenas apresentavam-se mais desorganizadas nos grupos 01, 02, 03 e 04 e mais e organizadas no grupo 07, já com 21 dias a organização das fibras colágenas estavam semelhantes em todos os grupos (Figura 5).

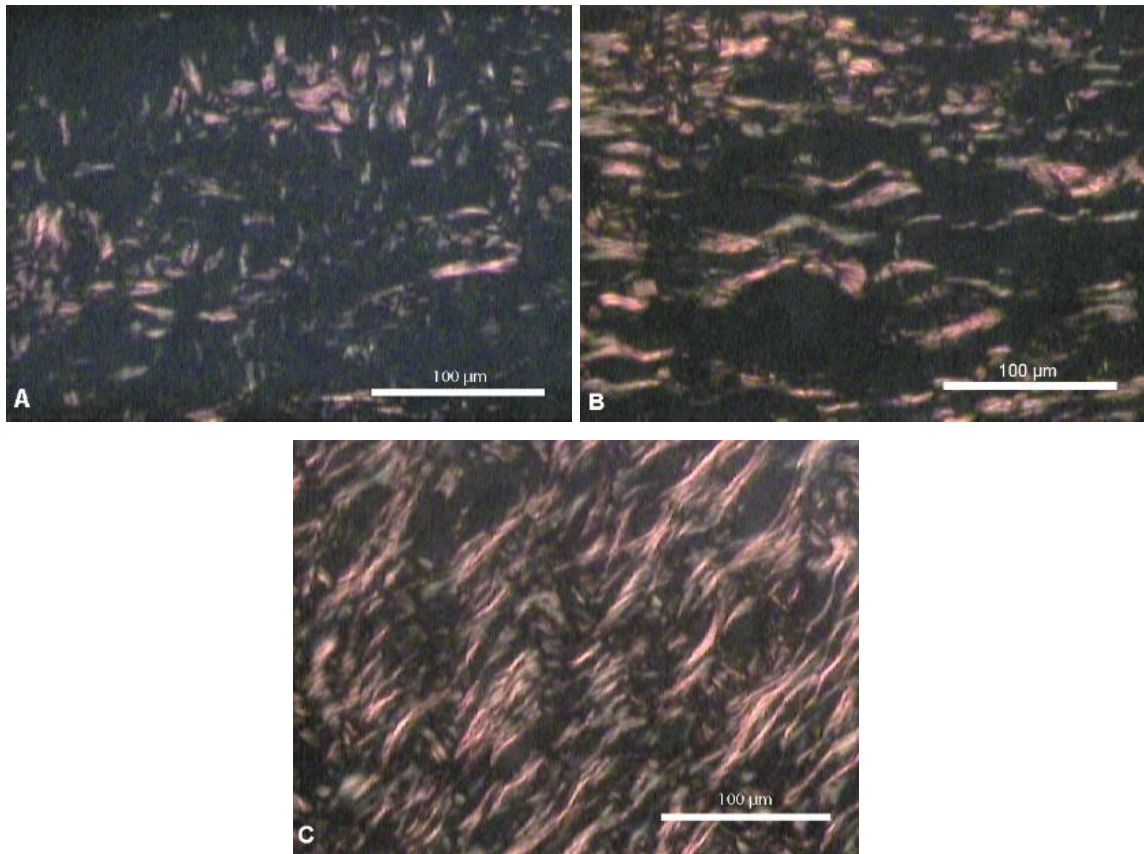


Figura 5. Imagem das lâminas coradas com Picrosirius-hematoxilina (PH). A - fibras colágenas desorganizadas nos grupos 01 - controle sem contaminação, 02 - controle com contaminação, 03 - gel carbopol e 04 - pomada Kollagenase, no tratamento de 3 dias. B - fibras colágenas organizadas do grupo 07 - formulação da fração F₁₅ de *S. hispidus* à 0,2%, no tratamento de 3 dias. C - fibras colágenas organizadas no tratamento de 21 dias de todos os grupos. Aumento de 200x. Barra de 100 µm.

Os animais tratados com a formulação da fração F₁₅ de *S. hispidus* à 0,2% não apresentaram diferença significativa na quantidade de fibras de colágeno. Pode ser devido aos flavonoides apresentarem atividade anti-proliferativa de células (Ferguson *et al.*, 2004), o que influenciaria na proliferação de fibroblastos, que são os responsáveis pela renovação de colágeno no local da lesão.

