

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**GUILHERME ARCARO**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MEMBRANAS  
POLIMÉRICAS RETICULADAS CONTENDO MUCILAGEM DE *Ocotea puberula*  
(Rich.) Ness (CANELA-GUAICÁ) NO TRATAMENTO DE FERIDAS**

**PONTA GROSSA  
2023**

**GUILHERME ARCARO**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MEMBRANAS  
POLIMÉRICAS RETICULADAS CONTENDO MUCILAGEM DE *Ocotea puberula*  
(Rich.) Ness (CANELA-GUAICÁ) NO TRATAMENTO DE FERIDAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito para obtenção do título de Doutor.

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Dagmar Gaspar da Rocha

**PONTA GROSSA  
2023**

A66                      Arcaro, Guilherme  
Desenvolvimento, caracterização e avaliação de membranas poliméricas reticuladas contendo mucilagem de *Ocotea puberula* (Rich.) Ness (canela-guaicá) no tratamento de feridas / Guilherme Arcaro. Ponta Grossa, 2023. 102 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Dagmar da Rocha Gaspar.

1. Cicatrização de feridas. 2. Fitoterapia. 3. Mucilagem vegetal. 4. Membrana reticulada. 5. *Ocotea puberula*. I. Farago, Paulo Vitor. II. Gaspar, Maria Dagmar da Rocha. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD:

## FOLHA DE APROVAÇÃO

|                                                                                   |                                                                                                                                                                        |                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <b>PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS</b><br>Associação Ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 01/2023 DO DOUTORANDO GUILHERME ARCARO, REALIZADA NO DIA 14 DE FEVEREIRO DE 2023, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos catorze dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e três, às 14h30, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão aberta, por videoconferência (<https://meet.google.com/igw-fjnt-knq>), sob a presidência do Professor Doutor Paulo Vitor Farago, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas do doutorando GUILHERME ARCARO, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pelo Professor Doutor PAULO VITOR FARAGO (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): ELIANE APARECIDA CAMPESATTO (UFAL/AL); BRUNO RODRIGO MINOZZO (UNICESUMAR/PR); SANDRA MARIA BASTOS PIRES (UEPG/PR); e JANE MANFRON BUDEL (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição. O título do trabalho foi: "DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS RETICULADAS CONTENDO MUCILAGEM DE *Ocotea puberula* RICH. NESS NO TRATAMENTO DE FERIDAS". Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADA a Tese, considerada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da Dissertação de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): \_\_\_\_\_

Alteração de título: sim X não ☐

Novo título: "DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS RETICULADAS CONTENDO MUCILAGEM DE *Ocotea puberula* (Rich.) Ness (CANELA-GUAICA) NO TRATAMENTO DE FERIDAS".



PAULO VITOR FARAGO (UEPG/PR)  
Presidente

 Documento assinado digitalmente  
ELIANE APARECIDA CAMPESATTO  
Data: 2023.02.14 15:05:00  
CPF: 024.719.713-20 (assinado por 11.04)

ELIANE APARECIDA CAMPESATTO  
(UFAL/AL)  
Titular



SANDRA MARIA BASTOS PIRES  
(UEPG/PR)  
Titular



BRUNO RODRIGO MINOZZO  
(UNICESUMAR/PR)  
Titular



JANE MANFRON BUDEL  
(UEPG/PR)  
Titular



A educação sempre teve papel crucial na minha vida. Desde pequeno ouvia, pelas sábias palavras do meu pai, que só através dela eu seria capaz de alcançar meus maiores sonhos e objetivos. Hoje, realizo um deles. Dedico esse doutorado a todos que acreditam que só a educação é o caminho. Escolheu-se entrar nesse desafio foi para propagar a ideia e os valores que só a educação é capaz de trazer. Não poderia ser mais grato a algo que modificou substancialmente minha vida. Essa tese de doutorado é a prova de que nenhum sonho é inalcançável e de que só a educação cria pontes indestrutíveis.

## AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta Tese, foi utilizar apenas esta página para agradecer as pessoas que fizeram parte desta minha trajetória nesta caminhada de Doutorado na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Início os agradecimentos por minha família, que sempre primaram pela minha Educação. Obrigado pai Sérgio Arcaro (*in memorian*) e Mãe Ilse Elda Arcaro por, além de me oferecerem a oportunidade de estudar, sempre estarem presentes, físico ou espiritualmente, e sou muito feliz por isso.

Uma vez dentro da Universidade, algumas pessoas me convenceram a continuar os estudos após a graduação e pós-graduações, mostrando-me a nobre função da pesquisa: produzir novos conhecimentos. Maria Dagmar Gaspar da Rocha, minha coorientadora, foi uma dessas pessoas, uma pesquisadora personificada, sempre me induzindo a pensar criticamente. Obrigado.

Tenho que agradecer ao Professor, Orientador e sempre Amigo, Paulo Vitor Farago, por sempre acreditar que minha experiência como enfermeiro deveria ser submetida à Ciência. Obrigado pelas constantes demonstrações de sabedoria e humildade. Não posso deixar de agradecer também outros grandes incentivadores, que marcaram importante presença em minha vida acadêmica. Obrigado Prof. Leandro Cavalcante Lipinski, Prof. Luiz Antonio Pinheiro e Prof<sup>a</sup>. Jane Manfrom. Estendo meus agradecimentos aos funcionários do Biotério do SEBISA-UEPG, bem como aos companheiros de Laboratório, em especial: Adriana e Bruna, Estedo a todos demais amigos que estiveram comigo nesta caminhada. Obrigado pela prontidão e ensinamentos.

Agradeço a DEUS por poder citar todas estas pessoas neste momento tão importante. Obrigado por colocá-las tão caprichosamente em minha vida.

Meu agradecimento mais profundo só poderia ser dedicado a uma pessoa: minha esposa. O tempo todo ao meu lado, incondicionalmente. Nos momentos mais difíceis, que não foram raros nestes últimos anos, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Sou grato por cada gesto carinhoso, cada sorriso, e por poder estar ao seu lado, com nossas filhas Júlia e Laura. Obrigado Larissa, meu AMOR.

*Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem 'Por quê?' Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo 'Por que não?' "(Geroge Bernard Shaw)*

*"Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino".  
(Leonardo da Vinci)*

## RESUMO

**Introdução:** As feridas e lesões de pele são um desafio para os profissionais de saúde, que buscam dia-a-dia novas alternativas para o tratamento dessas afecções. O uso popular de plantas denota a antiguidade e a utilização de fitoterápicos vem crescendo vertiginosamente em pesquisas, assim como a procura por associações, como utilização de biopolímeros com propriedades de adesividade, liberação controlada e proteção ao leito da ferida. **Objetivo:** Desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia da aplicação de membranas reticuladas com mucilagem de *Ocotea puberula* na cicatrização de feridas. **Método:** Obtenção do extrato hidroalcoólico das cascas de *O. puberula* (EHOP), formulação de membranas reticuladas de carboximetilcelulose (CMC) ou acetato de polivinila (PVA) com EHOP; avaliação de interação dos biopolímeros com o EHOP por Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), ensaios de tração e esterilidade, testes *in vivo* de cicatrização por modelo experimental em ratos, avaliação histológica de fragmentos das lesões após 7, 14 e 21 dias de tratamento e ensaios bioquímicos de nefro e hepatotoxicidade. **Resultados:** Foi observada a formação de membranas transparentes, maleáveis e estáveis para aplicação em lesões, onde as membranas de CMC acrescidas do EHOP potencializaram suas propriedades mecânicas, em comparação ao PVA com mesmo extrato. As membranas de CMC obtiveram melhor índice de cicatrização das lesões nos ensaios animais, assim como angiogênese e colagênese. Ambas as formulações demonstraram segurança quanto à hepato e nefrotoxicidade na aplicação tópica. **Conclusão:** A utilização de membranas reticuladas de CMC com EHOP demonstraram uma opção promissora no tratamento de lesões exsudativas, vislumbrando uma nova estratégia de manejo de feridas na prática assistencial.

**Palavras-chave:** cicatrização de feridas, fitoterapia, biopolímeros, mucilagem vegetal, membrana reticulada, *Ocotea puberula*.

## ABSTRACT

**Introduction:** Wounds and skin ulcers are a challenge to health professionals, seeking each day new strategies for the wound therapy. The use of phytotherapeutic drugs has been increasing steeply in research, as well as the pursuit of associations, like the use of biopolymers with properties of adhesiveness, controlled release and protection to the wound site. **Objective:** Develop, characterize and evaluate the effectiveness of cross-linked membranes with mucilage from *Ocotea puberula* in wound healing. **Method:** formulation of reticulated membranes with carboxymethylcellulose (CMC) and polyvinyl alcohol (PVA) with the mucilage extract of *Ocotea puberula* bark through hydroalcoholic extraction (EHOP); evaluation of compounds interaction with the EHOP by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), in vivo healing tests by experimental model in rats, histological evaluation of lesion fragments after 7, 14 and 21 days of injury and treatment and biochemical tests of nephro and hepatotoxicity. **Results:** It was observed the formation of transparent, malleable and stable membranes for applying in lesions, whereas CMC membranes increased by EHOP potentiated their mechanical properties, compared to PVA with the same extract. The CMC membranes showed better wound healing index in animal tests, as well as angiogenesis and collagenesis. Both formulations demonstrated safety regarding hepato- and nephrotoxicity in topical application. **Conclusion:** the use of cross-linked CMC membranes with EHOP showed a promising option in the treatment of exudative lesions, envisioning a new strategy for wound management in healthcare practice.

**Key words:** wound healing, phytotherapy, biopolymers, plant mucilage, cross-linked membrane, *Ocotea puberula*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 - Exemplar da canela-guaicá na Região dos Campos Gerais (flora do Campus da Universidade Estadual de Ponta Grossa) .....                        | 25 |
| FIGURA 2 - Locais de ocorrência natural da canela-guaicá .....                                                                                           | 27 |
| FIGURA 3 - Equipamento de ensaio de Tração SHIMADZU AG-1 .....                                                                                           | 36 |
| FIGURA 4 - Corte e corpo de prova para ensaio de tração (50 mm e espessuras variadas).....                                                               | 37 |
| FIGURA 5 - Manipulação Animal (rato Wistar) para o preparo da lesão incisional no dorso do animal .....                                                  | 42 |
| FIGURA 6 - Aspecto Visual da extração Hidroalcoólica da mucilagem da casca de <i>Ocotea puberula</i> .....                                               | 44 |
| FIGURA 7 - Modelos de Membrana de PVA e CMC .....                                                                                                        | 45 |
| QUADRO 1 - FTIR CMC Membrana pura e incorporada com EHOP .....                                                                                           | 46 |
| QUADRO 2 - FTIR PVA Membrana pura e incorporada com EHOP .....                                                                                           | 47 |
| GRÁFICO 1 - Representação gráfica da diferença entre os grupos de tensão máxima na ruptura, alongação na ruptura e Módulo de Young ou Elasticidade ..... | 48 |
| FIGURA 8 - Imagem de placas e meio de cultura de fimes de CMC e PVA com e sem EHOP .....                                                                 | 49 |
| GRÁFICO 2 - Índice de Cicatrização das lesões (ICL) dos grupos experimentais após 7 dias de tratamento .....                                             | 50 |
| GRÁFICO 3 - Índice de Cicatrização das lesões (ICL) dos grupos experimentais após 14 dias de tratamento .....                                            | 51 |
| GRÁFICO 4 - Índice de Cicatrização das lesões (ICL) dos grupos experimentais após 21 dias de tratamento .....                                            | 51 |
| FIGURA 9 - Aspecto macroscópico de feridas para grupos experimentais em diferentes intervalos de tempo .....                                             | 52 |
| GRÁFICO 5 - Graduação Histológica de Inflamação após 7, 14 e 21 dias de tratamento .....                                                                 | 53 |
| GRÁFICO 6 - Graduação Histológica de Angiogênese após 7, 14 e 21 dias de tratamento .....                                                                | 54 |
| GRÁFICO 7 - Graduação Histológica de Colagênese após 7, 14 e 21 dias de                                                                                  |    |

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| tratamento .....                                                                                                                        | 55 |
| FIGURA 10 - Aspecto microscópico de feridas para grupos .....                                                                           | 56 |
| GRÁFICO 8 - Análise bioquímica de nefro e hepatotoxicidade de animais tratados com os grupos .....                                      | 58 |
| FIGURA 11 - Estrutura dos alcalóides aporfínicos <i>stricto sensu</i> e de folhas de espécimens adultos de <i>Ocotea puberula</i> ..... | 60 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1 - Escores utilizados para avaliação histológica das lesões .....                                                                                                         | 42 |
| TABELA 2 - Valores de tensão máxima na ruptura ( $\sigma$ ), alongação na ruptura ( $\epsilon$ ) e Módulo de Young (E) obtidos no ensaio de tração para os filmes de CMC e PVA .. | 48 |
| TABELA 3 - Índice de cicatrização das lesões (ILC) em 7, 14 e 21 dias.....                                                                                                        | 50 |
| TABELA 4 - Análise histológica de inflamação.....                                                                                                                                 | 53 |
| TABELA 5 - Análise histológica de angiogênese .....                                                                                                                               | 54 |
| TABELA 6 - Análise histológica de colagênese.....                                                                                                                                 | 55 |
| TABELA 7 - Avaliação bioquímica dos grupos em Nefro e Hepatotoxicidade.....                                                                                                       | 57 |



## LISTA DE SIGLAS

|      |                                                             |
|------|-------------------------------------------------------------|
| CMC  | Carboximetilcelulose                                        |
| PVA  | Acetato de polivinila                                       |
| EHOP | Extrato hidroalcoólico das cascas de <i>Ocotea puberula</i> |
| FTIR | Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier |
| UV   | Ultravioleta                                                |
| °C   | Graus Celsius                                               |
| pH   | Potencial hidrogeniônico                                    |
| HCl  | Ácido clorídrico                                            |
| %    | Percentual                                                  |
| mL   | Mililitros                                                  |
| g/mL | Gramas por mililitros                                       |
| Pct  | Pacote                                                      |
| cm   | Centímetros                                                 |
| PP   | Polipropileno                                               |
| UEPG | Universidade Estadual de Ponta Grossa                       |
| i.p. | Intraperitoneal                                             |
| SF   | Solução Fisiológica 0,9%                                    |
| DPO  | Dia do pós-operatório                                       |
| TGO  | Transaminase glutâmico-oxalacética                          |
| TGP  | Transaminase glutâmico-pirúvica                             |
| h    | Hora(s)                                                     |
| min  | Minuto(s)                                                   |

## Sumário

|                                                                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                                                              | <b>14</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>                                                                                                                                                   | <b>16</b> |
| 2.1 FERIDAS E TERAPIAS TÓPICAS                                                                                                                                                   | 16        |
| 2.2 MEMBRANAS RETICULADAS (CMC E PVA) E SUAS APLICAÇÕES                                                                                                                          | 19        |
| 2.3 Lauraceae Juss                                                                                                                                                               | 21        |
| 2.4 <i>Ocotea Aubl.</i>                                                                                                                                                          | 21        |
| 2.5 <i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees                                                                                                                                          | 22        |
| 2.6 MUCILAGEM DE <i>Ocotea puberula</i>                                                                                                                                          | 24        |
| <b>3 OBJETIVO</b>                                                                                                                                                                | <b>27</b> |
| 3.1 GERAL                                                                                                                                                                        | 27        |
| 3.2 ESPECÍFICOS                                                                                                                                                                  | 27        |
| <b>4 MATERIAIS</b>                                                                                                                                                               | <b>28</b> |
| 4.1 EQUIPAMENTOS                                                                                                                                                                 | 28        |
| 4.2 MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES                                                                                                                                             | 28        |
| 4.2.1 Material Vegetal                                                                                                                                                           | 28        |
| 4.2.2 Polímeros                                                                                                                                                                  | 29        |
| 4.2.3 Solventes e demais produtos                                                                                                                                                | 29        |
| <b>5 MÉTODO</b>                                                                                                                                                                  | <b>31</b> |
| 5.1 EXTRAÇÃO DA MUCILAGEM DE <i>Ocotea puberula</i>                                                                                                                              | 31        |
| 5.2 OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS CONTENDO MUCILAGEM DE <i>Ocotea puberula</i>                                                                                                          | 31        |
| 5.2.1 Preparação das membranas de CMC com mucilagem de <i>Ocotea puberula</i>                                                                                                    | 32        |
| 5.2.2 Preparação das membranas de PVA com mucilagem de <i>Ocotea puberula</i>                                                                                                    | 32        |
| 5.3 CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO DE CMC E PVA                                                                                                                                      | 33        |
| 5.4 ENSAIOS DE TRAÇÃO                                                                                                                                                            | 33        |
| 5.5 ENSAIO DE ESTERILIZAÇÃO DOS FILMES                                                                                                                                           | 36        |
| 5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO <i>IN VIVO</i> DE MEMBRANAS RETICULADAS DE CMC E PVA IMPREGNADAS COM MUCILAGEM DE <i>Ocotea puberula</i> EM MODELO EXPERIMENTAL DE CICATRIZAÇÃO EM RATOS | 36        |
| 5.6.1 Aspectos éticos                                                                                                                                                            | 36        |
| 5.6.2 Cálculo amostral de animais para pesquisa                                                                                                                                  | 36        |
| 5.6.3 Seleção de animais para pesquisa                                                                                                                                           | 37        |
| 5.6.4 Confeção da ferida e tratamento das lesões                                                                                                                                 | 37        |

|                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.6.5 Coleta de material para estudo .....                                     | 38        |
| 5.6.6 Avaliação do índice de cicatrização das lesões .....                     | 39        |
| 5.6.7 Estudo histológico (histomorfometria) .....                              | 39        |
| 5.6.8 Análise microscópica das feridas .....                                   | 40        |
| 5.6.9 Análises estatísticas .....                                              | 41        |
| <b>6 RESULTADOS .....</b>                                                      | <b>42</b> |
| 6.1 EXTRAÇÃO DA MUCILAGEM DA CASCA DE <i>Ocotea puberula</i> .....             | 42        |
| 6.2 ELABORAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CMC E PVA.....                                 | 43        |
| 6.3 FTIR DAS MEMBRANAS DE CMC E PVA PURAS E INCORPORADAS COM EHOP .....        | 44        |
| 6.4 ENSAIOS DE TRAÇÃO .....                                                    | 45        |
| 6.5 ENSAIO DE ESTERILIZAÇÃO DOS FILMES .....                                   | 46        |
| 6.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i> PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS .....       | 47        |
| 6.6.1 Avaliação do índice de cicatrização das lesões (ICL) .....               | 48        |
| 6.6.2 Avaliação histológica das lesões .....                                   | 50        |
| 6.6.3 Análise bioquímica de nefro e hepatotóxica de fitoterápico .....         | 54        |
| <b>7 DISCUSSÃO .....</b>                                                       | <b>57</b> |
| <b>8 CONCLUSÃO .....</b>                                                       | <b>65</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                       | <b>66</b> |
| <b>APÊNDICES .....</b>                                                         | <b>74</b> |
| <b>APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO PELO GRUPO DE PESQUISADORES ....</b>          | <b>75</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                            | <b>82</b> |
| <b>ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO – CEUA.....</b>                           | <b>83</b> |
| <b>ANEXO B – EXCISÃO <i>Ocotea puberula</i>.....</b>                           | <b>84</b> |
| <b>ANEXO C – INSTRUMENTO PARA REALIZAÇÃO DAS IMAGENS DAS LESÕES .....</b>      | <b>85</b> |
| <b>ANEXO D – ARTIGO RELACIONADO À PESQUISA A SER PUBLICADO EM REVISTA.....</b> | <b>86</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As feridas crônicas constituem um sério problema de saúde pública, afetando grande parcela da população, em especial os acamados e doentes crônicos (ex: hipertensos e diabéticos), interferindo na capacidade funcional e ainda contribuindo para elevação de índices de morbidade e mortalidade por doenças crônicas (ABREU *et al.*, 2013; ZANOTI *et al.*, 2017). Esse grande número de portadores de lesões crônicas representa um desafio para a assistência, requerendo atenção e cuidado especial por parte dos profissionais de saúde, pois representa maior tempo e custos relacionados ao tratamento, devido à longevidade da existência da ferida (em especial as úlceras venosas e as diabéticas); a baixa resposta aos tratamentos convencionais e a não adesão dos pacientes a esses tratamentos (SARHEED *et al.*, 2016, CAMPOS *et al.*, 2016).

O tratamento de feridas retoma a antiguidade, na busca do homem por terapias com melhores resultados cicatriciais em menores intervalos de tempo por meio do uso de diversos métodos e substâncias na terapêutica de lesões. Utilizavam-se, muitas vezes, produtos empíricos, ineficazes e ao mesmo tempo prejudiciais ao processo cicatricial (DAUNTON *et al.*, 2012; BROCKE & BARR, 2020).

Os avanços tecnológicos, os quais favoreceram e influenciaram a busca de estudos acerca do assunto, também propiciam grande avanço no conhecimento dos diferentes tipos de lesões, desde o processo de reparação do tecido lesado, bem como de todos os fatores nele envolvidos (MESQUITA *et al.*, 2013; CHILDS & MURTHY, 2017). Uma opção comumente explorada é a aplicação da fitoterapia, que desempenha um papel fundamental tanto na medicina tradicional como na farmacologia moderna, caracterizada por utilizar substâncias medicinais derivadas de plantas.

Estes princípios ativos presentes nos extratos em um composto único, chamado de fitocomplexo, atuam de maneira multimodal na cicatrização de feridas, pois eles agem de diversas formas sobre os mecanismos de desenvolvimento da lesão, incluindo desde perfusão tecidual, hidratação, tratamento de infecções bacterianas, oferta de micronutrientes ao leito da lesão, na modulação inflamatória e neoangiogênese (TSIOUTSIU *et al.*, 2016, DAN *et al.*, 2018).

Nesse contexto, dentre as plantas com propriedades medicinais destaca-se, na

região dos Campos Gerais, a espécie *Ocotea puberula* (Rich.) Nees., conhecida popularmente como “guaicá, canela-guaicá, canela-sebo, canela-parda, canela-de-corvo, canela-pimenta”. Trabalho etnobotânico efetuado em comunidades indígenas do Paraná e Santa Catarina revelou que as cascas de *O. puberula*, trituradas em forma de pó e acrescidas de água era tradicionalmente aplicada no tratamento de tumores e afecções da pele (FARAGO *et al.*, 2004).

Nota-se também que há uma busca crescente por associação de biofilmes a biomateriais, em busca de benefícios como fácil acessibilidade, disponibilidade e baixo custo associado à sua efetividade na função a ser utilizado (antimicrobiano, cicatrizante, anti-inflamatório, entre outros) (MURRAY, 2019; SHEDOEVA *et al.*, 2019; BIANCHERA *et al.*, 2020).

Assim, considerando a necessidade clínica de um tratamento eficaz na cicatrização de feridas, associado à ampla oferta de *Ocotea puberula* (canela-guaicá) na Região dos Campos Gerais, o presente estudo propõe a obtenção de uma película semipermeável impregnada com a mucilagem de *O. puberula* em um sistema controlado de liberação para aplicação em feridas de pele, buscando, assim, novas perspectivas para o tratamento atual de lesões cutâneas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FERIDAS E TERAPIAS TÓPICAS

A pele é o maior órgão do corpo humano, e atua como primeira barreira mecânica entre o organismo e o ambiente externo. Também proporciona regulação térmica, homeostase de água e eletrólitos, bem como tato, sensibilidade, metabolização de substâncias, dentre diversas funções primordiais para manutenção da vida. A capacidade de reparação e regeneração é primordial para manutenção destas funções (GUSHIKEN *et al.*, 2021).