Apesar dessa atividade anti-proliferativa, os flavonoides têm outras atividades que contribuem para a melhora do processo cicatricial, como o sequestro de radicais livres e a supressão da peroxidação lipídica (Havsteen, 2002).

A atividade antibacteriana observada com a fração F₁₅ também contribui com a melhora da cicatrização das feridas, pois reduz o risco de infecção.

Conclusão

A fração F₁₅ inibiu o crescimento da bactéria *S. aureus* sensível e resistente à meticilina e com a cepa resistente essa atividade foi significativamente superior ao

controle positivo utilizado. A formulação da fração F₁₅ de *S. hispida* a 0,2% tem ação cicatrizante sobre feridas contaminadas por *S. aureus* resistente à metilina, sendo mais eficaz que a pomada comercial Kollagenase. Essas atividades são atribuídas à composição da fração, que é uma mistura de flavonoides.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas (INAU), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo suporte financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

Referências

- Abbas, A.K., Kumar, V., Fausto, N. 2010. Tecido de renovação e reparação: regeneração, cicatrização e fibrose. In: Abbas AK, Kumar V, Fausto N. (Eds.), Patologia: bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro, Elsevier, pp. 91-124.
- Alves, D.F.S., Cabral-Junior, F.C., Cabral, P.P.A.C., Oliveira-Junior, R.M., Rego, A.C.M., Medeiros, A.C., 2008. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. Rev. Col. Bras. Cir. 35, 188-193.
- Arima, H., Ashida, H., Danno, G., 2002. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66, 1009-1014.
- Branco, A., Pizzolatti, M.G., 2002. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sebastiania argutidens* (EUPHORBIACEAE). Quím. Nova 25, 15-19.
- Batista, L.L.V., Campesatto, E.A., Assis, M.L.B., Barbosa, A.P.F., Grillo, L.A.M., Dornelas, C.B., 2012. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. Rev. Col. Bras. Cir. 39, 515-520.
- Cardoso, E.L., Crispim, S.M.A., Rodrigues, C.A.G., Barioni J.W., 2000. Composição e dinâmica da biomassa aérea após a queima em savana gramíneo-lenhosa no Pantanal. Pesqui. Agropec. Bras. 35, 2309-2316.

- D'Acampora, A.J., Tramonte, R., Burger, D., Burger, P.J., 2007. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. *ACM Arq. Catarin. Med.* 36, 69-75.
- Dipietro, L.A., Burns, A.L., 2003. *Wound healing. Methods and protocols.* New Jersey, Humana Press.
- Eom, S.H., Jung, Y.J., Lee, D.S., Yim, M.J., Kim, H.S., Lee, S.H., Myeong, J.I., Lee, J., Kim, H.W., Kim, K.H., Lee, M.S., Kim, Y.M., 2016. Studies on antimicrobial activity of *Poncirus trifoliata* ethyl extract fraction against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and to elucidate its antibacterial mechanism. *J. Environ. Biol.* 37, 129-134.
- Ferguson, P., Kurowska, E., Freeman, D., Chambers, A., Koropatnick, D., 2004. A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell line. *J. Nutr.* 134, 1529–1535.
- Flecknell, P., 2009. Examples of dilutions of anaesthetic mixtures for small rodents. In: Flecknell, P. (Ed.), *Laboratory animal anesthesia.* New York, Academic Press, pp. 283-286.
- Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T., 2003. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Ver.* 55, 1531-1546.
- Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96, 67-202.
- Hayouni, E.A., Miled, K., Boubaker, S., Bellasfar, Z., Abedrabba, M., Iwaski, H., Oku, H., Matsui, T., Limam, F., Hamdi, M., 2011. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds. *Phytomedicine* 18, 976– 984.
- Hedlund, C.S., 2007. Surgery of the integumentary system. In: Fossum, T.W. (Eds.), *Small animal surgery.* Missouri, Mosby Elsevier, pp. 161-259.
- Honda, N.K., Garcez, W.S., Garcez, F.R., Conceição, C.A., 1990. Estudo químico de plantas de Mato Grosso do Sul I: triagem fitoquímica. *Revista Científica e Cultural UFMS* 5, 37-46.
- Hosgood, G., 2006. Stages of Wound Healing and Their Clinical Relevance. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 36, 667-685.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2013. *Histologia básica.* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