O reparo tecidual de ferimentos ou lesões é complexo e intimamente envolvido em uma cadeia de eventos ao qual demanda às pessoas buscar meios de promoção de um ambiente ideal para a cicatrização, seja ele endógeno ou exógeno. Estas feridas são descritas como alterações da integridade da pele em ordem celular, geralmente visível, as quais podem relacionar-se a inúmeros fatores que podem desencadear uma lesão, a exemplo de danos físicos ao corpo, resposta imunológica, tumores, dentre outras etiologias. Além de todas estas causas associadas à ferida, a população adulta é comumente assolada por doenças crônicas e sistêmicas, tais como diabetes, hipertensão arterial, desnutrição, imunodeficiência ou infecção, que contribuem para o retardo no processo de reparação tecidual (SANTOS *et al.*, 2016; CHILDS & MURTHY, 2017).

Quando buscamos formas distintas pelas quais as feridas podem reparar-se ou cicatrizar, a literatura relata que esta regeneração depende da quantidade de tecido lesionado e da presença ou não de infecção. A cicatrização pode ocorrer de maneiras distintas, a exemplo de: cicatrização por primeira intenção (não há perda de tecido e as bordas da ferida ficam justapostas), cicatrização por segunda intenção (perda de tecido e bordas não justapostas, cicatrizando mais lentamente) e cicatrização por terceira intenção (corrigidas cirurgicamente, normalmente crônicas e sem resposta a tratamento usual). Pode-se ainda classificar as lesões de acordo com sua apresentação como aberta (bordas da pele afastadas) ou fechadas (bordas justapostas) (CHIBANTE *et al.*, 2015; BORGES *et al.*, 2016).

Em relação à complexidade da cicatrização da pele, pode-se justificar essa gama de eventos com associação à estrutura morfológica da pele, a qual compreende duas camadas, a epiderme e a derme. A epiderme é a camada mais

externa da pele e está dividida em quatro ou cinco subcamadas, dependendo da região do corpo. Entre as células que constituem a epiderme, destacam-se os queratinócitos, assim como os melanócitos, células de Langerhans e células Merkel. A derme é a camada de tecido conjuntivo que suporta a epiderme, constituída por proteínas de matriz extracelular (colágenos, elastina, proteoglicanos) e glicosaminoglicanos sintetizados pelos fibroblastos (CAPELLA *et al.*, 2016).

Quando há uma perturbação de uma ou ambas as camadas da pele, o organismo inicia o processo de cicatrização da ferida para regenerar a área lesionada através de um processo dinâmico, interdependente, contínuo e complexo, envolvendo mecanismos celulares, moleculares e bioquímicos, divididos em três fases de reparo tecidual (inflamatória, proliferativa e remodeladora) (MEDEIROS *et al.*, 2016).

Essa reestruturação da pele é desencadeada por mecanismos complexos, em que vários fatores extrínsecos (frio, calor, umidade) ou intrínsecos (doenças crônicas, imunidade comprometida, nutrição) favorecem ou retardam a cicatrização. Embora a reparação tecidual seja um processo sistêmico, é necessário favorecer condições locais para viabilizar o processo fisiológico (MEDEIROS *et al.*, 2016; GUSHIKEN *et al.*, 2021).

Nesse sentido, há necessidade de promover condições que favoreçam a regeneração da pele de maneira ideal. Destaca-se a temperatura, pH, níveis bacterianos na ferida e umidade. A manutenção da temperatura e torno de 36,4 graus Celsius (°C) a 37,2°C favorece as reações químicas e eventos celulares (mitose, fagocitose, síntese de proteínas e metabolismo). Enquanto que o pH ácido que as secreções das glândulas sudoríparas e sebáceas promovem (pH 4,2 a 5,6) impedem a penetração ou colonização de microrganismos (OLIVEIRA & DIAS, 2012; SINGH *et al.*, 2017).

Portanto, o controle da colonização nas feridas favorece também a cicatrização, que pode ser obtido por meio de limpeza adequada, com técnica asséptica na troca do curativo e utilização de curativos que promovam barreira e que ajudem no controle microbiano. Ainda, há que se destacar que toda atividade celular ocorre em meio úmido, sendo crucial a utilização de um curativo que favoreça uma umidade ideal, protegendo as terminações nervosas, reduzindo a dor, acelerando o processo cicatricial, prevenindo a desidratação tecidual e a morte celular, promovendo necrólise e fibrinólise (SMANIOTTO *et al.*, 2010; DUTRA *et al.*, 2017).

Buscando esse ambiente ideal para a cicatrização de lesões, tem-se intensificado a pesquisa de produtos naturais ou sintéticos para auxiliar no reparo tecidual. Nos dias atuais, a terapia tópica empregada em feridas gera conflito de opiniões, em especial entre profissionais da área de saúde. Fato este justificado pela terapêutica implantada que deve atentar para a lesão e seu portador, com sensibilidade e planejamento holístico, de modo a contemplar o ser humano em sua plenitude, com o apoio de estratégias de avaliação das lesões que englobem todas as necessidades de tratamento (leito da ferida, infecção presente, característica de exsudato, borda da lesão, entre outros) (MEDEIROS *et al.*, 2016; COUTINHO JR *et al.*, 2020). Estes múltiplos fatores de avaliação e definição de coberturas de maneira subjetiva corroboram para divergências de propostas de tratamentos às lesões de pele, em especial em feridas crônicas (PIRES *et al.*, 2015, TOTTOLI *et al.*, 2020).

Destaca-se nessa busca por novas opções terapêuticas e aplicação prática no manejo de ferimentos complexos o profissional de enfermagem, o qual detém papel crucial por responsabilizar-se em suprir todas as etapas do cuidado em feridas, desde o acolhimento do paciente, avaliação da ferida, escolha do tratamento a ser utilizado e o acompanhamento até regressão da ferida. Além disto, é crucial uma comunicação assertiva com a pessoa com lesão crônica, sendo dever de o enfermeiro combater o desconhecimento que pode proporcionar uma assistência insegura e não resolutive, informando ao paciente os métodos preventivos e terapêuticos, bem como o manejo e utilização ideal das coberturas e terapias ofertadas aos pacientes, com vistas a fortalecer a relação terapêutica para poder desenvolver suas competências profissionais continuamente (SILVA FILHO *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2021)

Atualmente, existem diversos tipos de coberturas que proporcionam diferentes possibilidades de aplicação: filmes, espumas, sprays e géis. Dentre estes, os filmes, que são polímeros em forma de lâminas sobrepostas, são largamente aplicados em diversas lesões de pele sendo que, dentre os componentes das formulações, usualmente são encontrados polímeros de poliuretano, polietileno, policaprolactona, acetato de polivinila, polietrafluoroetileno, dimetilaminoetilmetacrilado, carboximetilcelulose, entre diversos outros compostos poliméricos (ZENG *et al.*, 2018).

Destaca-se também a busca por utilização de polímeros, que detêm propriedades como renovabilidade, biodegradabilidade e atividade biológica, tais



como os polissacarídeos, que possuem solubilidade ampla, associado a propriedades como gelificação, emulsificação e hidratação, cruciais para aplicação em coberturas de pele como filmes e géis. A quitosana e o alginato se distinguem entre os polissacarídeos de utilização atual na indústria da saúde (PIRES *et al.*, 2015; YADAV *et al.*, 2017).

Portanto, ao selecionar o tipo de tratamento a ser utilizado em uma ferida, é necessário reconhecer os benefícios, indicação, contraindicação, e o custo de cada produto, de forma a ponderar essas implicações e selecionar a cobertura ideal para aplicação, lembrando as especificidades de cada etapa do processo terapêutico da cicatrização (TOTTOLI *et al.*, 2020; GUSHIKEN *et al.*, 2021).

## 2.2 MEMBRANAS RETICULADAS (CMC E PVA) E SUAS APLICAÇÕES

Atualmente, existe uma vasta gama de tratamentos no mercado mundial, para a gestão das feridas, proporcionando ao paciente inúmeras funções desde higienização do leito da ferida, debridamento para diminuição da população bacteriana, também para controle do exsudado ou ainda como estímulo à reepitelização. Nessa ótica, a utilização de membranas semipermeáveis como terapêutica no manejo de lesões vem se tornando cada vez mais comum na assistência aos pacientes (DA, HUANG e XIE, 2017; NADA *et al.*, 2018).

Para isto, as membranas devem possuir características ideais em termos de controle de umidade e maleabilidade, proporcionando deformação e preenchimento no tecido lesionado. Uma das alternativas na produção destes curativos é utilizar polímeros biocompatíveis em sua forma reticulada. A reticulação de polímeros é definida como um processo que ocorre quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por ligações covalentes, podendo também ser chamado de “*crosslinking*” ou ligação cruzada, oportunizado a estes polímeros ligações entre moléculas lineares e produzindo um sistema tridimensional, mucoadesivo, mimético à pele e biocompatível. Essas características proporcionam ao tecido lesionado condições ideais para crescimento, diferenciação e proliferação celular, bem como a remodelação e substituição do sistema por tecido regenerado durante a sua decomposição (GAO *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021; NASUTION *et al.*, 2022).

As coberturas para feridas, incluindo filmes e espuma, são feitos de vários

materiais, com alguns contendo materiais biológicos ou materiais com propriedades antibacterianas ou agentes que podem facilitar a migração celular. Neste sentido, a aplicação de hidrogéis ou membranas pode ser uma opção ideal em formulação de produtos para cicatrização, visto que estes compostos podem formar redes de macromoléculas através da sua reticulação (seja química ou física), proporcionando a estes materiais alta sensibilidade ao leito da lesão, controle de umidade e flexibilidade, assim como melhorar a proliferação e propagação celular e facilitar a cicatrização de feridas (epitelização e vascularização) com a regeneração de folículos capilares imaturos em comparação com as outras membranas (MURRAY *et al.*, 2019, ALVEN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2022).

Estes curativos especiais podem ser classificados, habitualmente, em curativos passivos, com princípios ativos, curativos inteligentes e curativos biológicos, de acordo com o princípio ativo ou composto e suas principais características (SMANIOTTO *et al.*, 2010; MEDEIROS *et al.*, 2016; NADA *et al.*, 2018). Embora existam várias opções disponíveis comercialmente, muitos destes apresentam efeitos colaterais indesejados, tais como absorção incipiente de exsudados, proteção ineficiente de infecções, incapacidade de manter a umidade ideal, assim como o desencadeamento de reações alérgicas, estas as quais podem interferir no curso de cicatrização, prolongando e onerando custos ao tratamento (GUADARRAMA-ACEVEDO *et al.*, 2019; OKUR *et al.*, 2020).

Outro dado essencial a ser descrito são os custos inerentes ao tratamento de lesões, estimando-se em torno de 25 bilhões de dólares anualmente nos Estados Unidos da América, fortalecendo assim a necessidade de oferta de tratamentos tópicos de amplo acesso e custo acessível à população portadora de lesões de pele, os quais promovam aceleração da cicatrização, controle de exsudato e facilidade de manuseio (KAMOUN *et al.*, 2017; KOGA *et al.*, 2020).

Dentre as diversas opções tecnológicas de polímeros para a formulação de membranas ou hidrogéis empregados na cicatrização de feridas, destacam-se a CMC e o PVA. A CMC é um derivado da celulose, usado em larga escala na indústria farmacêutica como emulsificante, devido propriedade de absorção e intumescimento em contato com a água, além de ser não-tóxico e biocompatível com diversos tecidos, como mucosa, pele e ossos e ter capacidade de se misturar com outros polímeros (BASU *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2021). Já o PVA é um polímero hidrofílico e solúvel em água, com propriedades não tóxica, biodegradável

e bioaderente. Essa peculiaridade de aderência confere facilidade em simular tecidos naturais e ser facilmente aceito em implantações no corpo, a exemplo de lentes de contato, revestimentos para coração artificial e curativos para feridas (FAHMY *et al.*, 2015; BAGHAIE *et al.*, 2017; GHOMI *et al.*, 2019; RAMIREZ *et al.*, 2021).

### 2.3. Lauraceae Juss.

Explorando o potencial botânico das plantas, dentre as espécies existentes destaca-se a Família das Lauráceas, com distribuição tropical e subtropical, com concentração nas florestas úmidas da Ásia e América, incluindo aproximadamente 67 gêneros com mais de 2500 espécies. No Brasil há aproximadamente 27 gêneros, 467 espécies, 1 subespécie e 6 variedades de lauráceas, considerada uma das mais importantes famílias de composição dos ecossistemas florestais e com potencial econômico.

Pode-se citar algumas espécies de larga utilização pela população, a exemplo de *Persea americana* e seu fruto abacate, *Ocotea porosa* (Ness & Mart.) Barroso, popularmente conhecida como imbuia, *Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer ou sassafrás, ou ainda o óleo essencial extraído do pau-rosa (*Aniba rosiodora* Ducke), o linalol, um excelente fixador de perfume, que agrega um alto valor econômico. ) Além desta característica peculiar da família, os óleos essenciais e outros metabólitos detêm mecanismos que inibem micro-organismos, bem como a adoção destes como pesticidas ou ainda para recuperação de matas nativas devido capacidade de alelopatia (CUSTÓDIO & VEIGA JÚNIOR, 2014; FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2022).

### 2.4. *Ocotea* Aubl.

Tente os 27 gêneros constituintes da Lauraceae Juss. destaca-se o gênero *Ocotea* Aubl., atualmente constituído no mundo, por aproximadamente 300 espécies e no Brasil aproximadamente 175 espécies, das quais, pouco mais de 10% são conhecidas quimicamente, segundo o levantamento bibliográfico realizado (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2022).

As espécies do gênero *Ocotea* são conhecidas por acumularem como metabólitos secundários os alcaloides com esqueletos benzilisoquinolínico ou bisbenzilisoquinolínico, oxo-aporfínico, aporfínico e pró-aporfínico. É também apontado como um dos gêneros da Lauraceae mais representativos tanto em número de indivíduos quanto em riqueza de táxons nas florestas pluviais, e está entre os mais diversos da flora brasileira. Ecologicamente, *Ocotea* apresenta uma forte ligação com insetos, mamíferos e aves que exercem uma grande influência sobre a polinização, dispersão de sementes e regeneração das florestas (ARAUJO, 2000, FORZZA et al., 2010;; XAVIER et al., 2020, LILLO et al., 2021).

## 2.5. *Ocotea puberula* (Rich.) Nees

Na Floresta Ombrófila Densa do Paraná pode-se encontrar um exemplar das Lauráceas com utilização para fornecimento de madeira própria para caixotaria e fabricação de papel, como também para utilização em construção civil leve, construção interna, marcenaria, móveis, caixões de carroça e ainda em embalagens em geral, bem como aproveitamento das cacas em forma de pó para tratamento de efluentes. A esta planta dá-se o nome de *Ocotea puberula*, conhecida popularmente como guaicá, canela-guaicá, canela-goaicá, canela-sêbo, canela-parda, canela-de-corvo, canela-pimenta, canela-babosa, louro-abacate, amansa-besta ou ainda aiui-saiiu e ilustrada na Figura 1 (BROTTO, 2010; GUIMARÃES et al., 2017; GEORGIN et al., 2020).

De acordo com o Sistema de classificação de Cronquist, a taxonomia de *Ocotea puberula* obedece à seguinte hierarquia: Divisão: Magnoliophyta (Angiospermae); Classe: Magnoliopsida (Dicotyledonae); Ordem: Magnoliales; Família: Lauraceae Juss; Gênero: *Ocotea* Aubl. e espécie: *Ocotea puberula* (Rich.) Nees. Tem como sinônimos botânicos relevantes: basônimo *Laurus puberula* Rich.; heterotípicos *Gymnobalanus perseoides* Meisn.; *Oreodaphne martiana* Nees; *Oreodaphne martiniana* Nees; *Oreodaphne martiniana* var. *dubia* Meisn.; *Oreodaphne martiniana* var. *latifolia* Meisn. e homotípico *Strychnodaphne puberula* (Rich.) Nees & Mart., sendo considerado uma espécie nativa e não endêmica (RAMALHO, 2002, FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2022).



**Figura 1** Canela-guaicá na Região dos Campos Gerais (flora do Campus da Universidade Estadual de Ponta Grossa)

Fonte: o autor, 2017

Observa-se ainda que a canela-guaicá floresce de abril a julho e frutifica de agosto a novembro. Seu habitat ocorre desde a Guiana Francesa, Guiana, Peru, Colômbia, México e Brasil, nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. No Paraná, a espécie é amplamente distribuída e facilmente encontrada. Apresenta acentuada regeneração em florestas secundárias em estágio inicial de sucessão. Em material vivo, a coloração da flor varia de creme a esverdeada e o fruto maduro tem cúpula vermelha, sendo suas flores unissexuadas (como a maioria das lauráceas), sendo a única com folha de base fortemente revoluta (BROTTO, 2010).

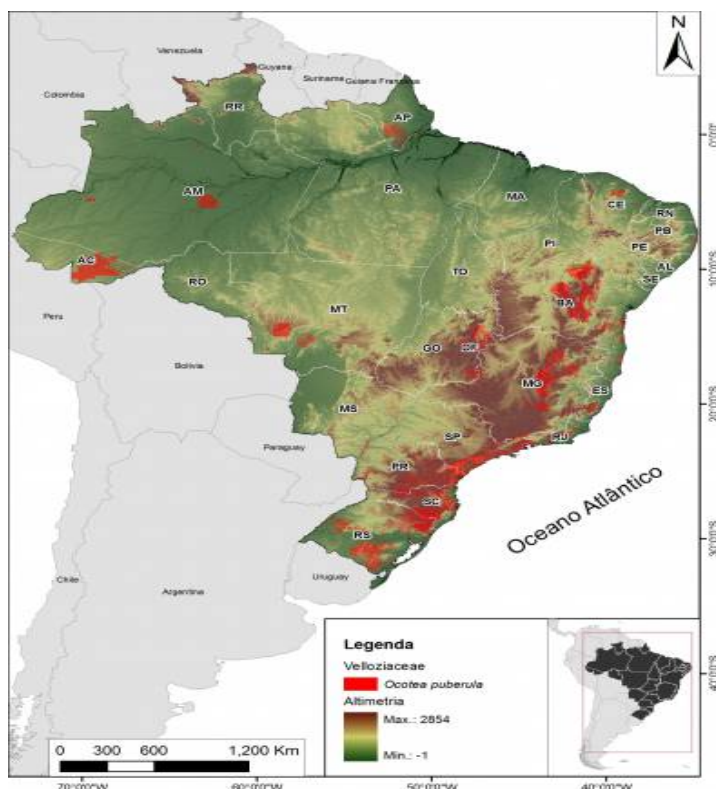
Vernengo e colaboradores, em 1963, identificaram e analisaram a estrutura de um alcaloide presente na casca da canela-guaicá, a ocoteina. Diversos outros estudos foram realizados visando a caracterização destes alcaloides comumente encontrados no gênero *Ocotea*. Em alguns estudos de identificação em plantas do gênero, foi demonstrada a presença de diversos alcaloides comumente encontrados em Lauraceae, sendo que os mais comuns foram o predicentrina, o dicentrina, o isocoridina, o ocoteina, o ocopodina, dentre outros. Em *Ocotea puberula* foram encontrados os seguintes alcaloides: predicentrina, dicentrina, N-metillaurotetanina,

Isodomeicina, N-óxido dicentrina, ocoteína, leucocina, talicminina, deidroocoteína, dideidroocoteína e 3-hidroxicentrina (ZANIN *et al.*, 2007; CUSTÓDIO & VEIGA JÚNIOR, 2014; PEREWALO *et al.*, 2021).

## 2.6. MUCILAGEM DE *Ocotea puberula*

Observando o potencial fitoterápico de alcaloides em cicatrização de lesões e propriedades analgésicas (SILVA *et al.*, 2015; GARLET *et al.*, 2019), observou-se literaturas relacionadas ao uso popular da canela-guaicá. Descreveu-se, além do uso em marcenaria e reflorestamento, relatos de utilização da guaicá para alimentação animal, porém sem trabalhos robustos que comprovem seu potencial alimentar, além da presença de teores consideráveis de taninos (6 a 9%), conferindo provavelmente característica não palatável aos animais. Observou-se que da casca interna da canela-guaicá exsuda-se um mucilagem de característica densa e pegajosa, sendo descrito sua utilização medicinal através de um estudo etnobotânico com os índios de várias etnias do Paraná e de Santa Catarina (FARAGO *et al.*, 2004; SARQUIS *et al.*, 2019).

Estes pesquisadores relataram que os indígenas utilizavam a parte interna do caule da canela-guaicá e que as árvores mais velhas tinham melhor potencial terapêutico, quando comparado aos exemplares jovens, no tratamento de afecções de pele devido maior teor de fitoterápico na casca do caule, segundo crença popular. Este extrato da casca servia ainda como um emplastro para auxiliar na remoção de espinhos ou estrepes da pele (comumente acometido por esta população); e o chá das folhas também era utilizado no combate às diarreias e disenterias. Posteriormente, estudos complementares sinalizaram propriedades medicinais para tratamento de doenças tropicais, a exemplo da esquistossomose (RAMALHO, 2002; BARBOSA *et al.*, 2020).



**Figura 2** Locais de ocorrência natural da canela-guaicá  
 Fonte: CNCFlora, 2012

A morfoanatomia da casca da canela-guaicá evidencia um súber relativamente espesso, formado por cerca de 25 camadas de células tabulares. Sequencialmente foram visualizados o felogênio e a feloderme. No córtex de *Ocotea puberula* foram evidenciadas células parenquimáticas de paredes delgadas, conteúdo amiloplastos. Apresentaram também células pétreas com paredes de espessamento irregular e pequenos agrupamentos de fibras, e distribuição de células com conteúdo lipofílico, células mucilaginosas e células contendo compostos fenólicos na região cortical. Células contendo óleo essencial e mucilagem são comuns na família Lauraceae (FARAGO *et al.*, 2004).

O potencial fitoterápico da canela-guaicá foi comprovado com a avaliação do efeito antinoceptivo (reduz a transmissão de estímulos que causem dor) do alcaloidedicentrina extraído de *O. puberula*. Ao injetar uma solução de 0,92% de formaldeído em musculatura abdominal dos ratos, estes produzem contração muscular relacionado a dor. Ao administrar dicentrina em fração clorofórmica, notou-se efeito antinoceptivo, com comparação similar a efeito analgésico de morfina ou aspirina (controles positivos). Estes mesmos autores, em outra pesquisa “in vivo” com modelos de dor inflamatória aguda e crônica em ratos, observaram que ao

administrar dicentrina em lesões plantares nas patas dos ratos, a S - (+) – Dicentrina promoveu um importante efeito antinociceptivo em condições inflamatórias, reduzindo a nocicepção espontânea e atenuando a hipersensibilidade mecânica e fria associada a estas condições. Este efeito indica sua potencialidade no desenvolvimento de novos medicamentos clinicamente relevantes para a gestão da dor persistente, especialmente sob condições inflamatórias (MONTRUCCIO *et al.*, 2012; MONTRUCCIO *et al.*, 2013; PEREWALO *et al.*, 2021).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial biológico na cicatrização de feridas de membranas reticuladas com mucilagem de *Ocotea puberula* na cicatrização de feridas.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Obter a mucilagem das cascas de *Ocotea puberula* (EHOP) por extração hidroalcoólica
- Desenvolver uma formulação fitoterápica contendo EHOP em diferentes formulações farmacêuticas (membrana PVA e membrana CMC);
- Investigar a estrutura e interações das membranas (CMC e PVA) com a mucilagem de *Ocotea puberula* por Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- Analisar o comportamento das membranas isoladas e em associação com o EHOP em ensaios de tração;
- Identificar o potencial de esterilidade das membranas com utilização de radiações ultravioleta (UV);
- Avaliar o efeito *in vivo* das membranas contendo EHOP em modelo experimental de cicatrização em ratos;
- Investigar as características histológicas das lesões quanto a inflamação, angiogênese e colagênese;
- Sinalizar a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade dos compostos através de análise bioquímica do sangue referente a marcadores renais e hepáticos;

## 4 MATERIAIS

### 4.1 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Centrífuga (HermLe Z326K, Wehingen, Alemanha);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Estufa de cultura bacteriológica 40 Litros, Temperatura de trabalho: Ambiente +5°C até 70°C (7-Lab – Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Liofilizador (LIOTOP, L202, São Paulo, Brasil);
- Cuba Ultrassônica Portátil (Cristofoli 220V 2,1 litros, frequência 50/60 Hz. Campo Mourão, PR Brasil);
- Ultrafreezer (REVCO, modelo ULT-2186-3-D37, Carolina do Norte, Estados Unidos);
- Aparato padronizado para realização das fotos com mesmo distanciamento em todos os animais;
- Autoanalisador Winier Lab CT 300i;
- Equipamento de ensaio de tração (SHIMADZU AG-1 10 kN - Tóquio-Japão);
- Capela de Fluxo laminar com luz ultravioleta 15W Vazão 600m<sup>3</sup>/h e potência 52 W (EXAUSTERMO Santos André – São Paulo).

### 4.2 MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES

#### 4.2.1 Material Vegetal

- Cascas secas de *O. puberula*, retiradas em Outubro – Novembro de 2017 de exemplares de árvores localizados próximo às coordenadas 25°05'39'' de latitude S e 50°06'05'' de longitude W, no perímetro urbano do Município de Ponta Grossa, Estado do Paraná.
- Número de Identificação – registro no herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob n° 19107

- O acesso ao patrimônio genético *O. puberula* foi autorizado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/SISGEN) e está registrado sob o número AD3F256.
- Cascas foram coletadas em caules em região acima de 1,3m da altura do solo e posteriormente extraído das amostras epífitos (líquens) e o súber por meio de raspagem mecânica, sendo posteriormente fracionadas em amostras de 4cm<sup>2</sup> e secaa em temperatura ambiente, protegido de insetos e exposição ao sol por duas semanas.

#### **4.2.2 Polímeros**

- Carboximetilcelulose sódio (C5013 alta viscosidade, Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil);
- Acetato de polivinila (341584, Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil);
- Penso antimicrobiano de alginato com prata (Melgisorb Ag, Mölnlycke, Gotemburgo, Suécia).

#### **4.2.3 Solventes e demais produtos**

- Ácido Clorídrico (HCl) (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Água purificada pelo processo de destilação (H<sub>2</sub>O destilada), em equipamento tipo Pilsen (Fanem LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (Aldrich Co., St. Louis, Estados Unidos);
- Glutaraldeído (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Etanol a 95% (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Ácido Cítrico a 10% (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Xilazina 2% Injetável (Syntec – Tamboré SP, Brasil);
- Quetamina 0,1g/mL (Vetnil – Louveira SP, Brasil);

- Isoflurano 100 mL (Biochimico – Itatiaia RJ, Brasil);
- Compressa de Gaze 7,5 x 7,5 pct 10 unid (Dental Cremer – Blumenau SC, Brasil);
- Esparadrapo Impermeável 10 cm x 4,5 m (Dental Cremer – Blumenau SC, Brasil);
- Bisturi Descartável Aço Inox N°21 (Embramed – São Paulo SP, Brasil);
- Tubos sangue com gel separador em Plástico PET (Vacuette – Madrid, Espanha);
- Seringa luer lock com Agulha 25x7 estéril (Descarpack – Ilhota SC, Brasil).

## 5 MÉTODO

### 5.1. EXTRAÇÃO DA MUCILAGEM DA *Ocotea puberula*:

As cascas secas foram submetidas ao processo de cominuição por meio de um moinho de facastipo Willey com peneira em malha mesh 32 de crivo circular. Durante a trituração, foi utilizado no equipamento malha para tamisação com gramatura 50 (500  $\mu\text{m}$ ) para se obter uma granulometria correspondente à classificação de pó moderadamente grosso (ARCARO, 2018).

As cascas secas pulverizadas e tamisadas foram colocados em um béquer com água destilada, em proporção de 1:40 (m/v), sendo que foram fracionado em extrações seriadas de 20g do pó da casca acrescidos de 800 mL de água destilada. Procedeu-se agitação mecânica em agitador marca DIST, modelo DI-14MP, por 60 minutos a 300 rpm à temperatura aproximada de 60 °C, e mantida constante por chapa de aquecimento marca TECNAL, modelo TE-085.

Após resfriamento até temperatura ambiente, a mistura foi filtrada em peneira doméstica, extraindo resíduos sólidos, sendo posteriormente centrifugada em centrífuga SIGMA, modelo 2K15, por 15 minutos a 3600 rpm em temperatura ambiente. Retirou-se os resíduos sólidos desta mistura, sendo novamente centrifugada a 15000 rpm sob refrigeração a 8°C por 10 minutos para separação das partes sólidas ainda presentes. Todo resíduo sólido foi desprezado (súber), sendo reservada somente a fração solúvel para posterior precipitação da mucilagem por extração hidroalcoólica. Esta extração foi realizada com etanol 95% P.A. na proporção de três volumes de etanol para cada volume de amostra (3:1 v/v). Após a homogeneização da mistura com o etanol, a solução ficou sob refrigeração por 24 horas. Após isto, ocorreu a formação de um sobrenadante superficial branco e denso (miculagem), o qual foi extraído e armazenado em frascos com tampa e sob refrigeração (ARCARO, 2018).

### 5.2 OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS CONTENDO MUCILAGEM DE *Ocotea puberula*

Este estudo *in vitro* e *in vivo* desenvolveu-se na Universidade Estadual de

Ponta Grossa entre 2021 a 2022 através das seguintes etapas: elaboração, caracterização e avaliação das membranas de CMC e PVA impregnadas com mucilagem de *Ocotea puberula*; avaliação do ensaio de tração e esterilidade, aplicação nas feridas em modelo experimental murino e avaliação de seu potencial cicatricial e toxicidade *in vivo*.

### **5.2.1 Preparação das membranas de CMC com mucilagem de *Ocotea puberula***

Na formação de filmes de CMC, foi utilizado 4g de CMC em um béquer com 200 mL água. Esta mistura permaneceu em agitação magnética por 24 h. Após esta etapa, a mistura de CMC em água foi degaseificada em banho de ultrassom em cuba de Ultrassom Cristofoli 220V por 30 min (CAPANEMA *et al.*, 2018).

Posteriormente, adicionou-se 20 mL de uma solução reticuladora (ácido cítrico a 10%). Após a adição, a solução foi novamente homogeneizada em agitação magnética a 60°C em 200 rpm por 5 min. Na sequência, a mesma permaneceu inerte em temperatura ambiente por 30 minutos. Para formação de filmes de CMC, foi adicionado 20 g da solução em placas de pétri PP 8 cm, permanecendo em estufa biológica a 37°C por 48 h. Após a secagem, a membrana foi lavada com álcool etílico a 95% 3 vezes, extraíndo assim o reticulador residual da placa. Retirou-se as membranas da placa de pétri e as mesmas foram armazenadas em embalagem livre de contato com luz e ambiente externo.

Para o preparo da membrana de CMC 2% com 10% de mucilagem de *Ocotea puberula* foi seguido os mesmos passos experimentais da membrana pura de CMC a 2%, acrescentando na etapa pré reticulação da mistura a fração de 20g da mucilagem na solução de CMC e agitação magnética a 60°C por 10 min. Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

### **5.2.2. Preparação das membranas de PVA com mucilagem de *Ocotea puberula***

Na formação de filmes de PVA, utilizou-se 20 g de PVA em um béquer com 200 mL água. Esta mistura permaneceu em agitação magnética a 60°C por 10 min para homogeneização. Após esta etapa, a mistura de PVA em água foi degaseificada em banho de ultrassom na cuba de Ultrassom Cristofoli 220 V por 30 min (YADAV *et al.*, 2017).

Posteriormente foi acrescido 2 mL de uma solução reticuladora (10mL de Glutaraldeído a 25%, 10 mL álcool etílico 95% e 0,1 mL ácido clorídrico). Após a

adição, a solução foi novamente homogeneizada em agitação magnética a 60°C em 200 rpm por 5 min. Em sequência, a mesma permaneceu inerte em temperatura ambiente por 30 min. Para formação de filmes de PVA foi adicionado 20 g da solução em placas de pétri PP 8 cm, a qual permaneceu em estufa biológica a 37°C por 48 h. Após a secagem, a membrana foi lavada com álcool etílico a 95% 3 vezes, extraíndo assim o reticulador residual da placa. Retirou-se as membranas da placa de pétri e as mesmas foram armazenadas em embalagem livre de contato com luz e ambiente externo (YADAV *et al.*, 2017).

Para o preparo da membrana de PVA 10% com 10% de EHOP seguiu-se os mesmos passos experimentais da membrana pura de PVA a 10%, acrescentando na etapa pré reticulação da mistura a fração de 20 g do EHOP na solução e agitação magnética a 60°C por 10 min.

### 5.3. CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO DE CMC E PVA

Foi realizado a análise pela transformação de infravermelho de Fourier (FTIR) para confirmar a síntese destes produtos e suas possíveis interações. Os espectros FTIR do fitoterápico e dos polímeros sintetizados foram registrados de 4400 a 400 cm em um espectrofotômetro utilizando pastilhas de KBr com 32 varreduras e resolução de 2 cm.

### 5.4. ENSAIOS DE TRAÇÃO

Os ensaios de tensão-deformação de polímeros termoplásticos são os mais utilizados para a caracterização mecânica desse tipo de material. Como o comportamento mecânico dos polímeros difere da maioria dos materiais que apresentam comportamento linear elástico para a resposta de tensão-deformação, esses ensaios são normatizados por padronização internacional. O método de tração baseou-se nas normas da Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting (ASTM D882-02). Este método de teste determina as propriedades de tração de plásticos na forma de folhas finas, incluindo filmes com menos de 1,0 mm de espessura (OECD, 2021).

Avaliou-se neste ensaio a deformação dos materiais, onde a deformação elástica determina-se reversível, quando a carga é retirada, o material volta às suas dimensões originais. E avaliou-se a deformação plástica, que é irreversível, quando

a carga foi retirada, o material não recupera suas dimensões originais (GARCIA; SPIM; SANTOS, 2000; CALLISTER JR. E RETHWISCH, 2015).

As propriedades de tração podem ser utilizadas para fornecer dados para pesquisa e desenvolvimento e projetos de engenharia, bem como controle de qualidade e especificação. Este método de teste forneceu dados para identificação e caracterização de materiais para fins de controle e especificação, pois as propriedades de tração variam com a espessura da amostra, método de preparação, velocidade do teste, tipo de garras usadas e maneira de medir a extensão.



**Figura 3** Equipamento de ensaio de Tração SHIMADZU AG-1  
Fonte: O autor, 2022

As condições ambientais de temperatura, umidade e de velocidade de ensaio devem ser controladas. O condicionamento dos corpos de prova baseou-se nas normativas da ASTM D882-02 2002 onde devem ser acondicionados em temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $50 \pm 5\%$  com umidade relativa por não menos de 40 h antes do teste. As condições de teste também se basearam nas normativas da ASTM e devem ser conduzidas em temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $50 \pm 5\%$  de umidade relativa.



O número de amostragem recomendado foi de 15 amostras de cada polímero para verificar a elasticidade e deformação tanto na sua forma pura como em forma de blenda. Após a confecção dos corpos de prova, todos estes foram medidos com micrômetro para avaliar a espessura, sendo a unidade definida por micrômetro ( $\mu\text{m}$ ), para devidos ajustes na análise, pois os corpos de prova não obtiveram a mesma espessura após a preparação por espalhamento em placas. Os corpos de prova foram retirados das placas e seguiram a mesma normatização da ASTM onde define o tamanho das amostras de 50mm. As espessuras foram ajustadas na avaliação dos testes no programa de acordo com aferição de cada corpo por micrômetro. Os testes foram realizados utilizando equipamento de ensaio de tração SHIMADZU AG-1 10 kN (Tóquio-Japão), onde regulou-se uma tração de 50 milímetros por minuto para verificar ponto de fratura e deformação do material analisado, todas as amostras foram analisadas através do programa Trapezium 2 pelo método Wizard.



**Figura 4** Corte e corpo de prova para ensaio de tração (50mm e espessuras variadas)  
Fonte: O autor, 2022

A velocidade de aplicação da carga ou velocidade de ensaio, é dada pelo deslocamento da garra móvel em mm/min e é estimada de acordo com o tipo de material, variando entre 5-500 (mm/min.). A taxa de deformação é escolhida em função da rigidez do material, sendo utilizada uma taxa baixa para materiais frágeis (rígidos) e uma taxa elevada para materiais dúcteis (não rígidos). Um critério geral

para determinar a taxa a ser utilizada, é selecionar a menor velocidade capaz de produzir a ruptura do corpo de prova entre 0,5 e 5 min.

#### 5.5. ENSAIO DE ESTERILIZAÇÃO DOS FILMES

Os filmes de CMC e PVA com o EHOP reticulados foram cortados em pedaços de 4 cm<sup>2</sup> e mantidos em uma capela de fluxo laminar com luz ultravioleta de 15W (0, 30, 60 e 90 min) e, em seguida, transferidos para placas de petri com meio de cultura Agar sangue, sendo estas placas acrescidas de identificação no verso de cada fragmento o tempo de exposição e o filme avaliado. Após incubação por 24 h em estufa microbiológica a 35°C, observou-se a ocorrência de crescimento microbiano.

#### 5.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VIVO* DE MEMBRANAS RETICULADAS DE CMC E PVA IMPREGNADAS COM MUCILAGEM DE *O. puberula* EM MODELO EXPERIMENTAL DE CICATRIZAÇÃO EM RATOS.

##### 5.6.1. Aspectos éticos

A realização da experimentação "*in vivo*", foi realuzada após o envio do projeto à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ponta Grossa (CEUA/UEPG) e aprovado sob o nº do processo 016/2016. Os protocolos foram conduzidos respeitando-se os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

##### 5.6.2. Cálculo amostral de animais para pesquisa

O número da amostra foi calculado com base nos trabalhos de CASTELO BRANCO NETO *et al.*, 2006 e CAETANO, 2012. Sendo adotado um nível de significância de  $\alpha=0,05$ , para 5 grupos de 12 animais cada. Os cálculos serão realizados com base na média e desvio padrão, estabelecendo um poder de teste em 95%, usando o programa GPower 3.1.9.2 e acrescidos 30% do total obtido garantindo a viabilidade dos grupos mesmo com perda de animais no

desenvolvimento da pesquisa. Sendo assim, foi realizada a pesquisa com um total amostral de 75 ratos (15 ratos para cada grupo de pesquisa).

### **5.6.3. Seleção de animais para pesquisa**

Foram utilizados 75 *Ratus norvegicus albinus* da linhagem Wistar, machos, com aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 290 g a 380 g, cedidos pelo Biotério da UEPG e transferidos para o Laboratório para Técnica Operatória - LTO. Estes animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, com identificação numérica do animal e grupo a que pertencerá; forradas com maravalha, ruídos mínimos, ciclo claro-escuro de 12 h, temperatura de  $21 \pm 2^\circ \text{C}$ , sistemas de ventilação adequados, ração própria para a espécie e livre acesso à água.

Os animais foram separados de seu grupo de convivência, sendo acondicionado um animal por gaiola e mantidos em observação por 14 dias antes do bioensaio. Foi necessário o isolamento dos animais para que no decorrer da experimentação não houvesse a retirada dos curativos pelos outros animais do grupo. O período pré-experimentação de 14 dias teve o intuito de permitir a ambientação (adaptação) dos animais à separação do grupo de convivência, além de verificar condições clínicas, realizar a avaliação do peso e temperatura e identificação de variáveis que pudessem influenciar no experimento.

Os ratos foram pesados e separados pelo método probabilístico de escolhas aleatórias em 5 grupos com 15 animais cada, identificados a partir da terapêutica: grupo 1 controle positivo (CP) – espuma de alginato com prata (Melgisorb); grupo 2 película de CMC; grupo 3 película de CMC com EHOP; grupo 4 película de PVA e grupo 5 Película de PVA com EHOP.

### **5.6.4. Confeção da ferida e tratamento das lesões**

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram previamente aferidos o peso e utilizado o valor para o cálculo da anestesia. A anestesia foi realizada por via intraperitoneal (i.p), em concentração 40 mg/kg de quetamina a 10% e 10 mg/kg de xilazina a 2%. Alcançada a profundidade anestésica necessária, realizou-se depilação dos pelos do dorso do animal, no local da confecção da lesão. Com tesoura e bisturi foi confeccionada uma lesão excisiva dorsal única (2cm x 2cm) até o nível do tecido aponeurótico e em seguida, as lesões foram limpas com soro fisiológico (SF) a 0,9%, aplicado o tratamento tópico (exceto no controle negativo) e

cobertas com gaze e ataduras, com técnica asséptica (SARMENTO *et al.*, 2014).

Durante o tratamento foi dispensado em cada ferida amostras padronizadas de 16 cm<sup>2</sup> de cada produto, garantindo que a quantidade das formulações utilizadas seja igual para todos os animais e que cubra todo leito da ferida.

#### **5.6.5. Coleta de material para estudo**

Nos dias D7, D14 e D21 de pós-operatório (DPO), verificou-se o peso corporal dos grupos e realizado média simples para avaliação do percentual de perda ou ganho de peso dos animais pós lesão. Foi realizado retirada do curativo de todos os grupos após 7 dias de lesão e fotografia de todas as lesões para acompanhamento da evolução (estas fotos realizadas sem flash, sem zoom e com resolução padrão de 5 Mega pixels e Tamanho 4:3). Na realização das imagens, foi utilizado um aparato de metal onde a câmera foi fixada numa base de metal distante 10 cm perpendicularmente à área das lesões e realizado fotos com régua milimétrica para calibração do aplicativo ImageJ na mensuração da área de ferida.

A mensuração da área de cada ferida foi realizada nos dias 7, 14 e 21 através de programas computacionais de avaliação de retração de ferida e a área de cada lesão foi determinada através da digitalização das imagens obtidas com os desenhos e avaliadas utilizando o programa ImageJ 1.44.

Foram eutanasiados os animais por grupo e tempo de seguimento do tratamento. A cada eutanásia foram sacrificados 5 animais por grupo para retirada da ferida com anestesia de 4 vezes a dose utilizada para o procedimento cirúrgico de confecção das feridas e, posteriormente a parada cardiorrespiratória, um fragmento de formato elipsóide abrangendo também a área perilesional será retirado.

Posteriormente foram coletados amostras das lesões / cicatrizes para estudos histológicos (n=5 amostras por tempo e por grupo) dos animais nos dias 7, 14 e 21 dias. A pele dorsal ao redor das úlceras foi extraída cirurgicamente por profissionais habilitados na manipulação animal e técnica operatória adequada. Estas amostras foram acondicionadas em cassetes histológicos e fixadas em solução de formaldeído 10% por 24 h, e posteriormente conservados em álcool 70%.

A coleta de amostra de sangue para avaliação bioquímica foi realizada através de punção cardíaca, sendo acondicionados em tubos falcon com gel separador, centrifugados por 15 minutos, a 2.000 g ou 3.000 rpm e armazenados

posteriormente em freezer a -4°C e encaminhados para laboratório de referência para testes bioquímicos, com objetivo de realizar avaliação de hepato e nefrotoxicidade por meio dos seguintes testes séricos: transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), uréia e creatinina.

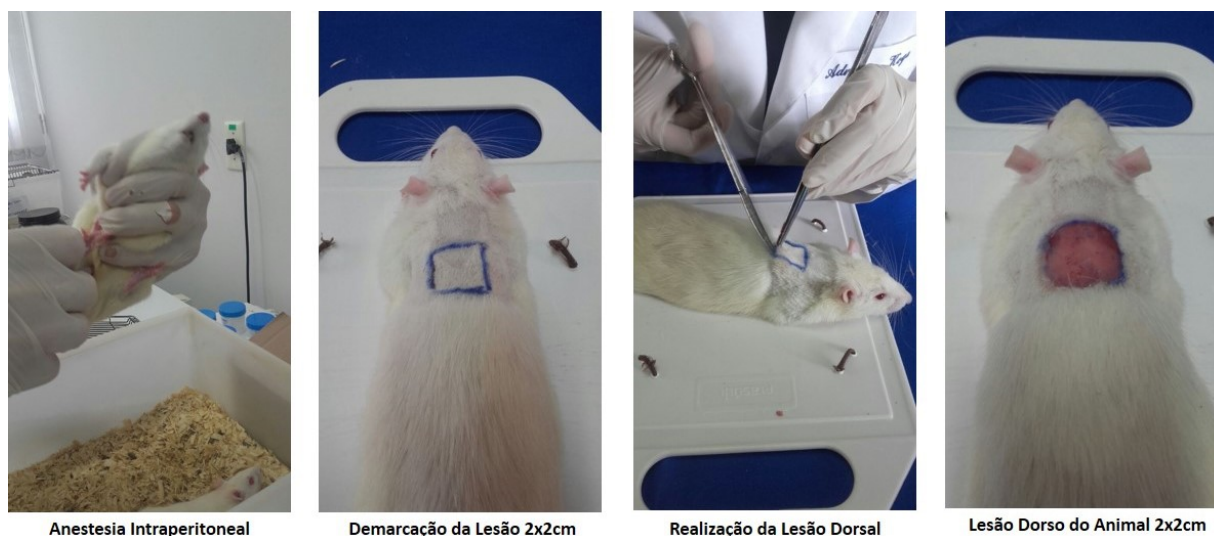
#### **5.6.6. Avaliação do índice de cicatrização das lesões**

As áreas das lesões foram calculadas a partir das fotografias de cada grupo e seus dias de seguimento de tratamento, utilizando o software ImageJ 1.44. A área inicial representou a superfície da lesão no dia do procedimento cirúrgico e a área final correspondeu à área da lesão no dia da eutanásia. Seguidamente, foi calculado o Índice de Cicatrização das Lesões (ICL) para analisar o percentual de reepitelização, sendo que este foi representado pelo quociente entre a diferença das Áreas Inicial ( $A_i$ ) e Área Final ( $A_f$ ) e a Área Inicial ( $A_i$ ) [ $ICF=(A_i-A_f)/A_i$ ] e expresso na fórmula abaixo:

Adotou-se que valores maiores que zero representam diminuição da área ulcerada e valores menores que zero representam aumento da área e valores iguais a um representam reepitelização completa.