- Kopp, B.J., Nix, D.E., Armstrong, E.P., 2004. Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Ann. Pharmacother.* 38, 1377-1382.
- Matos, J.F.A., 2009. Introdução a Fitoquímica Experimental. Fortaleza, UFC.
- Peixoto Sobrinho, T.J.S., Silva, C.H.T.P., Nascimento, J.E., Monteiro, J.M., Albuquerque, U.P., Amorim, E.L.C., 2008. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 44, 683-689.
- Pott A, Abdon MM, Silva JSV, Sobrinho AAB, Pott VJ, editors. Dinâmica da flora na planície de inundação do baixo Taquari, Pantanal, MS. III Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal: os Desafios do Novo Milênio; 2000 Nov 27-30; Corumbá, MS. 2000.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbil.* 56, 3-12.
- Rizzi, E.S., Dourado, D.M., Matias, R., Muller, J.A.I., Guerrero, A.T.G., Guilhermino, J.F., Moreira, D.L., Silva, B.A.K., Barbosa-Ferreira, M., 2015. Wound-healing potential of *Sebastiania hispida* (Mart.) Pax (Euphorbiaceae) ointment compared to low power laser in rats. *Braz. J. Biol.*, no prelo.
- Sousa, C.M.M.S., Silva, H.R., Veiera-Jr, G.M., Ayres, M.C.C., Charlylton, L.S.C., Delton, S.A., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araujo, P.B.M., Brandrão, M.S., Chaves, M.H., 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím. Nova* 30, 351-355.
- Suntar, I., Akkol, E.K., Keles, H., Yesilada, E., Sarker, S.D., Arroo, R., Baykal, T., 2012. Efficacy of *Daphne oleoides* subsp. *kurdica* used for wound healing: Identification of active compounds through bioassay guided isolation technique. *J. Ethnopharmacol.* 141, 1058-1070.
- Tazima, M.F.G.S., Vicente, Y.A.M.V.A., Moriya, T., 2008. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina (Ribeirão Preto)* 41, 259-264.
- Wagner, H., Bladt, S., 2009. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Berlin, Springer.
- Xu, H.X., Lee, S.F., 2001. Activity of Plant Flavonoids Against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Phytother. Res.* 15, 39-43.

6 CONCLUSÃO

Os géis do extrato etanólico das partes aéreas de *S. hispida* e da fração F₁₅ podem ser utilizados no tratamento de feridas contaminadas por *S. aureus* resistente à metilicina, pois foram mais eficazes que a pomada comercial Kollagenase. A fração F₁₅ foi a que apresentou melhores resultados no combate à infecção e no auxílio do processo de cicatrização. E, para futuros trabalhos, sugere-se uma formulação empregando os extratos e a fração na área de nanotecnologia utilizando o enriquecimento, por exemplo, com o ácido ferúlico, um composto fenólico que ativa a produção de colágeno.

APÊNDICE I

Dados obtidos da coluna cromatográfica clássica da fração acetato de etila

Código	Frações reunidas	Eluente	Massa (mg)
C1.1	F ₁₋₂	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 50%	32,2
C1.2	F ₃₋₁₇	Hexano/CH ₂ Cl ₂ 80%	538,4
C1.3	F ₁₈	CH ₂ Cl ₂ /CHCl ₃ 30%	19,6
C1.4	F ₁₉₋₂₇	CH ₂ Cl ₂ /CHCl ₃ 70%	1105,4
C1.5	F ₂₈₋₃₃	CHCl ₃ /AcOEt 30%	435,7
C1.6	F ₃₄₋₃₆	CHCl ₃ /AcOEt 30%	259,3
C1.7	F ₃₇₋₄₁	CHCl ₃ /AcOEt 50%	443,1
C1.8	F ₄₂₋₅₀	CHCl ₃ /AcOEt 60%	766,4
C1.9	F ₅₁₋₅₄	CHCl ₃ /AcOEt 80%	257,3
C1.10	F ₅₅₋₆₀	CHCl ₃ /AcOEt 90%	463,8
C1.11	F ₆₁	CHCl ₃ /AcOEt 95%	244
C1.12	F ₆₂	CHCl ₃ /AcOEt 95%	188,7
C1.13	F ₆₃₋₆₅	CHCl ₃ /AcOEt 95%	405,4
C1.14	F ₆₆₋₆₈	AcOEt	138,1
C1.15	F ₆₉	AcOEt/MeOH 20%	9,4
C1.16	F ₇₀₋₇₁	AcOEt/MeOH 20%	2069,7
C1.17	F ₇₂₋₇₃	AcOEt/MeOH 20%	241,7
C1.18	F ₇₄	AcOEt/MeOH 40%	112,6
C1.19	F ₇₅₋₇₇	AcOEt/MeOH 50%	436,9
C1.20	F ₇₈	AcOEt/MeOH 60%	175,5
C1.21	F ₇₉₋₈₀	AcOEt/MeOH 70%	211,7
C1.22	F ₈₁₋₈₂	AcOEt/MeOH 80%	210,8
C1.23	F ₈₃	AcOEt/MeOH 90%	102,2
C1.24	F ₈₄₋₈₈	AcOEt/MeOH 90%	320,7
C1.25	F ₈₉₋₉₄	MeOH	223,7
C1.26	F ₉₅₋₉₉	MeOH/H ₂ O 20%	114,6
C1.27	F ₁₀₀₋₁₀₁	MeOH/H ₂ O 20%	56,8

APÊNDICE II

Dados obtidos da coluna cromatográfica da fração F₇₀₋₇₁ (C_{1.16})

Código	Frações reunidas	Eluente	Massa (mg)
C _{2.1}	F ₁₋₇₀	Hexano, CH ₂ Cl ₂ , CHCl ₃	24,1
C _{2.2}	F ₇₁₋₉₃	CHCl ₃ /AcOEt 40%	20,9
C _{2.3}	F ₉₄₋₁₀₄	CHCl ₃ /AcOEt 45%	24,6
C _{2.4}	F ₁₀₅₋₁₁₉	CHCl ₃ /AcOEt 50%	25,4
C _{2.5}	F ₁₂₀₋₁₃₃	CHCl ₃ /AcOEt 60%	15,9
C _{2.6}	F ₁₃₄₋₁₃₈	CHCl ₃ /AcOEt 65%	16,2
C _{2.7}	F ₁₃₉₋₁₅₀	CHCl ₃ /AcOEt 70%	31,6
C _{2.8}	F ₁₅₁₋₁₅₄	CHCl ₃ /AcOEt 75%	31,7
C _{2.9}	F ₁₅₅₋₁₅₆	CHCl ₃ /AcOEt 75%	8,1
C _{2.10}	F ₁₅₇₋₁₆₀	CHCl ₃ /AcOEt 80%	37,5
C _{2.11}	F ₁₆₁₋₁₆₄	CHCl ₃ /AcOEt 90%	18
C _{2.12}	F ₁₆₅₋₁₇₃	AcOEt	125,2
C _{2.13}	F ₁₇₄₋₁₇₆	AcOEt/MeOH 2,5%	52,9
C _{2.14}	F ₁₇₇₋₁₇₈	AcOEt/MeOH 5%	40,7
C _{2.15}	F ₁₇₉₋₁₈₈	AcOEt/MeOH 12,5%	472,4
C _{2.16}	F ₁₈₉	AcOEt/MeOH 10%	43,7
C _{2.17}	F ₁₉₀₋₁₉₁	AcOEt/MeOH 12,5%	59,8
C _{2.18}	F ₁₉₂₋₁₉₄	AcOEt/MeOH 15%	54,8
C _{2.19}	F ₁₉₅₋₁₉₆	AcOEt/MeOH 17,5%	17,9
C _{2.20}	F ₁₉₇	AcOEt/MeOH 20%	29,7
C _{2.21}	F ₁₉₈₋₁₉₉	AcOEt/MeOH 22,5%	50,7
C _{2.22}	F ₂₀₀₋₂₀₂	AcOEt/MeOH 25%	47,2
C _{2.23}	F ₂₀₃₋₂₀₅	AcOEt/MeOH 27,5%	60,8
C _{2.24}	F ₂₀₆₋₂₁₅	AcOEt/MeOH 30%	245,8
C _{2.25}	F ₂₁₆₋₂₂₆	AcOEt/MeOH 35%	159,5
C _{2.26}	F ₂₂₇₋₂₃₃	AcOEt/MeOH 40%	63,9
C _{2.27}	F ₂₃₄₋₂₃₅	AcOEt/MeOH 45%	41,6
C _{2.28}	F ₂₃₆₋₂₄₁	AcOEt/MeOH 50%	130,3
C _{2.29}	F ₂₄₂₋₂₄₄	AcOEt/MeOH 55%	32,5
C _{2.30}	F ₂₄₅₋₂₄₈	AcOEt/MeOH 60%	10,6
C _{2.31}	F ₂₄₉₋₂₅₀	AcOEt/MeOH 65%	20,1
C _{2.32}	F ₂₅₁₋₂₅₃	AcOEt/MeOH 70%	17,1
C _{2.33}	F ₂₅₄₋₂₅₆	AcOEt/MeOH 75%	26,4
C _{2.34}	F ₂₅₇₋₂₅₈	AcOEt/MeOH 80%	19,4
C _{2.35}	F ₂₅₉₋₂₆₁	AcOEt/MeOH 85%	11,9
C _{2.36}	F ₂₆₂₋₂₆₄	AcOEt/MeOH 90%	7,8
C _{2.37}	F ₂₆₅₋₂₆₆	AcOEt/MeOH 95%	16,6
C _{2.38}	F ₂₆₇₋₂₇₁	MeOH	16,5