#### **5.6.7. Estudo histológico (histomorfometria)**

Nos dias D7, D14 e D21 ocorreu a eutanásia dos animais. O fragmento de tecido obtido (ferida), ilustrado na figura 5, foi acondicionado em frascos com formol, e substituídos por álcool etílico após 24 h de submersão ao formol. Posteriormente, foram enviados os fragmentos de ferida ao Laboratório de Histologia de referência para preparo das lâminas histológicas, sendo que todo o processo do preparo das lâminas foi realizado neste laboratório seguindo técnicas e padronizações habituais deste estabelecimento.



**Figura 5** Manipulação Animal (rato *Wistar*) para o preparo da lesão incisional no dorso do animal  
Fonte: o autor, Julho 2021

#### 5.6.8. Análise microscópica das feridas

A fotomicrografia para análise das lâminas foram realizadas no Laboratório de Histologia do Programa de Especialização de Odontologia por um profissional que desconhecia a metodologia do trabalho, e as lâminas foram identificadas por codificação que o examinador desconhecia a qual grupo de animais pertencia as lâminas (modo cego).

Todos esses cuidados visaram evitar a possibilidade de viés ao estudo pelo examinador das lâminas. Foi utilizada a coloração com hematoxilina e eosina de Harris para avaliação da resposta inflamatória quanto à inflamação e angiogênese e para avaliação da colagênese (formação de fibras de colágeno) foi utilizada a coloração de Tricômio de Masson.

Para resposta inflamatória, angiogênese e colagênese foram atribuídos escores baseados na literatura, sendo estes: para ausência (0), para presença (1), intensamente infiltrado (2), severamente infiltrado (3), conforme ilustrado na tabela abaixo.

**TABELA 1** - Escores utilizados para avaliação histológica das lesões

| Variáveis          | Ausente | Presente | Moderado | Intenso |
|--------------------|---------|----------|----------|---------|
| <b>Inflamação</b>  | 0       | +1       | +2       | +3      |
| <b>Angiogênese</b> | 0       | +1       | +2       | +3      |
| <b>Colagênese</b>  | 0       | +1       | +2       | +3      |

Fonte: SARMENTO, 2014 *et al.* **Avaliação do extrato de *Zeyheria tuberculosa* na perspectiva de um produto para cicatrização de feridas.** Rev. Latino-Am. Enfermagem jan.-fev. 2014; 22(1):165-72 DOI: 10.1590/0104-1169.3143.2385

Dos escores obtidos através da análise histológica das fotomicrografias das lâminas, foi obtido uma média de escore e seu desvio padrão correspondente, para posterior avaliação dos tratamentos com coberturas para as lesões realizadas.

#### **5.6.9. Análises estatísticas**

Os resultados da atividade das membranas de CMC e PVA, desde o índice de cicatrização até dos ensaios bioquímicos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Após avaliação de normalidade, em variáveis independentes categóricas foi utilizado o teste de Anova, e em amostras não paramétricas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, e pós teste Tukey, empregando o software GraphPadPrism (versão 7.0, LaJolla, CA, Estados Unidos). Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $M \pm E.P$ ).

## 6. RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no decorrer deste trabalho referentes ao processo de formulação e caracterização das membranas de CMC e PVA impregnadas com o EHOP e a atividade cicatrizante dos grupos experimentais em modelo de ferida em ratos por meio de análises morfoanatômicas das feridas, análise histológica da lesão e quantificação bioquímica de constituintes sanguíneos buscando avaliação de nefro e hepatotoxicidade.

### 6.1. EXTRAÇÃO DA MUCILAGEM DA CASCA DE *Ocotea puberula*

Com o pó da casca de *O. puberula* disponível, foi realizada a etapa de extração da mucilagem, através da extração hidroalcoólica, conforme descrito por NIEHUES em 2015 ajustado para titulação 1:40 (p/v) conforme descrito em estudo prévio das características da casca e extração de mucilagem, assim como a técnica de extração com emprego de calor (rendimento similar à extração à frio e manutenção de características biológicas na mucilagem). A extração hidroalcoólica realizada conforme descrito no método demonstrou a separação em 3 frações: um sobrenadante viscoso e gelatinoso (mucilagem), uma fração solúvel de coloração amarelada (substâncias hidrossolúveis presentes na casca externa às células mucilaginosas) e um conteúdo residual precipitado de coloração acastanhado (súber da casca da planta), demonstrado abaixo na figura 6.



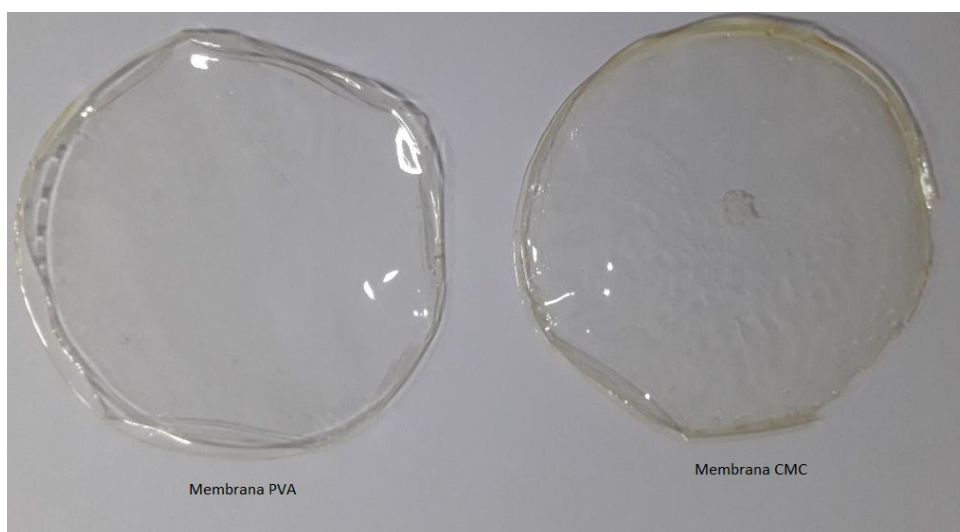
**Figura 6** Aspecto visual da extração hidroalcoólica da mucilagem da casca de *Ocotea puberula*  
Fonte: o autor, Março, 2021.



## 6.2. ELABORAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CMC E PVA

A escolha da elaboração das membranas contendo CMC e PVA foi guiada por dados em literaturas, que demonstram ampla utilização destas em membranas simples ou associadas a outros compostos para utilização em cobertura de feridas. A técnica mais comum para incorporação de compostos nas membranas de CMC e PVA é por adesividade, formando assim duas camadas distintas (uma com CMC ou PVA e outra com composto ativo).

No caso do EHOP, este demonstrou baixa adesividade em utilização por camadas, fato este o qual justificou a realização das membranas por reticulação, sendo incorporando o EHOP nas membranas previamente a formação do filme, este ao qual foi obtido um filme transparente, homogêneo e de fácil manipulação após a secagem, conforme ilustrado abaixo na figura 7.



**Figura 7** Modelos de Membrana de PVA e CMC

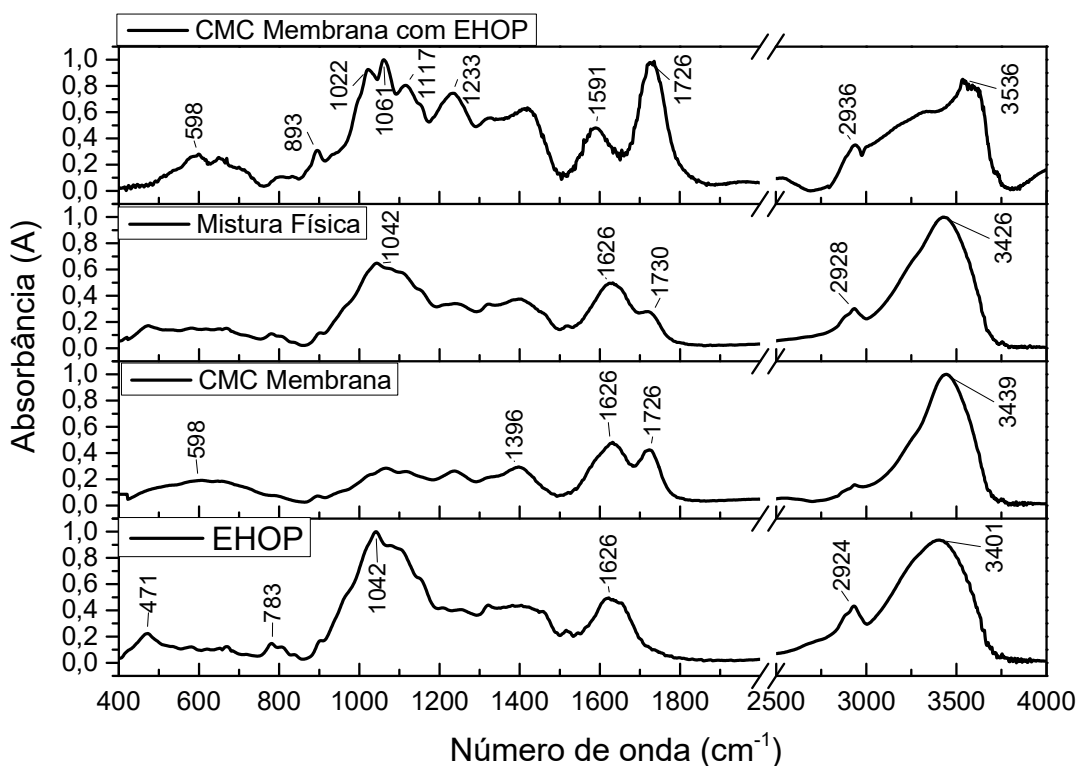
Fonte: o autor, Maio 2021.

## 6.3. FTIR DAS MEMBRANAS DE CMC E PVA PURAS E INCORPORADAS COM EHOP

Neste tópico foram elucidados as características dos espectros de FTIR da CMC, do PVA e do EHOP liofilizados e isolados, também em forma de mistura física

e após sua reticulação em forma de membranas. Foram demonstrados os espectros separadamente do constituinte CMC e posteriormente PVA.

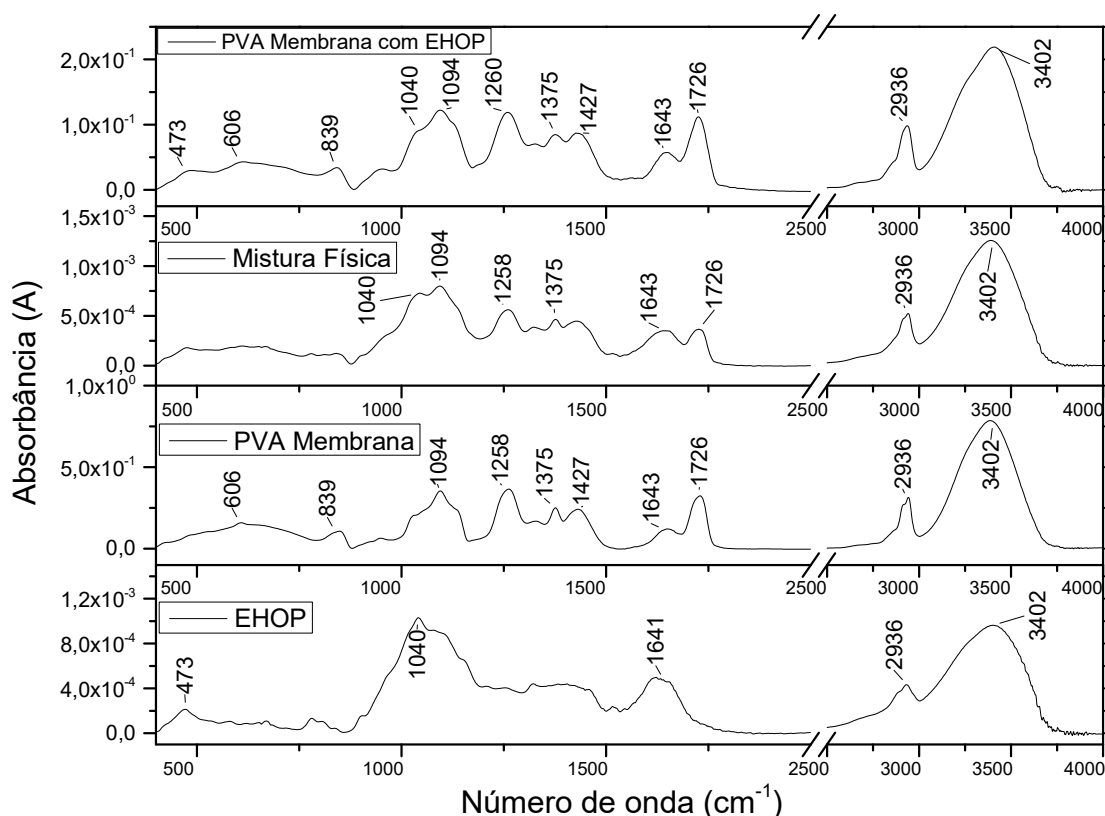
O Quadro 1 fornece espectros de FTIR da CMC pura em pó e membrana, do EHOP em pó e associado com a CMC em membrana e a mistura física dos dois constituintes.



**Quadro 1** - FTIR CMC Membrana pura e incorporada com EHOP

Fonte: o autor, Junho 2021

Em sequência às análises das membranas, o Quadro 2 fornece espectros de FTIR do PVA puro em membrana, do EHOP em pó e associado com o PVA em membrana e a mistura física dos dois constituintes, similar ao realizado com a membrana de CMC.



**Quadro 2** FTIR PVA Membrana pura e incorporada com EHOP

Fonte: o autor, Junho 2021

#### 6.4. ENSAIOS DE TRAÇÃO

A tensão máxima na ruptura ( $\sigma$ ) é a resistência oferecida pelo material no ponto de ruptura. A elongação na ruptura ( $\epsilon$ ) trata-se da forma como o material pode deformar-se até a ruptura. O módulo de elasticidade, também conhecido como módulo de Young (E) é um indicador da rigidez do filme. Quanto maior for o módulo, menor será a deformação elástica resultante da aplicação de uma tensão. A Tabela 2 mostra os valores de tensão na ruptura ( $\sigma$ ), elongação na ruptura ( $\epsilon$ ) e Módulo de elasticidade ou de Young (E), para os filmes de CMC e PVA com e sem a adição de EHOP.

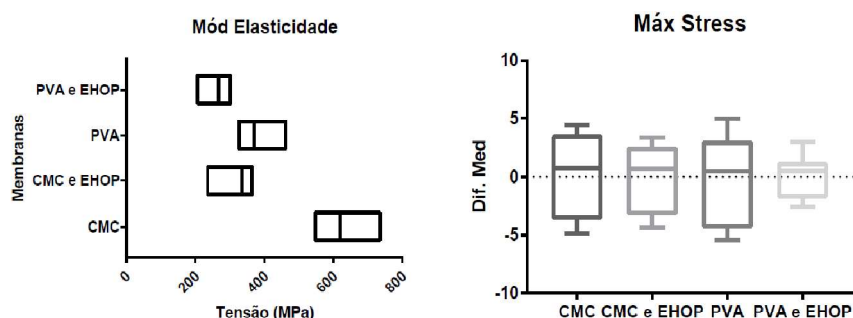
**TABELA 2** – Valores de tensão máxima na ruptura ( $\sigma$ ), alongação na ruptura ( $\epsilon$ ) e Módulo de Young (E) obtidos no ensaio de tração para os filmes de CMC e PVA

| Amostras   | $\sigma$ (MPa)                  | $\epsilon$ (%)                  | E (MPa)                           |
|------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| CMC        | 33,10 $\pm$ (3,73) <sub>a</sub> | 9,18 $\pm$ (2,20) <sub>a</sub>  | 638,61 $\pm$ (67,75) <sub>a</sub> |
| CMC + EHOP | 19,99 $\pm$ (2,83) <sub>b</sub> | 17,49 $\pm$ (3,59) <sub>b</sub> | 321,16 $\pm$ (42,59) <sub>b</sub> |
| PVA        | 31,83 $\pm$ (3,67) <sub>a</sub> | 23,74 $\pm$ (3,49) <sub>b</sub> | 378,18 $\pm$ (42,30) <sub>b</sub> |
| PVA + EHOP | 23,84 $\pm$ (1,75) <sub>b</sub> | 22,09 $\pm$ (2,22) <sub>b</sub> | 263,26 $\pm$ (33,94) <sub>c</sub> |

OBS: Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ )  
 Teste Estatístico ANOVA e comparação múltipla entre os grupos

Fonte: o autor Julho 2022

Demonstrado também graficamente as diferenças das médias de cada grupo, obtido por meio dos valores de tensão máxima na ruptura, alongação na ruptura e Módulo de Young obtidos no ensaio de tração para os filmes de CMC e PVA e ilustrado abaixo



**Gráfico 1.** Representação gráfica da diferença entre os grupos de tensão máxima na ruptura, alongação na ruptura e Módulo de Young ou Elasticidade

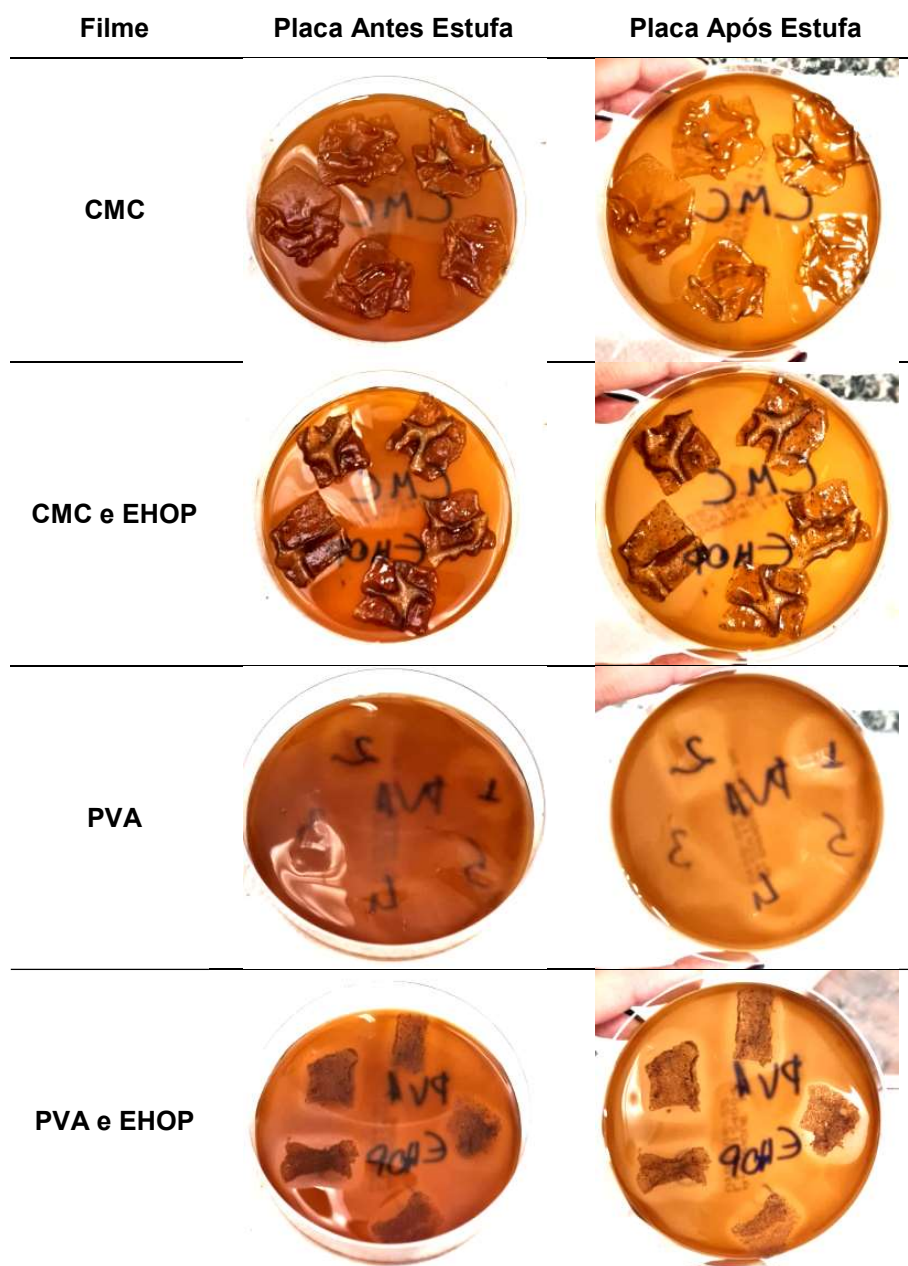
Fonte: o autor, Julho 2022

## 6.5. ENSAIO DE ESTERILIZAÇÃO DOS FILMES

A avaliação de esterilização foi realizada por inspeção visual conforme localização de cada fragmento do filme registrado nas placas no meio de cultura, conforme representado abaixo. Não foi observado nenhum crescimento microbiano antes ou após exposição em luz ultravioleta.

Ressalta-se que o controle positivo Megisorb não foi exposto ao teste devido o mesmo já ser dispensado comercialmente na forma estéril por raios gama, com testes e validações de ausência de microorganismos protocolados pela empresa em

controles de qualidade.



**Figura 8** Imagem de placas e meio de cultura de filmes de CMC e PVA com e sem EHOP  
Fonte: o autor, Setembro 2022.

## 6.6. ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO* PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Os ensaios biológicos foram realizados nos cinco grupos distintos descritos na metodologia. Foram respeitados critérios técnicos de manipulação animal,

calibração dos profissionais envolvidos nos processos experimentais e padronização destes para a elaboração na lesão até a análise histológica das mesmas.

### 6.6.1 Avaliação do Índice de Cicatrização das Lesões (ICL)

Para avaliar a reepitelização das lesões durante os 21 dias de tratamento foi calculado o ICL considerando a área da úlcera (calculada pelo *software* Image J) no início e no último dia de acompanhamento. Os resultados obtidos foram expressos na tabela abaixo, evidenciando em valores negativos o aumento da área lesional após 7 dias de tratamento, exceto o grupo PVA / EHOP

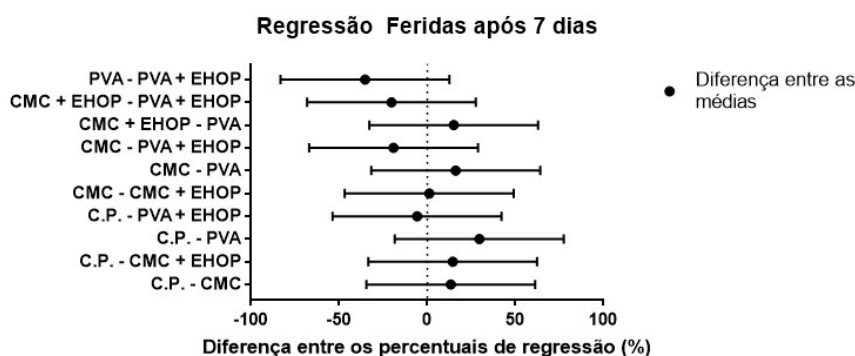
**TABELA 3** – Índice de cicatrização das lesões (ICL) em 7, 14 e 21 dias

| Dias de Tratamento | Grupos de Tratamento (m (%) / SD) |                                   |                                   |                                   |                                 |
|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
|                    | C.P.                              | CMC                               | CMC / EHOP                        | PVA                               | PVA / EHOP                      |
| <b>7 dias</b>      | - 4,49<br>± (8,83) <sub>a</sub>   | - 17,87<br>± (30,91) <sub>a</sub> | - 19,02<br>± (32,02) <sub>a</sub> | - 34,07<br>± (29,34) <sub>a</sub> | 1,26<br>± (16,91) <sub>a</sub>  |
| <b>14 dias</b>     | 68,70<br>± (4,54) <sub>a</sub>    | 73,95<br>± (3,03) <sub>a</sub>    | 68,52<br>± (2,92) <sub>a</sub>    | 47,78<br>± (12,18) <sub>b</sub>   | 53,93<br>± (3,50) <sub>b</sub>  |
| <b>21 dias</b>     | 78,84<br>± (4,85) <sub>ac</sub>   | 86,10<br>± (5,74) <sub>a</sub>    | 81,64<br>± (5,23) <sub>ac</sub>   | 62,87<br>± (7,80) <sub>b</sub>    | 70,87<br>± (5,07) <sub>bc</sub> |

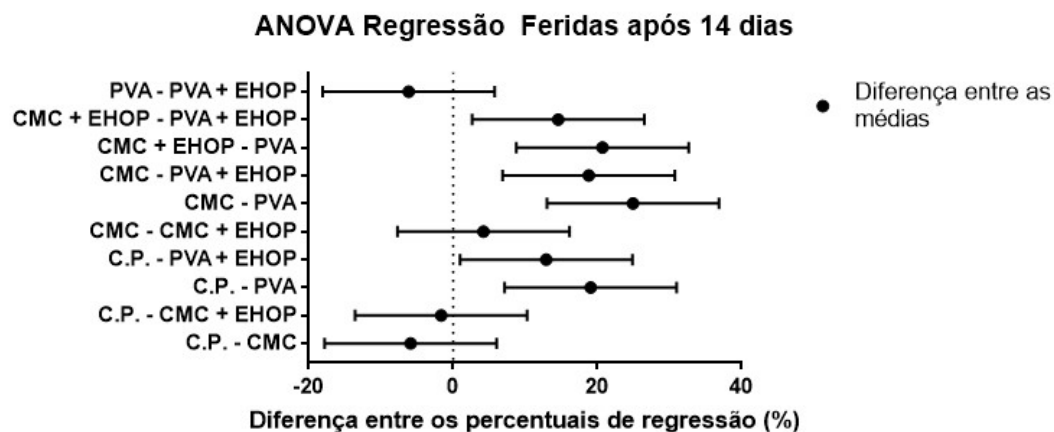
OBS: Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ )  
*Teste Estatístico ANOVA e comparação múltipla entre os grupos*

Fonte: o autor, Agosto 2021

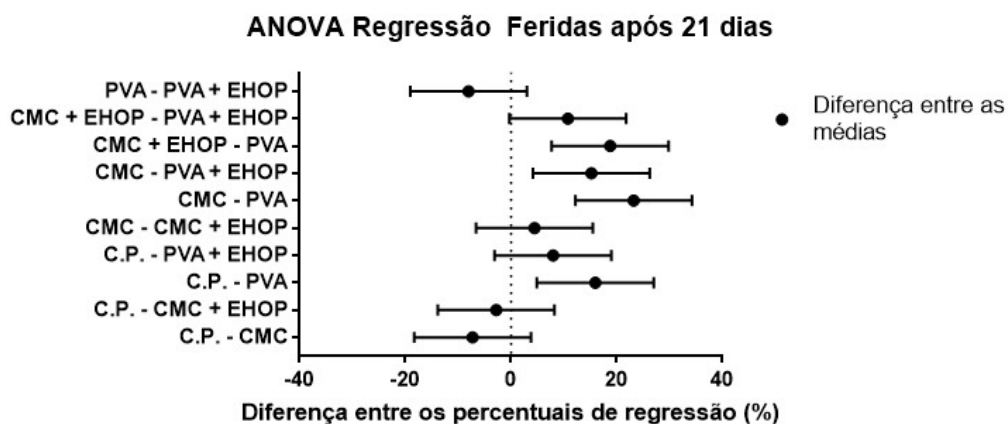
Demonstrado também graficamente as diferenças das médias de cada grupo, obtido por meio do percentual de regressão das feridas conforme os dias de tratamento e ilustrado abaixo.



**Gráfico 2** Índice de cicatrização das lesões (ICL) dos grupos experimentais após 7 dias de tratamento  
 Fonte: o autor, Agosto 2021

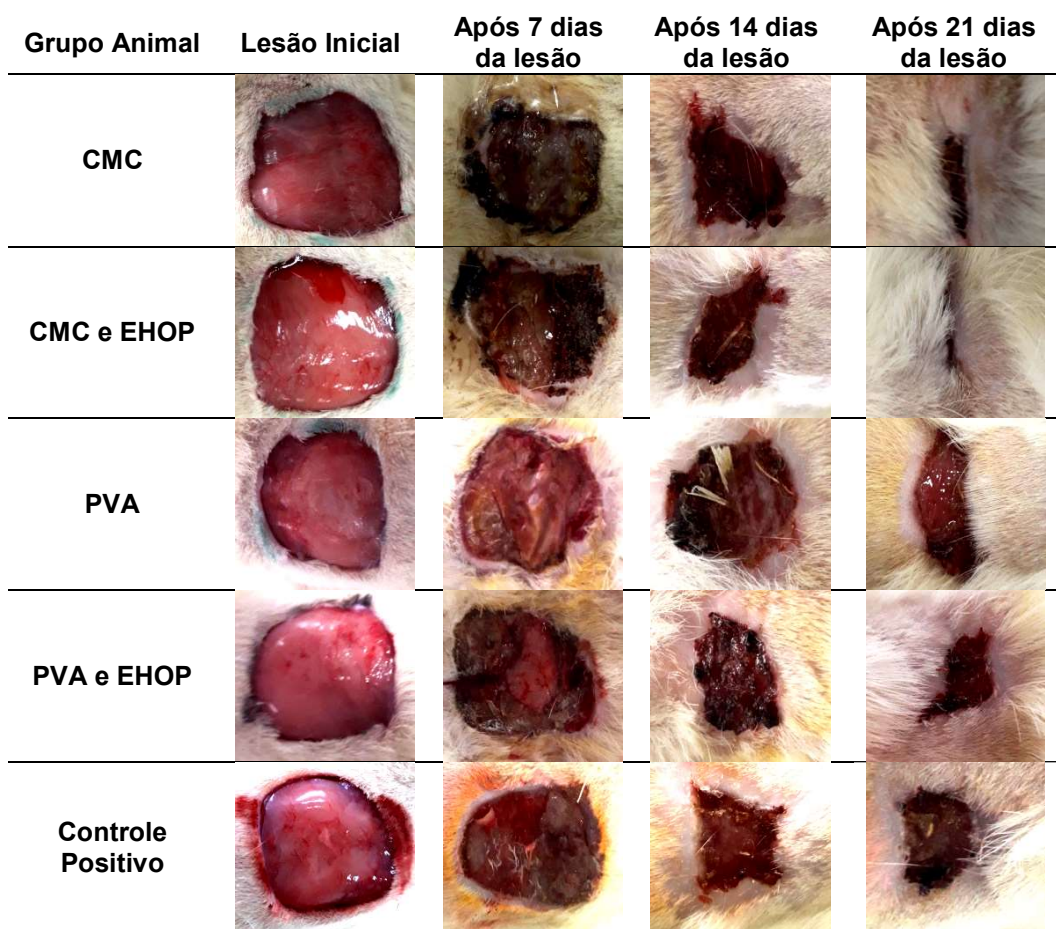


**Gráfico 3** Índice de Cicatrização das lesões (ICL) dos grupos experimentais após 14 dias de tratamento  
 Fonte: o autor, Agosto 2021



**Gráfico 4** Índice de Cicatrização das lesões (ICL) dos grupos experimentais após 21 dias de tratamento  
 Fonte: o autor, Agosto 2021

Em complementação aos gráficos e tabelas, ilustram-se abaixo as fotos realizadas nos animais e diferenças macroscópicas entre os grupos. As imagens são representativas de feridas em ratos Wistar utilizando um aparato de fotografia padrão descrito previamente.



**Figura 9** Aspecto macroscópico de feridas para grupos experimentais em diferentes intervalos de tempo

Fonte: o autor, Agosto 2021.

### 6.6.2. Avaliação histológica das lesões

Os dados histológicos foram coletados de acordo com as fases de cicatrização e organizados de acordo com os escores para quantificação em Inflamação, Angiogênese e Colagênese. Na Tabela 4 é possível observar que as maiores médias nos escores de inflamação foram obtidas pelos grupos que receberam a membrana de CMC e CMC com EHOP nos primeiros 7 dias de tratamento. Observou-se que o controle positivo obteve um valor reduzido e com diferença estatística significativa aos grupos CMC e CMC / EHOP. As membranas de PVA e PVA/EHOP não demonstraram diferença do grupo positivo após 7 dias. Nos próximos dias de tratamento (14° e 21° dias) não houve diferença significativa entre os grupos quando comparados entre si.



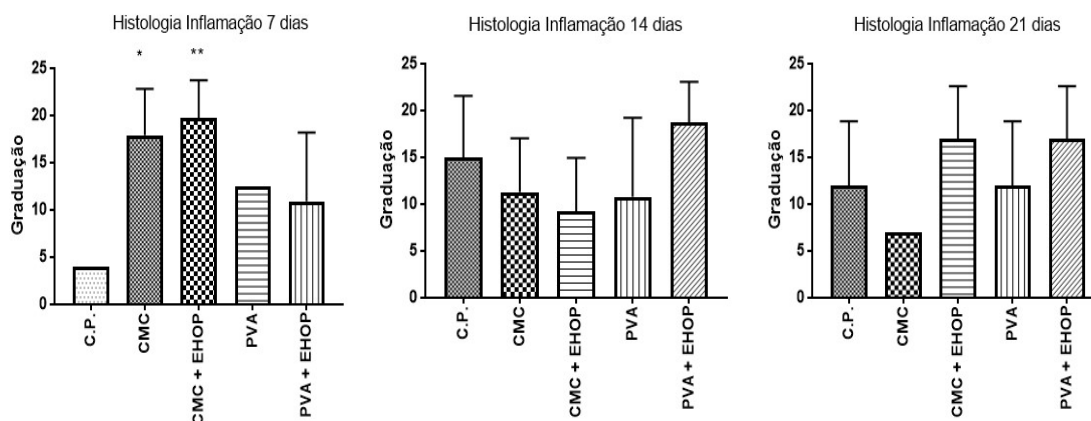
**TABELA 4** – Análise Histológica de inflamação

| Dias de Tratamento | Grupos de Tratamento (Escore de Avaliação – m / sd) |                            |                            |                             |                             |
|--------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                    | C.P.                                                | CMC                        | CMC / EHOP                 | PVA                         | PVA / EHOP                  |
| <b>7 dias</b>      | 1,00 ± (0,00) <sub>a</sub>                          | 2,60 ± (0,55) <sub>b</sub> | 2,80 ± (0,45) <sub>b</sub> | 2,00 ± (0,00) <sub>ab</sub> | 1,80 ± (0,84) <sub>ab</sub> |
| <b>14 dias</b>     | 2,00 ± (0,70) <sub>a</sub>                          | 1,60 ± (0,54) <sub>a</sub> | 1,40 ± (0,54) <sub>a</sub> | 1,60 ± (0,89) <sub>a</sub>  | 2,40 ± (0,54) <sub>a</sub>  |
| <b>21 dias</b>     | 1,40 ± (0,55) <sub>a</sub>                          | 1,00 ± (0,00) <sub>a</sub> | 1,80 ± (0,45) <sub>a</sub> | 1,80 ± (0,55) <sub>a</sub>  | 1,80 ± (0,45) <sub>a</sub>  |

OBS: Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ )  
 Teste Estatístico Kruskal Wallis e comparação múltipla entre os grupos

Fonte: o autor, Agosto 2021

Demonstrado graficamente as diferenças entre os grupos quando avaliado a presença de células inflamatórias na derme dos fragmentos de lesões analisados, conforme a graduação observada nas imagens obtidas por fotomicrografia. As colunas sinalizadas com asteriscos demonstram o valor de p obtido na análise estatística, quando comparado ao grupo controle positivo.

**Gráfico 5** Graduação Histológica de Infalamação após 7, 14 e 21 dias de tratamento

Fonte: o autor, Agosto 2021

Avaliando a Angiogênese dos grupos, podemos observar as maiores médias nos grupos CMC e CMC / EHOP em relação aos outros grupos, com diferença significativa do grupo CMC em relação ao grupo PVA. Nota-se que os demais grupos, com exceção grupo CMC, apresentam angiogênese similar, sem diferença estatística. Observando a angiogênese até o 14º dia podemos afirmar que não houve diferença estatística no desempenho para formação de novos vasos sanguíneos no subcutâneo do fragmento da ferida analisado nesta pesquisa entre os grupos.

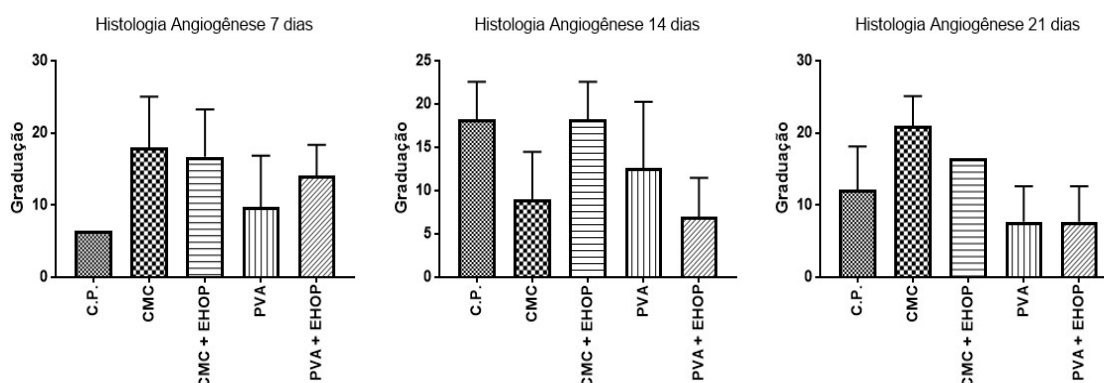
**TABELA 5** – Análise Histológica de Angiogênese

| Dias de Tratamento | Grupos de Tratamento (Escore de Avaliação – m / sd) |                            |                             |                            |                            |
|--------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                    | C.P.                                                | CMC                        | CMC / EHOP                  | PVA                        | PVA / EHOP                 |
| <b>7 dias</b>      | 1,00 ± (0,00) <sub>a</sub>                          | 2,40 ± (0,89) <sub>a</sub> | 2,20 ± (0,84) <sub>a</sub>  | 1,40 ± (0,89) <sub>a</sub> | 1,80 ± (0,44) <sub>a</sub> |
| <b>14 dias</b>     | 2,40 ± (0,55) <sub>a</sub>                          | 1,40 ± (0,55) <sub>a</sub> | 2,40 ± (0,55) <sub>a</sub>  | 1,80 ± (0,84) <sub>a</sub> | 1,20 ± (0,44) <sub>a</sub> |
| <b>21 dias</b>     | 1,60 ± (0,55) <sub>ab</sub>                         | 2,60 ± (0,55) <sub>a</sub> | 2,00 ± (0,00) <sub>ab</sub> | 1,20 ± (0,45) <sub>b</sub> | 1,20 ± (0,45) <sub>b</sub> |

OBS: Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ )  
 Teste Estatístico Kruskal Wallis e comparação múltipla entre os grupos

Fonte: o autor, Agosto 2021

Demonstrado graficamente as diferenças entre os grupos quando avaliado a presença de novos vasos na derme dos fragmentos de lesões analisados, conforme a graduação observada nas imagens obtidas por fotomicrografia.

**Gráfico 6** Graduação Histológica de Angiogênese após 7, 14 e 21 dias de tratamento

Fonte: o autor, Agosto 2021

Quando é observado por meio da avaliação das lâminas pela coloração de Tricômio de Masson para sinalizar a presença de colágeno no leito da ferida, podemos observar que os grupos tiveram produção de colágeno em quantitativo similar até o 14º dia. Destaca-se a presença de grande quantidade de colágenos tipo 1 e 2 nos grupos tratados com CMC e CMC / EHOP em relação aos outros grupos, com diferença significativa do grupo CMC / EHOP em relação ao grupo PVA / EHOP, descritos na tabela 3. Esta presença de colágeno pode significar potencial de retração da ferida e remodelagem.

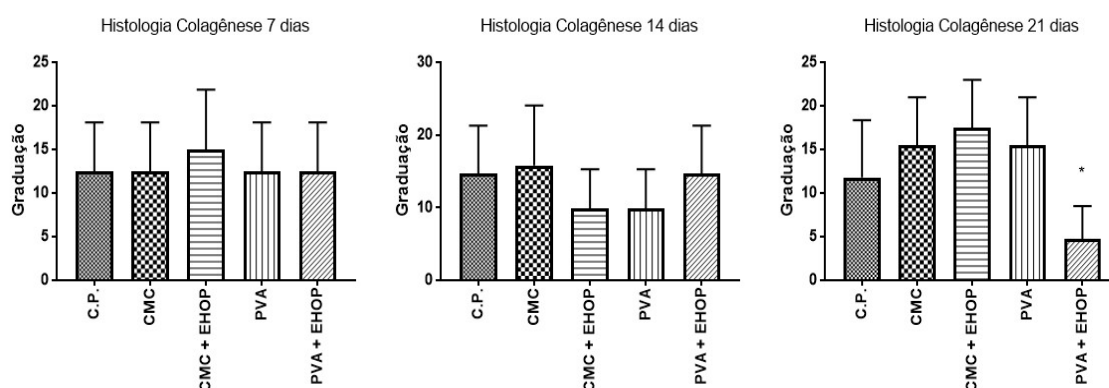
**TABELA 6** – Análise Histológica de Colagênese

| Dias de Tratamento | Grupos de Tratamento (Escore de Avaliação – m / sd) |                             |                            |                             |                            |
|--------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|                    | C.P.                                                | CMC                         | CMC / EHOP                 | PVA                         | PVA / EHOP                 |
| <b>7 dias</b>      | 0,20 ± (0,45) <sub>a</sub>                          | 0,20 ± (0,45) <sub>a</sub>  | 0,40 ± (0,55) <sub>a</sub> | 0,20 ± (0,45) <sub>a</sub>  | 0,20 ± (0,45) <sub>a</sub> |
| <b>14 dias</b>     | 1,60 ± (0,55) <sub>a</sub>                          | 1,60 ± (0,89) <sub>a</sub>  | 1,20 ± (0,45) <sub>a</sub> | 1,20 ± (0,45) <sub>a</sub>  | 1,60 ± (0,55) <sub>a</sub> |
| <b>21 dias</b>     | 2,00 ± (0,71) <sub>ab</sub>                         | 2,40 ± (0,55) <sub>ab</sub> | 2,60 ± (0,55) <sub>a</sub> | 2,40 ± (0,55) <sub>ab</sub> | 1,20 ± (0,45) <sub>b</sub> |

OBS: Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ )  
 Teste Estatístico Kruskal Wallis e comparação múltipla entre os grupos

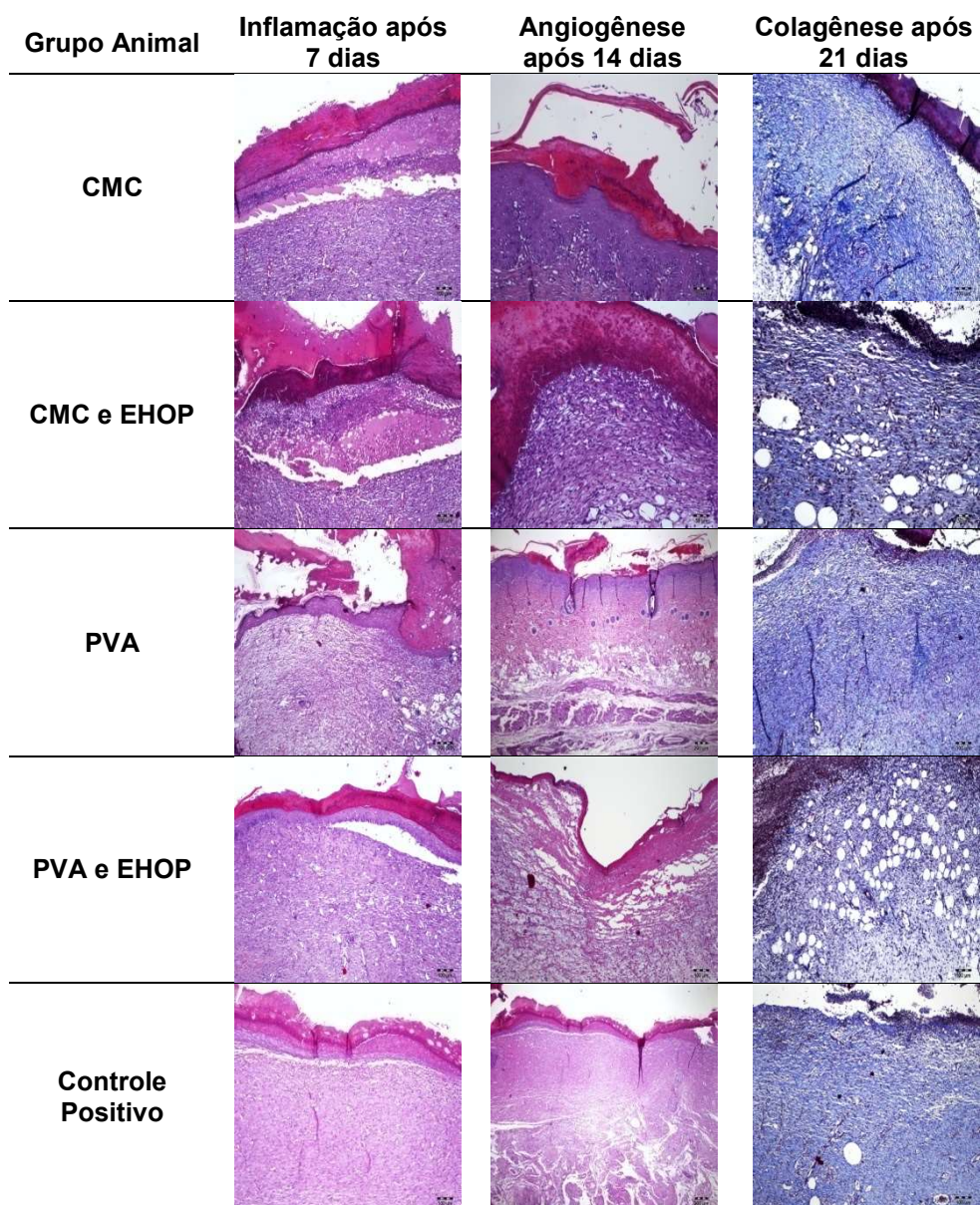
Fonte: o autor, Agosto 2021

Demonstrado graficamente as diferenças entre os grupos quando avaliado a presença de células de colágeno na derme dos fragmentos de lesões analisados, conforme a graduação observada nas imagens obtidas por fotomicrografia.