APÊNDICE III

Peso inicial e final dos animais do tratamento de 3 dias.

Tratamento de 3 dias			
Grupo	Indivíduo	Peso inicial (gramas)	Peso final (gramas)
G1	1	240	235
G1	2	230	225
G1	3	245	250
G1	4	260	255
G1	5	230	225
G1	6	245	240
G2	1	250	240
G2	2	200	200
G2	3	250	245
G2	4	225	220
G2	5	240	225
G2	6	235	230
G3	1	225	215
G3	2	235	235
G3	3	210	215
G3	4	215	215
G3	5	280	285
G3	6	240	230
G4	1	190	200
G4	2	190	205
G4	3	185	195
G4	4	195	210
G4	5	180	185
G4	6	180	190
G5	1	340	310
G5	2	335	330
G5 – morte	3	315	
G5 – morte	4	275	
G5	5	295	280
G5	6	360	320
G6	1	250	250
G6	2	205	185
G6	3	230	225
G6	4	230	230
G6	5	225	220
G6	6	235	225
G7	1	230	220
G7	2	220	215
G7	3	230	220
G7	4	255	250
G7	5	225	220
G7	6	245	240

APÊNDICE IV

Peso inicial e final dos animais do tratamento de 21 dias.

Tratamento de 21 dias			
Grupo	Indivíduo	Peso inicial (gramas)	Peso final (gramas)
G1	1	210	265
G1	2	215	265
G1	3	215	270
G1	4	260	310
G1	5	210	250
G1	6	205	240
G2	1	225	265
G2	2	205	230
G2	3	210	245
G2	4	205	245
G2	5	205	265
G2	6	205	245
G3	1	205	275
G3	2	225	280
G3	3	185	225
G3	4	190	240
G3	5	220	300
G3	6	210	255
G4	1	180	215
G4	2	245	280
G4	3	190	255
G4	4	170	230
G4	5	210	265
G4	6	185	245
G5	1	180	240
G5	2	210	280
G5	3	155	220
G5	4	170	215
G5	5	200	240
G5	6	205	265
G6	1	190	255
G6	2	240	300
G6	3	185	245
G6	4	225	285
G6	5	215	270
G6	6	215	285
G7	1	230	290
G7	2	235	300
G7	3	205	260
G7	4	225	290
G7	5	225	280
G7	6	215	250

APÊNDICE V

Análise histopatológica dos animais dos grupos do tratamento de 3 dias

3 dias HE – todos com crosta					
Ratos/ grupo	Hemorragia	Processo inflamatório	Neovascularização	Epitelização	Outros
G1 Δ1	+++	0	+++	+	
G1 Δ2	+++	0	+++	+	
G1 Δ3	0	0	+	+	
G1 Δ4	+++	+	+++	+	
G1 Δ5	+	0	+++	+	
G1 Δ6	+	+	+++	0	
G2 Δ1	+	0	++	+	granuloma
G2 Δ2	+	0	+	+	
G2 Δ3	++	+	+++	+	
G2 Δ4	+++	+	+++	+	
G2 Δ5	+++	0	++	+	
G2 Δ6	+	++	+	+	
G3 Δ1	++	++	+++	+	
G3 Δ2	++	+++	++	+	
G3 Δ3	++	++	++	+	
G3 Δ4	+++	+++	+++	+	
G3 Δ5	+++	+++	++	+	granuloma
G3 Δ6	++	+++	+++	+	
G4 Δ1	++	++	+++	+	
G4 Δ2	++	++	++	+	
G4 Δ3	+	++	++	+	
G4 Δ4	+	+	++	+	
G4 Δ5	+	+++	+++	+	
G4 Δ6	++	++	++	+	
G5 Δ1	+	+++	++	++	
G5 Δ2	++	++	++	++	
G5 Δ3 - morte	-	-	-	-	
G5 Δ4 – morte	-	-	-	-	
G5 Δ5	+	+	++	++	
G5 Δ6	++	+++	+++	+	
G6 Δ1	+	++	+	+	
G6 Δ2	++	+	+	+	
G6 Δ3	++	++	+++	++	
G6 Δ4	++	+++	++	++	
G6 Δ5	+	+	++	+	
G6 Δ6	+	+++	+	++	
G7 Δ1	++	++	+	+++	
G7 Δ2	++	++	++	+++	
G7 Δ3	+	++	++	+++	
G7 Δ4	++	+	++	+++	
G7 Δ5	++	++	++	+++	
G7 Δ6	+	++	++	+++	

APÊNDICE VI

Análise histopatológica dos animais dos grupos do tratamento de 21 dias

21 dias HE					
Ratos/ grupo	Epitélio	Anexos	Cristas epidérmicas	Tamanho da lesão	Outros
G1 Δ1	++	+	+	+	
G1 Δ2	++	++	+	+	
G1 Δ3	++	+	+	+	
G1 Δ4	++	+	+	+	
G1 Δ5	++	+	+	+	
G1 Δ6	++	+	+	+	
G2 Δ1	+	0	0	+++	Leito capilar intenso
G2 Δ2	+	0	0	+++	Leito capilar leve e crosta, devido à machucado causado pelo próprio animal e com processo inflamatório
G2 Δ3	+	0	0	+++	Leito capilar leve
G2 Δ4	+	+	+	+++	Leito capilar leve
G2 Δ5	+	++	0	+++	Leito capilar leve
G2 Δ6	+	++	0	+++	Leito capilar leve e processo inflamatório focal
G3 Δ1	++	+	0	+++	Leito capilar leve
G3 Δ2	++	+	0	++	Leito capilar leve e processo inflamatório focal
G3 Δ3	++	0	0	++	Leito capilar moderado
G3 Δ4	+	0	0	+	Leito capilar intenso
G3 Δ5	++	0	0	+	Leito capilar leve
G3 Δ6	++	0	0	+	Leito capilar leve
G4 Δ1	++	0	0	+++	Leito capilar leve e hemorragia moderada, em dois pontos
G4 Δ2	++	+	0	+++	
G4 Δ3	++	+	0	+	hemorragia moderada
G4 Δ4	++	0	+	+++	hemorragia moderada
G4 Δ5	++	0	0	+	
G4 Δ6	++	++	0	+	
G5 Δ1	++	+	+	+++	Focos hemorrágicos moderados
G5 Δ2	+	++	+	+	Processo inflamatório e hemorrágico
G5 Δ3	++	0	+	+++	Hemorragia intensa
G5 Δ4	++	+	+	+	Processo inflamatório focal
G5 Δ5	++	0	+	+	Processo inflamatório focal
G5 Δ6	++	0	+	++	Processo inflamatório focal
G6 Δ1	++	0	+	+	
G6 Δ2	++	+	+	+	
G6 Δ3	++	+	+	++	Processo inflamatório focal
G6 Δ4	+	0	0	+	Processo inflamatório focal
G6 Δ5	++	0	+	+	Hemorragia e processo inflamatório focal
G6 Δ6	++	+	+	+	
G7 Δ1	+++	0	++	+	
G7 Δ2	+++	0	++	+	
G7 Δ3	+++	0	++	+	
G7 Δ4	+++	+	++	+	
G7 Δ5	+++	++	++	+	
G7 Δ6	+++	++	++	+	