**Gráfico 7** Graduação Histológica de Colagênese após 7, 14 e 21 dias de tratamento

Fonte: o autor, Agosto 2021

Em complementação aos gráficos e tabelas, ilustram-se abaixo as fotomicrografias realizadas nos animais e diferenças microscópicas entre os grupos. As imagens são representativas da avaliação de fragmento das feridas dos ratos Wistar em grupos distintos por meio de microscopia e colorações descritas previamente.



**Figura 10** Aspecto microscópico de feridas para grupos. Aumento lente microscópio em 10x, coloração Hematoxilina Eosina para inflamação e angiogênese e tricômio de Masson para colagênese.

Fonte: o autor, Agosto 2021.

### 6.6.3. Análise bioquímica de nefro e hepatotoxicidade

A utilização de animais de laboratório é de suma importância nas pesquisas na busca do desenvolvimento da ciência e tecnologia, desde o aperfeiçoamento dos métodos de prevenção, diagnóstico até o tratamento de diversas doenças. Por essa razão, o conhecimento dos valores dos diferentes parâmetros fisiológicos, como função hepática e renal é significativo para a avaliação de modificações induzidas por testes experimentais e permite avaliar através dos resultados obtidos a

confiabilidade na aplicação de um composto livre de potencial tóxico ao ser vivo. Os resultados estão demonstrados na tabela abaixo, sendo expressados os dados de Uréia e Creatinina em mg/dL; transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) em UI/L.

**TABELA 7** – Avaliação bioquímica dos grupos em Nefro e Hepatotoxicidade

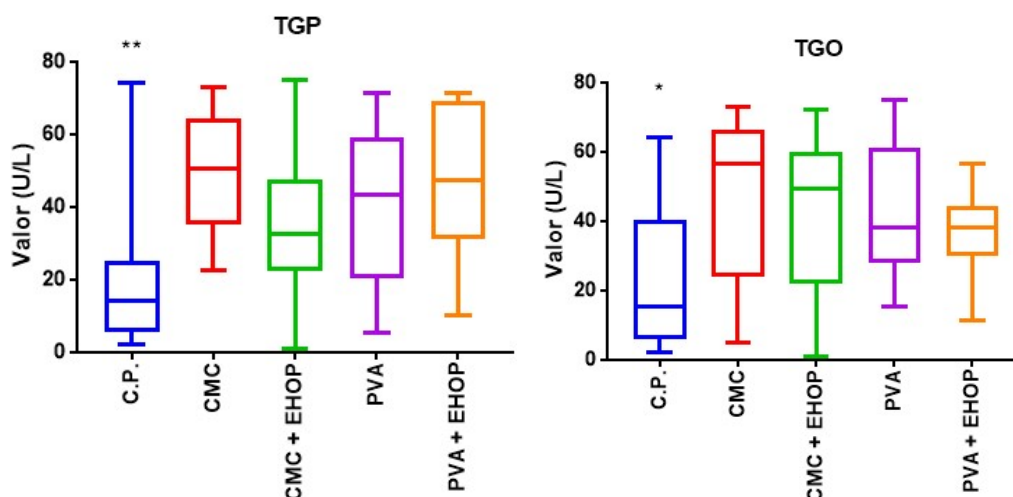
| Grupo Animal      | Uréia (mg/dL)                 | Creatinina (mg/dL)           | TGO (UI/L)                    | TGP (UI/L)                    |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                   | Média +- dP                   | Média +- dP                  | Média +- dP                   | Média +- dP                   |
| <b>Positivo</b>   | 37,00 ± (6,72) <sup>a</sup>   | 0,324 ± (0,054) <sup>a</sup> | 69,80 ± (20,16) <sup>a</sup>  | 49,87 ± (14,20) <sup>a</sup>  |
| <b>CMC</b>        | 43,87 ± (5,60) <sup>b</sup>   | 0,329 ± (0,042) <sup>a</sup> | 95,13 ± (23,78) <sup>b</sup>  | 67,20 ± (10,39) <sup>b</sup>  |
| <b>CMC / EHOP</b> | 42,00 ± (8,29) <sup>ab</sup>  | 0,302 ± (0,063) <sup>a</sup> | 86,33 ± (25,47) <sup>ab</sup> | 59,93 ± (16,75) <sup>ab</sup> |
| <b>PVA</b>        | 44,13 ± (10,95) <sup>ab</sup> | 0,337 ± (0,091) <sup>a</sup> | 95,27 ± (28,85) <sup>ab</sup> | 62,93 ± (12,48) <sup>ab</sup> |
| <b>PVA/EHOP</b>   | 37,43 ± (4,05) <sup>ab</sup>  | 0,352 ± (0,050) <sup>a</sup> | 82,43 ± (10,07) <sup>ab</sup> | 66,43 ± (14,06) <sup>b</sup>  |

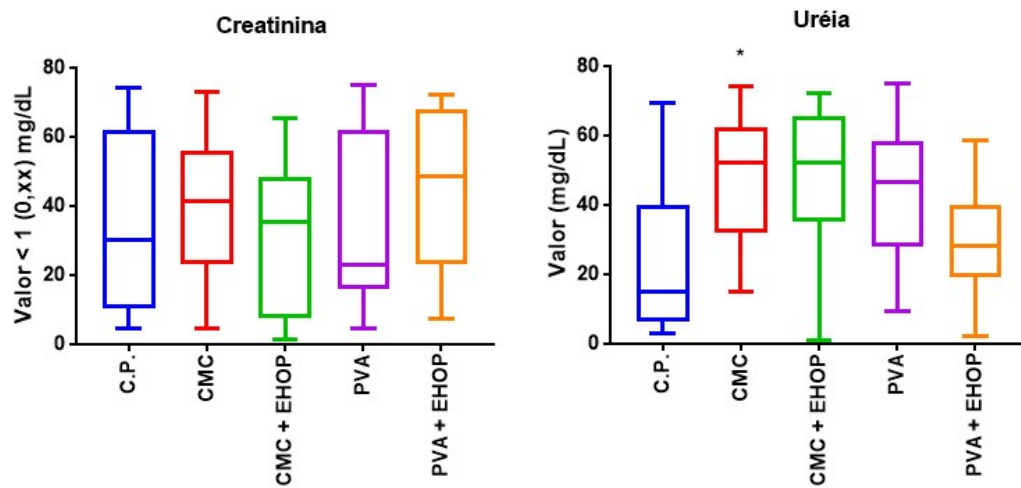
OBS: Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística (p<0,05) Teste Estatístico Kruskal Wallis e comparação múltipla entre os grupos

Fonte: o autor, Outubro 2021

As análises foram obtidas através do Autoanalisador Winier Lab CT 300i, com testes de calibração e controles de qualidades prévias, estes realizados no Laboratório Escola da UEPG.

Ao analisar os valores de uréia, podemos observar uma maior média no grupo CMC e menor média no grupo Positivo com diferença significativa. Na análise de dosagem de creatinina, notamos maiores médias no grupo PVA e menor média no grupo CMC / EHOP, sem diferença estatística entre estes. Observa-se diferença estatística entre os grupos Positivo e CMC quando avaliado TGO e os grupos Positivo, CMC e PVA / EHOP quanto ao TGP, e demonstrados graficamente abaixo.





**Gráfico 8** Análise bioquímica de nefro e hepatotoxicidade de animais tratados com os grupos  
Fonte: o autor, Outubro 2021

## 7. DISCUSSÃO

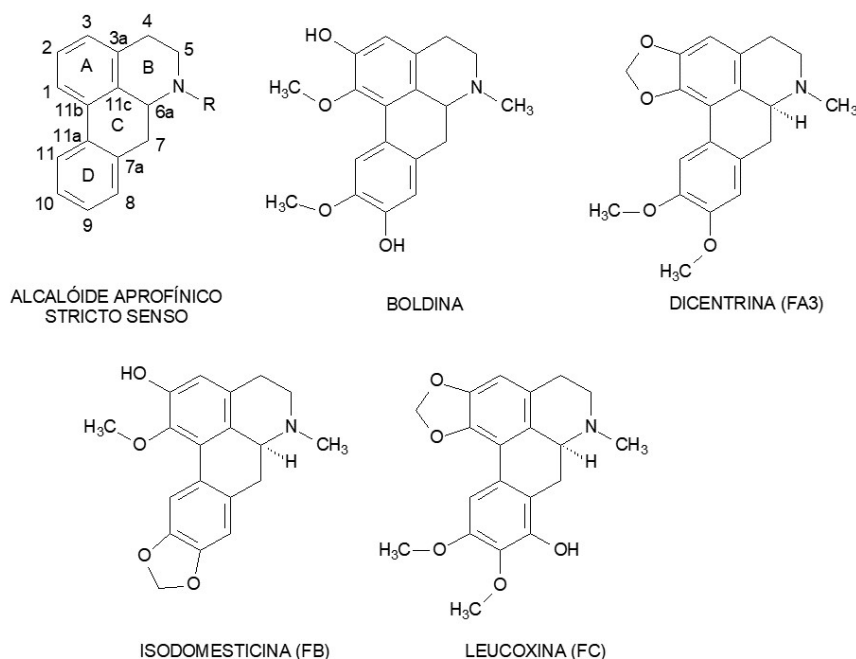
A extração hidroalcoólica realizada durante as etapas prévias ao estudo foi realizada com o objetivo de proporcionar um rendimento de extração adequado, assim como proporcionar a manutenção das características fitoquímicas desse extrato e seu potencial farmacológico. Estudos similares de pesquisas com mucilagens em geral, como do tubérculo de *Colocasia esculenta* (L.) Schott (inhame) (TAVARES *et al.*, 2011), das folhas de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (palma forrageira) (QUEIROZ *et al.*, 2013), das sementes de *Salvia hispanica* L. (chia) (EDUARDO CAMPOS *et al.*, 2015) e das cascas de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. (angico) (MARINHO *et al.*, 2022) realizaram técnicas similares a este estudo, com ótimos resultados em suas pesquisas.

A composição mucilagínosa e com características reológicas ideais para formação de filmes (comportamento pseudoplástico) indicou um potencial para que a mucilagem de *Ocotea puberula* extraída pelo processo hidro-alcoólico (EHOP) fosse incorporado a um sistema de liberação controlada e mucoadesivo ao leito da ferida, proporcionando assim uma ação prolongada e duradoura dessa provável capacidade cicatrizante descrita em estudos prévios. Sendo assim, a incorporação do composto ativo e posterior reticulação destaca-se como uma opção promissora para a elaboração de membranas com fitoterápicos de baixa adesividade a superfícies, quando comparado a outros métodos descritos em literatura (HAILE *et al.*, 2020; STEPIEN *et al.*, 2021; TOSIF *et al.*, 2021)

Buscando estratégias para confirmar a biocompatibilidade entre os polímeros utilizados para formação da membrana, o reticulador e o extrato (mucilagem) das cascas de *Ocotea puberula*, foi realizada avaliação de compatibilidade e manutenção de compostos inertes quando reticulados por meio de interpretação e discussão dos espectros obtidos dos compostos puros e misturados com PVA e CMC e analisados por FTIR. Observa-se na membrana de CMC picos de deformação axial de COOH em proximidades de  $1735\text{ cm}^{-1}$ , estes presentes na membrana pura e também na incorporação do EHOP. Nota-se também expresso similaridade entre os compostos isolados e mistura em proximidades de  $1593\text{ cm}^{-1}$  em relação à deformação simétrica de ânion carboxilato tanto na membrana pura como incorporada com o EHOP.

Quando interpretado o espectro do EHOP isolado, nota-se presente

componentes em comprimento de onda de  $1042\text{ cm}^{-1}$  podendo ser justificado como estiramento forte de C-O ( $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ ), presente em estrutura química de diversos alcaloides aporfínicos de *Ocotea puberula* como a boldina, dicentrina, isomesticinina e leucoxina, ilustrados na figura 11 (LOPES *et al.*, 2004, ZANIN *et al.*, 2011, CAPANEMA *et al.*, 2018, PEREWALO *et al.*, 2021).



**Figura 11** Estrutura dos alcaloides aporfínicos stricto sensu e de folhas de espécimes adultos de *Ocotea puberula*

Fonte: ZANIN, S. M. W. *et al.* **Mudas de *Ocotea puberula* (Lauraceae): identificação e monitoramento de alcaloides aporfínicos**. Rev Quim. Nova, Vol. 34, No. 5, pág 743, 2011

Observa-se nos deslocamentos das bandas e conformação das mesmas em relação às membranas de CMC um alto potencial higroscópico, proporcionando na análise a incorporação de grande quantidade de água nos constituintes da membrana e modificando a polaridade, podendo interferir na interpretação da análise das bandas desta membrana. Entretanto, podemos observar que há um alargamento no espectro no comprimento de onda de  $1715\text{ cm}^{-1}$  e distorção em comprimento de onda de  $3500\text{ cm}^{-1}$ , quando comparado à mistura física sem formação de membrana. Em suma, a incorporação de EHOP na membrana não demonstrou estabilidade química adequada, quando avaliado por FTIR, porém o fato de higroscopia do CMC pode ter interferido significativamente neste resultado.

Já em relação ao outro polímero aplicado nos modelos de lesões murinos, a



membrana de PVA sinalizou tanto na formulação isolada ou em associação espectros comprimento de onda de  $3550\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$  os estiramentos largos de O-H (ácido carboxílico). Também está presente em proximidades de  $2936\text{ cm}^{-1}$  o estiramento curto de C-H em grupos alquil para o EHOP e para C-H de aldeídos presentes na membrana de PVA reticulado com glutaraldeído. Avaliando o EHOP isolado, nota-se presente componentes em comprimento de onda de  $1042\text{ cm}^{-1}$  podendo ser justificado como estiramento forte de C-O ( $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ ), presente em estrutura química de diversos alcaloides aporfinóides (LOPES, 2004, MANSUR, 2008, XAVIER *et al.*, 2020).

Em análise das bandas e conformação das mesmas nos espectros para PVA e PVA / EHOP, observa-se grande similaridade nos espectros apresentados, podendo ser sugerido que a adição dos compostos em forma de membrana e reticulados com glutaraldeído mantiveram suas características químicas iniciais em análise por FTIR. Expressa-se um menor potencial higroscópico comparado à membrana de CMC, podendo inferir por esta análise um potencial de incorporação de EHOP em PVA para formar membranas para serem aplicadas na assistência à saúde, com estabilidade química após incorporação dos constituintes em uma membrana única, assim como realizado com outros compostos e fitoterápicos (SANTOS *et al.*, 2019, JAFARI *et al.*, 2021).

Observando essa busca por membranas aplicáveis a ferimentos irregulares ocasionados por diversas causas, o ensaio de tração elucida o potencial de tensão e resistência dos pensos quando manuseados ou aderidos ao leito da lesão (NADA *et al.*, 2018; RAZ *et al.*, 2019). Nesta ótica, o ensaio desta pesquisa conseguiu sinalizar um potencial do EHOP em inferir características elásticas nas membranas isoladas, em especial à CMC, visto que a avaliação reológica isolada do EHOP demonstra características pseudo-plásticas (ARCARO, 2018).

Neste ensaio de tração realizado, esse efeito do EHOP na CMC foi causado pela ação do EHOP que interage com a matriz e entra em meio às cadeias poliméricas separando-as e dando mais mobilidade ao polímero. Em relação ao Módulo de Young, novamente a membrana de CMC com EHOP apresentou um valor de E maior, diferente da membrana de PVA com EHOP, o que indica que a presença do EHOP produziu mobilidade nas cadeias poliméricas de CMC, fazendo com que as amostras suportem uma tensão maior que as demais, antes de sofrer uma deformação plástica ou permanente, similar a outros compostos quando

associados a produtos plastificantes ou pseudo-plásticos (LI *et al.*, 2019; HOSSEINE *et al.*, 2021).

Já a membrana de PVA e EHOP não foi reproduzível essa interação nas cadeias poliméricas, podendo ser explicado pela hipótese de formação de duas fases na membrana, sem modificar as cadeias poliméricas, ocasionando pouca interação entre os compostos, explicando a perda de propriedades elásticas e tensionais da membrana de PVA com EHOP, bem como não suportar elevadas tensões previamente deformação plástica ou ruptura, quando comparada à membrana de PVA. Tal propriedade apresentada nesta associação PVA e EHOP decai em piora de características ideais de curativos para pele de resistência à tração e fricção, bem como mobilidade (ZHANG *et al.*, 2017, SHI *et al.*, 2020).

Em continuidade à busca por características ideais de curativos para feridas, as coberturas livres de agentes patógenos configura-se como essencial no manejo e tratamento de lesões, Sendo assim, a avaliação de esterilidade das membranas pode confirmar essas características. Infere-se a ausência de crescimento microbiano nas membranas previamente aplicação de raios UV devido ao processo de limpeza das membranas com álcool pela técnica de formulação por espalhamento, demonstrado pela ausência de crescimento microbiano nas membranas. Notou-se também que a aplicação da radiação UV não modificou características visuais ou mecânicas das membranas, favorecendo o potencial de esterilização e utilização comercial desta técnica como baixo custo e acessível aos serviços públicos (PEDROSO *et al.*, 2018; COUTO *et al.*, 2021).

Buscando avaliar o potencial cicatrizante destas membranas de CMC e PVA e incorporadas com o EHOP, foi realizada a aplicação das membranas em modelos de lesão de pele, conforme proposto por Barreto *et al.*, 2013. Observa-se que as feridas dos murinos são altamente exsudativas e os animais não conseguem manter a membrana inerte sem uma cobertura secundária, sendo neste estudo aplicado uma fixação de todas as membranas estudadas com esparadrapo. Neste sentido, pode-se observar durante retirada dos curativos após 7 dias uma saturação significativa e grande quantidade de exsudato nos produtos aplicados, proporcionando um manejo de umidade ineficaz, podendo inferir diferença da recuperação da área lesionada em 21 dias, assim como no potencial da mucilagem em cicatrização. Em estudos similares, descrevem desafios e estratégias no manejo de modelo experimental de feridas em ratos durante a aplicação de compostos cicatrizantes (GONÇALVES *et*

*al.*, 2017; NUN *et al.*, 2020; KOUR *et al.*, 2021).

Em análise do índice de cicatrização das lesões, calculado pela diferença da área da lesão obtida por meio de registro fotográfico padronizado das lesões e cálculo pelo Image J, podemos notar um aumento da área de lesão nas membranas de CMC, CMC / EHOP e PVA, assim como na membrana de Melgisorb Ag (controle positivo). A membrana de PVA /EHOP teve comportamento ideal para retração da lesão com diferença significativa da membrana de PVA pura, porém sem diferença significativa quando comparada com os demais grupos.

A associação da mucilagem com a membrana de PVA e o potencial antiinflamatório dos alcaloides de *Ocotea puberula* podem ter inferido melhor resposta ao estágio inicial da cicatrização (resposta inflamatória). Estudos similares com mucilagens e cicatrização demonstram o potencial destes fitoativos na aplicação em feridas e lesões (STEPIEN *et al.*, 2021; TOSIF *et al.*, 2021). Ressalva que o controle inadequado da umidade do leito da ferida favorece a maceração (deterioração branca em torno da borda da ferida) das lesões, sendo o manejo adequado da umidade uma das principais estratégias para tratamento de feridas (CAMPOS *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2018; COUTINHO *et al.*, 2020; GUSHIKEN *et al.*, 2021).

Após 14 dias, a totalidade dos grupos obtiveram redução da área de lesão em mais de 50%, observando melhor desempenho mantido no grupo CMC, porém com diferença significativa de todos os grupos com os tratados com PVA / EHOP. Ao final de 21 dias de tratamento, os modelos experimentais dos grupos CMC e CMC / EHOP obtiveram melhores respostas para cicatrização e o grupo CMC puro diferiu significativamente dos grupos PVA e PVA / EHOP, e os grupos Controle Positivo e CMC / EHOP foram significativamente melhores no reparo tecidual do grupo PVA.

Os sistemas controlados de liberação de fitoterápicos ou medicamentos demonstra uma busca constante e desafio em diversas pesquisas científicas, visto que a manutenção do bioativo por tempo prolongado no leito da ferida favorece as condições ideais para cicatrização, que pode ser a modulação inflamatória, efeito nociceptivo (controle da dor), atividade antibacteriana, biomarcador celular, dentre diversas estratégias validadas para proporcionar o manejo ideal de lesões (CHILDS & MURPHY, 2017; RAKEL *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2018; MURRAY *et al.*, 2019; TOTTOLI *et al.*, 2020).

Buscando avaliar o efeito histológico da aplicação das membranas, em

especial a diferença entre a utilização dos polímeros isolados e em associação com o EHOP, foi realizada a coleta de fragmento das lesões, colorações de acordo com literaturas e fotomicrografias para análise de inflamação, formação de novos vasos e presença de colágeno, sendo estas características definidoras para proporcionar a cicatrização de lesões (DUMAN *et al.*, 2018; BAHADORIAN *et al.*, 2020; RAJOO *et al.*, 2021).

Os dados histológicos foram coletados de acordo com as fases de cicatrização e organizados de acordo com os escores para quantificação. Em relação ao escore de inflamação, observa-se uma modulação inflamatória significativa do Controle Positivo durante os primeiros 7 dias de tratamento da lesão, fato este explicado pelo potencial antimicrobiano conferido à membrana de Melgisorb Ag, onde a prata liberada ao leito da ferida confere redução de atividade de microorganismos, consequentemente reduzindo resposta inflamatória ao leito da ferida (FRANCO *et al.*, 2018; PAVLIK *et al.*, 2019; GRASSI *et al.*, 2021). Após os sete dias, a análise histológica não demonstrou diferença significativa entre os grupos

Em contrapartida, a angiogênese avaliada pela histologia dos fragmentos de lesões entre os grupos, pode observar as maiores médias nos grupos tratados com CMC e CMC / EHOP, com destaque para este grupo. Nota-se também a manutenção na formação de novos vasos do grupo de CMC incorporado com EHOP após 14 dias, quando comparado isoladamente ao grupo CMC. Os animais tratados com as membranas de PVA foram os que tiveram pior desfecho em relação à angiogênese, com diferença significativa aos demais grupos após 21 dias de tratamento.

Observa-se relação entre a angiogênese e o índice de cicatrização das lesões, sendo possível sugerir a associação entre o estímulo da angiogênese com a cicatrização neste estudo. Como hipótese para esta questão, podemos esperar que a atividade de modulação inflamatória dos alcaloides presentes no EHOP foram biologicamente ativos nos grupo CMC / EHOP, porém não tiveram sua atividade moduladora no grupo PVA / EHOP, talvez pela baixa interação entre estes compostos na membrana, impedindo sua liberação controlada ao leito da ferida.

No manejo e tratamento de lesões, a angiogênese desempenha um papel vital na proliferação de células epiteliais. A regeneração dos vasos sanguíneos é um importante índice de avaliação da velocidade de cicatrização de feridas (UD-DIN *et*

*al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017). Existem evidências que também sugerem que a angiogênese e a inflamação são codependentes, fato este observado nos grupos estudados. A angiogênese é fundamental para o reparo de lesões, pois são estes novos vasos que fornecem nutrição e oxigenação aos tecidos em regeneração, sendo que os fitoterápicos podem exercer papel crucial nesse estímulo, especialmente os polifenóis, alcaloides, terpenóides e taninos (HUANG *et al.*, 2020; LEITE *et al.*, 2020).

Em avaliação dos estágios de cicatrização das lesões, após a fase proliferativa, ocorre a remodelagem, que é uma etapa em que há toda modificação da matriz extracelular, favorecendo a contração da área lesionada e reepitelização com um tecido regenerado. Para isto, é crucial que seja analisado histologicamente a concentração de colágeno nesta matriz extracelular (colagênese) como um marcador de evolução da cicatrização. Em relação aos grupos avaliados, observou-se um aumento progressivo e esperado da colagênese com a coloração de tricômio de masson (COSTA *et al.*, 2019). Excetua-se desse aumento progressivo o grupo tratado com PVA e EHOP após 21 dias, com possível causa para essa redução a redução de resposta inflamatória e angiogênese prévia, inibindo a nutrição e oxigenação adequada para a formação das fibras neste grupo.

A remodelação, que começa em duas a três semanas após o início da lesão, tem por objetivo central de alcançar a resistência máxima à tração da área lesionada por meio da reorganização, degradação e modificação da matriz extracelular. Nesta fase busca-se recuperar a estrutura prévia da pele e o de granulação é gradualmente remodelado, formando uma camada cicatricial que exhibe um progressivo aumento da sua concentração de fibras de colágeno (LEITE *et al.*, 2020; GOLMOHAMMADI *et al.*, 220).

Observando o potencial evidenciado destas membranas para cicatrização das lesões, especialmente as membranas de CMC reticuladas e impregnadas com fitoativo das cascas da *Ocotea puberula*, há necessidade de avaliar os riscos e toxicidade oriundos da aplicação tópica deste fitoterápico. Neste sentido, os estudos toxicológicos funcionam com um pilar central que sustenta a viabilidade de aplicação de novos fitomedicamentos, visto que antecipam riscos e, portanto, reduzem a probabilidade de interferência no metabolismo celular de maneira prejudicial à saúde do indivíduo, bem como seguir as legislações vigentes de pesquisas envolvendo produtos para a saúde (LEMOS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021).

Para avaliar a toxicidade do extrato, buscou-se analisar através de exames bioquímicos de função renal e hepática, órgãos comumente afetados por toxicidade de fitoterápicos. Para isso, buscou-se em literaturas científica escassas os valores de referência para estes exames em murinos, sendo que obteve-se na avaliação bioquímica valores maiores de uréia, TGO e TGP para CMC (diferente significativamente do controle positivo) e valores similares de creatinina. O único grupo com EHOP que obteve valores maiores que o controle positivo foi o PVA / EHOP na avaliação de TGP, porém todos os valores dentro da normalidade esperada, conforme relatado por estudos de validação de valores bioquímicos de referência para estes exames (DANTAS *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2012).

Podemos assim sugerir que as análises bioquímicas não evidenciaram potencial nefrotóxico ou hepatotóxico ao aplicar sob as lesões dos ratos testados nesta pesquisa, sendo que os estudos realizados apontam para uma nova perspectiva de aplicação de um produto atóxico, de baixo custo, fácil aplicação e com grande potencial para o tratamento de lesões.

Entretanto, há necessidade de realizar estudos complementares de toxicidade seguindo melhores práticas e recomendações de legislação vigente, com o objetivo de proporcionar e viabilizar estudos clínicos em populações específicas, assim como novas abordagens de avaliação e caracterização dos componentes químicos presentes na mucilagem, descrevendo esses apontamentos como limitação da pesquisa.

## 8. CONCLUSÃO

O presente estudo com a aplicação do extrato hidroalcoólico da mucilagem das cascas da canela-guaicá (*Ocotea puberula*) em membranas para cicatrização de lesões chegou às seguintes conclusões:

- O desenvolvimento das membranas com os polímeros de CMC e PVA mantiveram características macroscópicas e de manuseio ideais para aplicação em lesões;
- A análise das interações do EHOP com os polímeros por FTIR demonstrou maior estabilidade da mistura PVA / EHOP;
- O ensaio de tração sinalizou melhoria de características de maleabilidade e resistência à tração das membranas de CMC quando incorporadas com o EHOP;
- A avaliação do índice de cicatrização das membranas de CMC, PVA e suas associações com EHOP inferiram em melhor resposta de retração da lesão quando utilizado o CMC;
- Seguindo avaliação do estudo *in vivo*, a formulação de CMC e CMC / EHOP proporcionou melhor ação na angiogênese e colagênese, porém sem resposta inicial inflamatória, apresentado no controle positivo.
- A avaliação de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade demonstrou segurança na utilização deste extrato em feridas.

Assim sendo, a aplicação de membranas de CMC com EHOP em lesões exsudativas são seguras, com características físicas ideais, e proporcionam atividade cicatrizante, em especial o estímulo à angiogênese e colagênese, sendo um produto promissor para aplicação em terapias tópicas a feridas, em especial nas condições de lesões crônicas vasculogênicas, visto seu potencial fitoterapêutico em um sistema controlado e com aderência ao leito da ferida, quando associado à CMC.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, A.C. *et al.* Current and emergent strategies for disinfection of hospital environments. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Access published July 18,2013
- ALVEN, S. *et al.* Polymer-Based Materials Loaded with Curcumin for Wound Healing Applications. **Polymers** 2020, 12, 2286; doi:10.3390/polym12102286
- ARAUJO, A. J. **Estudo fitoquímico das folhas de Ocotea puberula(Reich.) Nees (LAURACEAE)** Dissertação apresentada como requisito parcialà obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba / PR 2000
- ARCARO, G. **Mucilagem de Ocotea puberula (Rich.) NEES.: desenvolvimento de um fitomedicamento e testes “in vivo” para cicatrização de feridas.** 2018. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.
- BAHADORAN, M ; SHAMLOO, A ; NOKOORANI, Y. D.I. Development of a polyvinyl alcohol/sodium alginate hydrogel-based scaffold incorporating bFGFencapsulated microspheres for accelerated wound healing. **Scientific Reports** | (2020) 10:7342 | <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64480-9>
- BAGHAIE, S., *et al.* Wound healing properties of PVA/ starch /chitosan hydrogel membranes with nano Zinc oxide as antibacterial wound dressing material. **Journal of Biomaterials Science**, Polymer Edition, 2017. DOI: 10.1080/09205063.2017.1390383
- BARBOSA, H *et al.* Interaction of dicentrinone, an antitrypanosomal aporphine alkaloid isolated from *Ocotea puberula* (Lauraceae), in cell membrane models at the air-water interface, **Bioorganic Chemistry**, Volume 101, 2020, 103978, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103978>.
- BIANCHERA, *et al.* The Place of Biomaterials in Wound Healing. **Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications**, p. 337–366. 2020 1ª Ed. doi:10.1002/9781119433316.ch15
- BROCKE, T.; BARR, J. The history of wound healing. **Surg Clin N Am**, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2020.04.004>
- BROTTO, M. L. **Estudo Taxonômico Do Gênero Ocotea Aubl. (Lauraceae) Na Floresta Ombrófila Densa No Estado Do Paraná**, Brasil. Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba / PR 2010
- CAETANO, G. F. **Biomembrana de quitosana-alginato na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia ESP / Instituto Butantan /IPT para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. 89 pag. Universidade de São Paulo USP, São Paulo, 2012
- CALLISTER JR., W. D; RETHWISCH,D.G. **Ciência e Engenharia dos Materiais: Um introdução**, 8ª ed, Rio de Janeiro: LTC, 2015
- CAMPOS, A. A. G; MORE, L. F.; ARRUDA, S. S. Protocolo de cuidados de feridas.



**Secretaria Municipal de Saúde.** Florianópolis/ SC 2016

CAPANEMA, N. S. V. Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PEG hydrogels for potential wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules** Volume 106, January 2018, Pages 1218-1234. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.124>

CAPELLA, S. O. *et al.* Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arq. Bras. Med. Vet Zootec.**, v.68, n.1, 104-112, 2016

CASTELO BRANCO NETO, M. L. *et al.* Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. Sup.2, p. 17-22, 2006.

CHAVES, F. M. Propriedades dinâmica, termodinâmica e estrutural da água e do metanol por simulação de dinâmica molecular. 2015. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

CHEN S., GIL C.J., NING L., JIN L., PEREZ L., KABBOUL G., TOMOV M.L. and SERPOOSHAN V. Adhesive Tissue Engineered Scaffolds: Mechanisms and Applications. **Front. Bioeng. Biotechnol.** (2021) 9:683079. doi: 10.3389/fbioe.2021.683079

CHIBANTE, C. L. P.; ESPÍRITO SANTO, F. H.; SANTOS, T. D. Perfil de clientes hospitalizados com lesões cutâneas. **Revista Cubana de Enfermería**, Vol. 31, Núm. 4 2015.

CHILDS, D. R.; MURTHY, A. S. Overview of wound healing management. **Surg Clin N Am** 97, p. 189–207, 2017 <http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2016.08.013>

CNCFlora. Ocotea puberula in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 **Centro Nacional de Conservação da Flora.** Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Ocotea puberula](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Ocotea%20puberula)>. Acesso em 1 março 2023.

COUTINHO, N. F.L.; BEZERRA, S. M. G; BRANCO, N. F. L. C.; CARVALHO, M. R. D.; ROCHA, K; FERREIRA, L. F. O.; ROCHA, E. S. B. Ferramenta TIME para avaliação de feridas: concordância interobservador. ESTIMA, **Braz. J. Enterostomal Ther.**, 18: e1720, 2020. [https://doi.org/10.30886/estima.v18.875\\_PT](https://doi.org/10.30886/estima.v18.875_PT)

COUTO, J. F.; SILVA, M. S. da; MACHADO, W. C. A.; TYRREL, M. A. R. .; COUTO, F. F.; NUNES, M. A. S. .; FIGUEIREDO, N. M. . A. de. Disinfection based on ultraviolet-c radiation: a bibliometric study in the international context. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. e46910111785, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i1.11785.

CUSTÓDIO, D. L.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Lauraceae alkaloids **Rev.RSC Adv.**, Vol. 4, pág 21864 – 21890 DOI: 10.1039/c4ra01904k 2014

DA, L. C.; HUANG, Y. Z.; XIE, H. Q. Progress in development of bioderived materials for dermal wound healing. **Regenerative Biomaterials**, 2017, 325–334 doi: 10.1093/rb/rbx025

DAN, M. M. *et al.* Wound Healing: Concepts and Updates in Herbal Medicine. **International Journal of Medical Research & Health Sciences**.V. 7, n. 1, p. 170-181. 2018

DAUNTON, C, KOTHARI S, SMITH L & STEELE D. A history of materials and practices for wound management. **Wound Practice and Research**. V. 20, n. 4, p. 174-186, 2012.

DUMAN, N. *et al.* Topical folinic acid enhances wound healing in rat model, **Advances in Medical Sciences**, Volume 63, Issue 2, 2018, Pages 347-352, <https://doi.org/10.1016/j.advms.2018.04.011>.

DUTRA, *et al.* Perfil de pacientes acompanhados pela comissão interdisciplinar de tratamento de feridas. **Rev enferm UFPE on line.**, Recife, 11(Supl. 2):941-9, fev., 2017. DOI: 10.5205/reuol.10263-91568-1-RV.1102sup201701

EDUARDO CAMPOS, B; RUIVO, T. D., MADRONA, G. S., BERGAMASCO, R. C. Extração da mucilagem da chia e uso em sorvete como emulsificante. **XX Simpósio Nacional De Bioprocessos Xi Simpósio De Hidrólise Enzimática De Biomassa**. 01 a 04 de setembro de 2015 Fortaleza, Ceará, Brasil DOI:10.17648/sinaferm-2015-32758

FAHMY, A. *et al.* Poly(vinyl alcohol)-hyaluronic Acid Membranes for Wound Dressing Applications: Synthesis and in vitro Bio-Evaluations. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 26, No. 7, 1466-1474, 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150115>

FARAGO, P. V.; DUARTE, M. R.; ALQUINI, Y; NAKASHIMA, T. Análise farmacognóstica das cascas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. **Rev. Bras. Farm.**, 85(1): 23-26, 2004

FORZZA, R. C. *et al.* **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, 2010. 871 p.

GAO L., ZHANG H., YU B., *et al.* Chitosan composite hydrogels cross-linked by multifunctional diazo resin as antibacterial dressings for improved wound healing. **J Biomed Mater Res**. 2020;108:1890–1898. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36952>

GARCIA, A.; SPIM, J. A.; SANTOS, C. A. **Ensaio dos Materiais**. Rio de Janeiro: LTC, 2000

GARLET, T. M. B. **Plantas medicinais nativas de uso popular no Rio Grande do Sul** [recurso eletrônico] – Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, 2019. 233p. Disponível em: [www.ufsm.br/pre](http://www.ufsm.br/pre)

GEORGIN, J., FRANCO, D.S.P., NETTO, M.S. *et al.* Evaluation of *Ocotea puberula* bark powder (OPBP) as an effective adsorbent to uptake crystal violet from colored effluents: alternative kinetic approaches. **Environ Sci Pollut Res** 27, 25727–25739 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08854-6>

GHOMI, E. R. *et al.* Wound dressings: Current advances and future directions. **Journal of Applied Polymer Science**. 2019, DOI: 10.1002/APP.47738

GOLMOHAMMADI, R. *et al.* Synergistic Antibacterial Activity and Wound Healing Properties of Selenium-Chitosan-Mupirocin Nanohybrid System: An in Vivo Study on Rat Diabetic *Staphylococcus aureus* Wound Infection Model. **Scientific Reports** (2020) 10:2854 | <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59510-5>

GONZALEZ, A. C. O. *et al.* Wound healing – a literature review. **An Bras Dermatol**. 2016; 91(5) : 614-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>

GRASSI, L. T.; GRASSI, V. M. T. Silver nanoparticle action on wound healing: a systematic review. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.6, p. 58109-58131 jun. 2021. DOI:10.34117/bjdv7n6-286

GUADARRAMA-ACEVEDO, M.C.; MENDOZA-FLORES, R.A.; *et al.* Development and Evaluation of Alginate Membranes with Curcumin-Loaded Nanoparticles for Potential Wound-Healing Applications. **Pharmaceutics** 2019, 11, 389. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080389>

GUSHIKEN, L. F. S; BESERRA, F. P.; BASTOS, J. K.; JACKSON, C. J.; PELLIZON, C. H. Cutaneous Wound Healing: An Update from Physiopathology to Current Therapies. **Life** 2021, 11, 665. <https://doi.org/10.3390/life11070665>

HAILE, T.G. *et al.* Physicochemical Characterization of *Grewia ferruginea* Hochst. ex A. Rich Mucilage for Potential Use as a Pharmaceutical Excipient, **BioMed Research International**, vol. 2020, 10 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4094350>

HAN, G; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Advances in Therapy** (2017) 34:599–610 DOI 10.1007/s12325-017-0478-y

HOSSEINI, S. M.; MORADI, F. *et al.* Carbon nanofibers/chitosan nanocomposite thin film for surface modification of poly(ether sulphone) nanofiltration membrane. **Materials Chemistry and Physics**, Volume 269, 2021, 124720, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.124720>.

HUANG, S., HU, Z., WANG, P. *et al.* Rat epidermal stem cells promote the angiogenesis of full-thickness wounds. **Stem Cell Res Ther** 11, 344 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01844-y>

JAFARI, M ; BANIASADI, H; REZVANPOUR, a ; LOTFI, M. Fabrication and characterisation of a wound dressing composed of polyvinyl alcohol and quince seed mucilage. **Journal of Wound Care** Vol. 30, No. Sup 9. 2021 <https://doi.org/10.12968/jowc.2021.30.Sup9a.XIII>

KAMOUN, E, KENAWY, E, CHEN, X; A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **Journal of Advanced Research** Volume 8, Issue 3, May 2017, Pages 217-233. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>

KOGA, A, Y. *et al.* Evaluation of wound healing effect of alginate film containing Aloe vera gel and cross-linked with zinc chloride. **Acta Cir Bras.** 2020; 35(5):e202000507. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020200050000007>

KOUR, H. *et al.* Evaluation of the wound healing activity of ethanolic extract of *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. rhizome with excision wound model in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology** Volume 281, 5 December 2021, 114527. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114527>

LEITE, A.G.B. *et al.* Avaliação morfo-histológica e morfo-histométrica de feridas cutâneas tratadas com *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski em ratos. **Arq. Bras. Med. Vet Zootec.**, v.72, n.6, p.2211-2222, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-11785>

LI, X; LI, H-C; YOU, T-T; WU, Y-Y; RAMASWAMY, S; XU, FENG. Fabrication of regenerated cellulose membranes with high tensile strength and antibacterial property via surface amination, **Industrial Crops and Products**, Volume 140, 2019,111603, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111603>.

Lillo A, Carvajal-Caiconte F, Vital W, Silva Junior PI, Paredes-Gamero EJ, Alvear M, Miranda A. Bioactive properties of *Persea lingue* Ness (Lauraceae) fruit and leaf

extracts. **Braz J Biol.** 2021 Sep 6;83:e248063. doi: 10.1590/1519-6984.248063. PMID: 34495162.

MARINHO, T. A. *et al.* Phytochemical characterization, and antioxidant and antibacterial activities of the hydroethanolic extract of *Anadenanthera peregrina* stem bark. **Braz. J. Biol.** 82 2022. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.234476>

MEDEIROS, A. C.; DANTAS FILHO, A. M. *et al.* Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of Surgical Research**, v. 7, n. 2, p. 87-102, 2016.

MESQUITA, R. M. G. R. **Caracterização do tratamento de feridas complexas em um Hospital Geral.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal de Roraima. Boa Vista / RR 2013

MONTRUCCHIO, D. P. *et al.* Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicentrine Isolated from Fruits of *Ocotea puberula*. **Rev Planta Med** Vol. 78, Pág 1543–1548, 2012

MONTRUCCHIO, D. P.; CÓRDOVA, M. M.; SANTOS, A. R. S. Plant Derived Aporphinic Alkaloid S-(+)-Dicentrine Induces Antinociceptive Effect in Both Acute and Chronic Inflammatory Pain Models: Evidence for a Role of TRPA1 Channels. **Rev. PLOS ONE**. Vol 8 Ed 7 pág 1-9 July 2013

MURRAY, R. Z., *et al.* Development and use of biomaterials as wound healing therapies. **Burns & Trauma**, Volume 7, Issue 1, December 2019, s41038-018-0139-7, <https://doi.org/10.1186/s41038-018-0139-7>

NADA, A. A. *et al.* Bioactive polymeric formulations for wound healing. **Polym Adv Technol**. 2018;1–11. DOI: 10.1002/pat.4288

NASUTION, H.; HARAHAH, H.; DALIMUNTHER, N.F.; GINTING, M.H.S.; JAAFAR, M.; TAN, O.O.H.; ARUAN, H.K.; HERFANANDA, A.L. Hydrogel and Effects of Crosslinking Agent on Cellulose-Based Hydrogels: A Review. **Gels** 2022, 8, 568. <https://doi.org/10.3390/gels8090568>

NUN, N. *et al.* Thread Size and Polymer Composition of 3D Printed and Electrospun Wound Dressings Affect Wound Healing Outcomes in an Excisional Wound Rat Model **Biomacromolecules** 2020 21 (10), 4030-4042. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00801

OECD, International Regulatory Co-operation and International Organisations: The Case of ASTM International, OECD, 2021.

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

OKUR, M. E.; KARANTAS, I. D.; ŞENYİĞİT, Z; OKUR, N. Ü.; SIAFAKA, P. I. Recent trends on wound management: New therapeutic choices based on polymeric carriers. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Volume 15, Issue 6, 2020, Pages 661-684. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.11.008>

PAVLIK, V, SOJKA, M, MAZUROVA, M, VELEBNY, V Dual role of iodine, silver, chlorhexidine and octenidine as antimicrobial and antiprotease agents. **PLoS ONE** 14(1): e0211055. 2019 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211055>

PEDROSO, C.R.; Souza, J. B.; Kovalski, T.; Vidal, C. M. S.; Martins, K.G. Inativação de microrganismos indicadores de contaminação fecal por radiação ultravioleta e

avaliação dos fenômenos de fotorreativação e recuperação no escuro Eng **Sanit Ambient** v.23 n.5 set/out p. 987-994 2018 DOI: 10.1590/S1413-41522018164557

PEREWALO, R, P. *et al.* Contribution to the study of galls of *Ocotea puberula* (Rich.) Nees (Lauraceae): Antioxidant and biological properties of the alkaloid S-(+)-dicentrine **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, e53010615934, 2021 DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15934>

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

QUEIROZ, I. S.; SILVA, C. M. R.; TESHIMA, E. Avaliação da composição química da palma forrageira (*Opuntia ficus indica*). **A. Ciências Exatas e da Terra** - 4. Química - 4. Química de Produtos Naturais. Recife, PE. 2015

RAJOO, A ; RAMANATHAN, S ; MANSOR, S. M ; SASIDHARAN, S Formulation and evaluation of wound healing activity of *Elaeis guineensis* Jacq leaves in a *Staphylococcus aureus* infected Sprague Dawley rat model, **Journal of Ethnopharmacology**, Volume 266, 2021, 13414, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113414>.

RAMALHO, P.E. **Canela-guaicá** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento EMBRAPA.Circular Técnica nº 62 Colombo – PR 2002

RAMIREZ, S. D.O. *et al.* Design of Asymmetric Nanofibers-Membranes Based on Polyvinyl Alcohol and Wool-Keratin for Wound Healing Applications. **J. Funct. Biomater.** 2021, 12, 76. <https://doi.org/10.3390/jfb12040076>

RAZ, P.; GUY RONEN, T B; TAL, HAIM. Tensile Properties of Three Selected Collagen Membranes, **BioMed Research International**, vol. 2019, Article ID 5163603, 8 pages, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5163603>

RODRIGUES, M. ; KORARIC, N ; BONHAM, C, A, ; GURTNER, G. Wound Healing: A Cellular Perspective, **Physiol Rev** 99: 665–706, 2018; doi:10.1152/physrev.00067.2017

SANTOS, F. V. *et al.* **Manual de Curativos**: Prefeitura Municipal de Campinas, 2016, São Paulo. Disponível em: <[http://www.saude.campinas.sp.gov.br/enfermagem/2016/Manual\\_de\\_Curativos\\_2016.pdf](http://www.saude.campinas.sp.gov.br/enfermagem/2016/Manual_de_Curativos_2016.pdf)>. Acesso em: 15 de ago. 2020.

SARHEED, O. *et al.* Antimicrobial Dressings for Improving Wound Healing. **InTEch Open Science**, v. 17, p. 373-398, 2016.

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

SARQUIS, R S F R *et al.* The Use of Medicinal Plants in the Riverside Community of the Mazagão River in the Brazilian Amazon, Amapá, Brazil: Ethnobotanical and Ethnopharmacological Studies, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2019, Article ID 6087509, 25 pages, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6087509>

SHEDOEVA, A. *et al.* Wound Healing and the Use of Medicinal Plants. **Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Volume 2019, Article ID 2684108, 30 pages <https://doi.org/10.1155/2019/2684108>

- SHI, T; HU, J; CHEN, W; GAO, C. Biaxial tensile behavior and strength of architectural fabric membranes, **Polymer Testing**, Volume 82, 2020, 106230, <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.106230>.
- SILVA, P. N.; ALMEIDA, O. A. E.; ROCHA, I. C. Terapia tópica no tratamento de feridas crônicas. **Rev Elet Enfermeria Global**, nº33 Janeiro. pág 46-58 2015
- SILVA, M. G *et al.* A importância dos ensaios de toxicidade para o desenvolvimento e o registro de fitoterápicos no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, e538101220137, 2021 DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20137>
- SIMONSON, T.; ARCHONTIS, G.; KARPLUS, M. Free Energy Simulations Come of Age: Protein – Ligand Recognition **Accounts of Chemical Research**, V. 35, n. 6, p.430–437, 2002.
- SINGH, S; YOUNG, A; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery (Oxford)** Volume 35, Issue 9, September 2017, Pages 473-477. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.004>
- SMANIOTTO, P. H. S., GALLI, R., CARVALHO, V. F., FERREIRA, M. C. Tratamento clínico das feridas: curativos. **Rev Med.** Ed.89 nº 3/4 jul.-dez., pág 137-141. São Paulo / SP. 2010
- SOUSA, N. M. Modelagem através de técnicas de bioinformática, síntese química e ação farmacológica de um peptídeo derivado de toxina da aranha *Phoneutria nigriventer*. 2016, 104f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São João Del-Rei, Divinópolis, 2016.
- STEPIEN, K. *et al.* The Renaissance of Plant Mucilage in Health Promotion and Industrial Applications: A Review. **Nutrients** 2021, 13, 3354. <https://doi.org/10.3390/nu13103354>
- TAVARES, S. A.; PEREIRA, J.; GUERREIROS, M. C.; PIMENTA, C. J.; PEREIRA, L.; MISSAGIA, S. V. Caracterização físico-química da mucilagem de inhame liofilizada. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 973 -979, set./out., 2011
- TOSIF, M.M.; NAJDA, A.; BAINS, A.; KAUSHIK, R.; DHULL, S.B.; CHAWLA, P.; WALASEK-JANUSZ, M. A Comprehensive Review on Plant-Derived Mucilage: Characterization, Functional Properties, Applications, and Its Utilization for Nanocarrier Fabrication. **Polymers** 2021, 13, 1066. <https://doi.org/10.3390/polym13071066>
- TOTTOLI, E.M.; DORATI, R.; Genta, I.; CHIESA, E.; PISANI, S.; CONTI, B. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. **Pharmaceutics** 2020, 12, 735. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735>
- TSIOUTSIU, E. E. *et al.* Phytotherapy and skin wound healing. **Acta Vulnologica** V. 14, n. 3, p.126-39. Set 2016
- XAVIER, J.K.A.M.; ALVES, N.S.F.; SETZER, W.N.; DA SILVA, J.K.R. Chemical Diversity and Biological Activities of Essential Oils from Licaria, Nectandra and Ocotea Species (Lauraceae) with Occurrence in Brazilian Biomes. **Biomolecules** 2020, 10, 869. <https://doi.org/10.3390/biom10060869>
- ZHANG X-n, MA Z-j, WANG Y, SUN B, GUO X, PAN C-q, *et al.* *Angelica Dahurica* ethanolic extract improves impaired wound healing by activating angiogenesis in diabetes. **PLoS ONE** 12(5): e0177862. (2017) <https://doi.org/10.1371/journal>

ZHANG, J., LIU, H., LIU, H. *et al.* Using diethylamine as crosslinking agent for getting polyepichlorohydrin-based composite membrane with high tensile strength and good chemical stability. **Polym. Bull.** 74, 625–639 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00289-016-1734-z>

ZHANG, K.; WANG, Y.; WEI, Q.; LI, X.; GUO, Y.; ZHANG, S. Design and Fabrication of Sodium Alginate/Carboxymethyl Cellulose Sodium Blend Hydrogel for Artificial Skin. **Gels** 2021, 7, 115. <https://doi.org/10.3390/gels7030115>

ZANIN, S. M. W. *et al.* Mudas De *Ocotea puberula* (Lauraceae): Identificação E Monitoramento De Alcaloides Aporfinoides. **Rev Quim. Nova**, Vol. 34, No. 5, pág 743-747, 2011

ZANOTI, M. D. U. *et al.* Development of coverage and its evaluation in the treatment of chronic wounds **Invest Educ Enferm.** 2017; 35(3) DOI: 10.17533/udea.iee.v35n3a09.

ZENG, R. *et al.* Approaches to cutaneous wound healing: basics and future directions. **Cell and Tissue Research** (2018) 374:217–232 <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2830-1>

WANG, C, *et al.* The diameter factor of aligned membranes facilitates wound healing by promoting epithelialization in an immune way, **Bioactive Materials**, Volume 11, 2022, Pages 206-217, <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.09.022>.

YADAV, I. *et al.* Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol- carboxymethyl tamarind gum based composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 165. P. 159-168, 2017.

## APÊNDICES



# APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO PELO GRUPO DE PESQUISADORES

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2019-0653>



ARTIGO ORIGINAL

## Análise dos critérios diagnósticos de pneumonia associada à ventilação mecânica: estudo de coorte

*Analysis of diagnostic criteria for ventilator-associated pneumonia: a cohort study*

*Análisis de criterios diagnósticos de neumonía asociada a la ventilación mecánica: estudio de cohorte*

**Caroline Gonçalves Pustiglione Campos<sup>1</sup>**

ORCID: 0000-0002-3803-6100

**Aline Pacheco<sup>1</sup>**

ORCID: 0000-0002-7636-0497

**Maria Dagmar da Rocha Gaspar<sup>1</sup>**

ORCID: 0000-0002-9368-6544

**Guilherme Arcaro<sup>1</sup>**

ORCID: 0000-0003-1855-9091

**Pêrciles Martim Reche<sup>1</sup>**

ORCID: 0000-0001-7238-6318

**Jessica Mendes Nadal<sup>1</sup>**

ORCID: 0000-0002-2419-2110

**Paulo Vítor Farago<sup>1</sup>**

ORCID: 0000-0002-9934-4027

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

### Como citar este artigo:

Campos CGP, Pacheco A, Gaspar MDR, Arcaro G, Reche PM, Nadal JM, et al. Analysis of diagnostic criteria for ventilator-associated pneumonia: a cohort study. Rev Bras Enferm. 2021;74(6):e20190653. <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2019-0653>

### Autor Correspondente:

Caroline Gonçalves Pustiglione Campos  
E-mail: carolgonc@hotmail.com



EDITOR CHEFE: Dulce Barbosa  
EDITOR ASSOCIADO: Marcos Brandão

**Submissão:** 09-12-2019 **Aprovação:** 09-05-2021

### RESUMO

**Objetivos:** analisar os critérios diagnósticos da Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e pela National Healthcare Safety Network/CDC, bem como os fatores de risco. **Métodos:** estudo de coorte retrospectivo realizado em uma Unidade de Terapia Intensiva, no período de 12 meses, no ano de 2017. A análise foi realizada por meio de testes estatísticos Qui-Quadrado, regressão linear simples e teste de Kappa, pelo programa STATA 12. **Resultados:** a amostra constituiu-se de 543 pacientes hospitalizados na UTI em ventilação mecânica, destes, 330 (60,9%) eram do sexo masculino e 213 (39,1%) eram do sexo feminino. As variáveis, como sexo, idade, tempo de ventilação e higiene oral, foram significativas como fatores de risco para o desenvolvimento da Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV). **Conclusões:** os pacientes em uso da ventilação mecânica necessitam de constante avaliação para acurácia dos métodos de diagnósticos, de forma objetiva e padronizada, nas instituições hospitalares brasileiras. **Descritores:** Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica; Fatores de Risco; Unidades de Terapia Intensiva; Assistência à Saúde; Infecção Hospitalar.

### ABSTRACT

**Objectives:** to analyze the diagnostic criteria for ventilator-associated pneumonia recommended by the Brazilian Health Regulatory Agency and the National Healthcare Safety Network/Centers for Disease Control and Prevention, as well as its risk factors. **Methods:** retrospective cohort study carried out in an intensive care unit throughout 12 months, in 2017. Analyses included chi-square, simple linear regression, and Kappa statistical tests and were conducted using Stata 12 software. **Results:** the sample was 543 patients who were in the intensive care unit and under mechanical ventilation, of whom 330 (60.9%) were men and 213 (39.1%) were women. Variables such as gender, age, time under mechanical ventilation, and oral hygiene proved to be significant risk factors for the development of ventilator-associated pneumonia. **Conclusions:** patients submitted to mechanical ventilation need to be constantly evaluated so the used diagnostic methods can be accurate and applied in an objective and standardized way in Brazilian hospitals. **Descriptors:** Pneumonia, Ventilator-Associated; Risk Factors; Intensive Care Units; Delivery of Health Care; Cross Infection.

### RESUMEN

**Objetivos:** analizar los criterios diagnósticos de neumonía asociada a la ventilación mecánica recomendados por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria y la National Health Care Safety Network/CDC, así como los factores de riesgo. **Métodos:** estudio de cohorte retrospectivo realizado en una unidad de terapia intensiva durante 12 meses, en 2017. El análisis se realizó mediante pruebas estadísticas de Chi-cuadrado, regresión lineal simple y test de Kappa, utilizando el programa STATA 12. **Resultados:** muestra constituida por 543 pacientes hospitalizados en UTI con ventilación mecánica, de ellos 330 (60,9%) eran de sexo masculino, y 213 (39,1%) de sexo femenino. Las variables como sexo, edad, tiempo de ventilación e higiene oral fueron significativas como factores de riesgo para el desarrollo de la NAV. **Conclusiones:** los pacientes en uso de ventilación mecánica requieren evaluación constante de precisión en los métodos de diagnóstico de manera objetiva y estandarizada en las instituciones hospitalarias brasileñas. **Descriptores:** Neumonía Asociada Al Ventilador; Factores de Riesgo; Unidades de Cuidados Intensivos; Prestación de Atención de Salud; Infección Hospitalaria.



<https://doi.org/10.1590/0034-7167-2019-0653>

Rev Bras Enferm. 2021;74(6):e20190653 1 de 7

## INTRODUÇÃO

No âmbito das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), a Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV) é a mais frequente e grave das infecções que acometem os pacientes hospitalizados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI)<sup>(1-2)</sup>. A patogênese da PAV decorre da resposta inflamatória do parênquima pulmonar, que delibera sinais e sintomas respiratórios graves; é resultante da penetração e multiplicação descontrolada de agentes infecciosos, principalmente, por microrganismos multidroga-resistentes, junto com o comprometimento da imunidade, redução do reflexo de tosse e alteração na deglutição dos pacientes<sup>(3-4)</sup>.

Uma das medidas terapêuticas mais utilizadas na UTI é a Ventilação Mecânica (VM), que garante um aporte de oxigênio adequado por meio da traqueostomia ou intubação endotraqueal<sup>(5)</sup>. A presença desse tubo é apontada como um importante fator de risco para desenvolvimento da PAV, pois o paciente perde o mecanismo normal de limpeza das vias aéreas e propicia o aumento da produção de secreções em decorrência da diminuição do reflexo da tosse<sup>(6-7)</sup>.

Nesse sentido, a PAV é uma infecção pulmonar que surge, após 48 horas de intubação endotraqueal, em pacientes submetidos à ventilação mecânica invasiva<sup>(8)</sup>. Apresenta incidência entre 09% e 28% em estudos internacionais<sup>(9-10)</sup> e, no Brasil, a incidência é de 23,2% a 36,01%<sup>(11)</sup>. Em relação à mortalidade em decorrência da PAV, varia entre 20 e 60%<sup>(12)</sup>, além do impacto traduzido no prolongamento da hospitalização, em torno de 12 dias, e no aumento de custos de aproximadamente 40.000 dólares por episódio<sup>(8,10)</sup>.

Para a definição da PAV, faz-se necessário seguir critérios diagnósticos, entretanto, há complexidade e dificuldade uniforme beira leito<sup>(13-14)</sup>. No Brasil, o diagnóstico da PAV é estabelecido pelos Critérios Nacionais de Infecções do Trato Respiratório, que estabelecem o somatório dos achados clínicos, interpretação dos exames radiológicos e laboratoriais, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>(5,7)</sup>.

Entretanto, em serviços de saúde, ainda se usam critérios subjetivos. Em 2013, a *National Healthcare Safety Network/Center for Disease Control and Prevention* (NHSN/CDC) desenvolveram uma nova abordagem, com base em critérios objetivos, para diagnosticar Eventos Associados ao Ventilador (EAV), em vez de PAV, e lançou um novo protocolo que minimiza a subjetividade dos critérios diagnósticos<sup>(14-15)</sup>.

O critério engloba a classificação ampla de Eventos Associados ao Ventilador (EAV) e está subdividida em 3 categorias específicas, definidas por padrões objetivos que são: Condições Associadas ao Ventilador (CAV), Complicações Infecciosas Associadas à Ventilação (CAVI) e Possível Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PPAV)<sup>(15-16)</sup>.

Com base nessa classificação, os dados necessários para preencher os critérios são todos objetivos, pois o método empregado facilita as comparações de incidências entre diversas UTI's e também torna mais fidedignos os resultados obtidos<sup>(17)</sup>.

Nesse sentido, a utilização de um critério diagnóstico amplo e objetivo permite a identificação e o tratamento seguro e otimizado aos pacientes em ventilação mecânica, tendo em vista estes serem uma população com elevados índices de morbimortalidade<sup>(12,18)</sup>. Em razão da falta de estudos brasileiros que avaliem os critérios

de diagnósticos de EAV, esta pesquisa contribuirá para efetiva condução de pacientes críticos em VM.

## OBJETIVOS

Analisar os critérios diagnósticos da Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e pela *National Health Care Safety Network/CDC*, bem como os fatores de risco.

## MÉTODOS

### Aspectos éticos

A pesquisa obedeceu às diretrizes e Normas da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde que regulamentam pesquisas com seres humanos e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Instituição.

### Desenho, período e local do estudo

Trata-se de uma pesquisa de coorte retrospectivo norteada pela ferramenta *Strobe*, realizado na UTI Adulto Geral de um Hospital Universitário do Município de Ponta Grossa, cidade considerada de médio porte do Estado do Paraná, no período de janeiro a dezembro de 2017.

A UTI adulto Geral possui 20 leitos, composta por uma equipe multiprofissional para cada 10 leitos distribuídos em atendimento clínico, cirúrgico e trauma, com média de atendimentos de 80 pacientes/mês.

### População ou amostra; critérios de inclusão e exclusão

No período de janeiro a dezembro de 2017, estiveram internados na UTI 953 pacientes. A amostra foi considerada não probabilística por conveniência, constituída por 543 pacientes que estavam fazendo uso da VM, conforme os critérios de inclusão, sendo eles: pacientes adultos e idosos, com idade igual ou superior a 18 anos, que fizeram uso de ventilação mecânica durante a internação, por um período maior que 48 horas. Foram excluídos da amostra os pacientes em VM que evoluíram a óbito dentro de um período menor que 48 horas, conforme preconizado pelos dois critérios<sup>(5,17)</sup>.

### Protocolo do estudo

A coleta de dados foi realizada por duas pesquisadoras capacitadas, por meio da análise dos prontuários dos pacientes em VM disponibilizado pelo sistema de registro eletrônico da UTI e com a colaboração do Serviço Controle de Infecção da Instituição referente ao acesso aos dados da incidência de PAV, sendo que a coleta aconteceu num período de quatro meses do ano de 2018.

Os dados foram registrados e tabulados em planilha do *software* Microsoft Office Excel 2007®, contendo as variáveis: idade, sexo, número de comorbidades, classes de comorbidades, diagnóstico de internação, dias passados em ventilação mecânica, dias de permanência na unidade, monitoramento da higiene oral com clorexidina.

Para o diagnóstico de PAV, utilizaram-se, para análise dos dados, os critérios estabelecidos pela Anvisa/Brasil<sup>(4-5)</sup> e pela NHSN/CDC<sup>(14-15)</sup>, conforme descrito na sequência.

Os critérios diagnósticos da PAV estabelecidos pela Anvisa estão descritos no Quadro 1, considerando-se pneumonia diagnosticada no paciente em ventilação mecânica (VM) por um período maior que dois dias, sendo o primeiro dia o início da VM<sup>(4-5)</sup>.

Com relação aos novos critérios estabelecidos pela NHSN/CDC, o algoritmo de definição de EAV usa três novos indicadores, sendo eles: Condição Associada ao Ventilador, Complicações Infeciosas Associadas ao Ventilador, Possível Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica<sup>(14-15,17)</sup>, como estão descritos no Quadro 2.

**Quadro 1** - Critérios estabelecidos pela Anvisa 2019

| Critérios de PAV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Clinicamente</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Pacientes com doença cardíaca ou pulmonar de base, com dois ou mais exames de imagens seriados com um dos seguintes achados: novo e persistente ou progressivo e persistente: Infiltrado, Opacificação ou Cavitação.</li> <li>Um dos sinais e sintomas: febre (temperatura: <math>&gt;38^{\circ}\text{C}</math>), leucopenia (<math>&lt;4000 \text{ cel/mm}^3</math>) ou leucocitose (<math>&gt;12000 \text{ cel/mm}^3</math>). Alteração do nível de consciência, sem outra causa aparente, em pacientes <math>\geq 70</math> anos.</li> <li>Com dois sinais e sintomas: surgimento de secreção purulenta, ou mudança das características da secreção, ou aumento da secreção respiratória, ou aumento da necessidade de aspiração. Piora da troca gasosa (dessaturação, como, por exemplo, <math>\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 &lt; 240</math>, ou aumento da oferta de oxigênio, ou aumento dos parâmetros ventilatórios). Ausculta com roncocalos ou estertores. Início, ou piora da tosse, ou dispnéia.</li> </ul> <p><b>Microbiologicamente</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Hemocultura positiva, sem outro foco de infecção</li> <li>Cultura positiva do líquido pleural</li> <li>Cultura quantitativa positiva de secreção pulmonar obtida por procedimento, com mínimo potencial de contaminação (lavado broncoalveolar, escovado protegido e aspirado endotraqueal).</li> </ul> |

PAV - Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica.

**Quadro 2** - Critérios Diagnósticos de Eventos Associados ao Ventilador pela National Healthcare Safety Network/Center for Disease Control and Prevention

| Critérios de EAV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Condição Associada ao Ventilador (CAV)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Pelo menos 2 dias de estabilidade ou melhora dos parâmetros ventilatórios, seguida de piora de oxigenação:</li> <li>aumento da Pressão Expiratória final Positiva (PEEP) (<math>\geq 3 \text{ cm H}_2\text{O}</math>) ou</li> <li>Fração Inspirada de Oxigênio <math>\text{FiO}_2</math> (<math>\geq 20\%</math>), sustentados por 2 dias ou mais.</li> </ul> <p><b>Complicações Infeciosas Associadas ao Ventilador (CAVI)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Temperatura <math>&lt;36^{\circ}\text{C}</math> ou <math>&gt; 38^{\circ}\text{C}</math> ou</li> <li>contagem de leucócitos <math>\leq 4</math> ou <math>\geq 12 \times 10^3 \text{ células/mm}^3</math> e</li> <li><math>\geq 1</math> novo antibiótico mantido por <math>\geq 4</math> dias (dentro de 2 dias de início de CAV, excluindo os primeiros 2 dias no ventilador).</li> </ul> <p><b>Possível Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PPAV)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Escarro purulento/BAL, com <math>\geq 25</math> neutrófilos/campo e <math>\leq 10</math> células epiteliais/campo e/ou</li> <li>cultura respiratória positiva, dentro de 2 dias do início de CAV, excluindo os primeiros 2 dias no ventilador.</li> </ul> |

EAV - Eventos Associados ao Ventilador.

A CAV é o primeiro passo de vigilância que tenta identificar qualquer complicação de um paciente em ventilação mecânica (VM) e, para tal definição, um paciente deve estar há 48 horas em VM estável, seguidas de mais 48 horas de piora da oxigenação

(queda de PEEP ou  $\text{FiO}_2$ ). Por sua vez, a CAVI compreende uma CAV associada a uma contagem anormal de células brancas ou aumento de temperatura corporal e estão potencialmente relacionadas a infecção. Por fim, a PPAV é identificada quando, somada a esses dois critérios, há a presença de secreções purulentas em aspiração de orofaringe ou resultados microbiológicos positivos<sup>(14,17)</sup>.

## Análise dos resultados e estatística

A variável dependente foi a PAV diagnosticada por critério ANVISA e as variáveis independentes foram os fatores de risco: idade, sexo, tempo de ventilação mecânica, diagnóstico inicial, higiene oral com clorexidina, com cálculo de risco relativo, considerando-se intervalo de confiança de 95%.

A análise estatística foi realizada a partir dos testes de associação de Qui-Quadrado de Pearson para variáveis categóricas (descritas numericamente e por porcentagem) e regressão linear simples para avaliar o efeito dos preditores que pudessem estar estatisticamente associados à PAV. Para as variáveis contínuas (descritas por meio de média), o teste de Fisher, utilizando-se o *software* STATA 12.

Para a Densidade de Incidência de Pneumonia associada à Ventilação Mecânica (PAV) e Eventos Associados ao Ventilador (EAV) em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), foi utilizado o cálculo dividindo-se o número de episódios de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) em pacientes internados em unidades de terapias intensivas (UTI) pelo número de pacientes em ventilação mecânica (VM)-dia, multiplicado por 1000.

Além disso, para verificar a concordância entre os dois métodos de diagnóstico, foi realizada a Análise de Concordância *Kappa* de Cohen. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Na última etapa de análise, foram realizadas algumas análises estratificadas, para remover o efeito de variáveis de confundimento, principalmente sexo, idade, escolaridade, nas estimativas das associações encontradas pelas variáveis preditivas de Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica.

## RESULTADOS

A população foi constituída por 543 pacientes internados em UTI submetidos à ventilação mecânica. Destes indivíduos, 330 (60,9%) correspondiam ao sexo masculino e 213 (39,1%), ao feminino, com média de idade de 59,8 anos. A média de idade dos pacientes que desenvolveram PVA foi menor do que a média de idade dos indivíduos não acometidos, bem como o tempo em VM daqueles que desenvolveram a pneumonia foi maior do que o tempo daqueles que não tiveram a doença, ambos com diferença estatística significativa, conforme a Tabela 1.

Destaca-se ainda que os indivíduos que foram submetidos à higiene oral apresentaram um risco quase 5 vezes maior de desenvolver a doença do que aqueles que não foram assistidos com esse cuidado (RR: 4,916;  $p < 0,001$ ). Além do mais, as causas externas como diagnóstico de base demonstraram atuar como fator de risco associado ao desenvolvimento da infecção, com significância estatística (RR: 2,126;  $p = 0,006$ ). A relação das variáveis demográficas e clínicas com a Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica estão descritas na tabela.

**Tabela 1** - Características dos pacientes em ventilação mecânica em uma Unidade de Terapia Intensiva e relação com Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica, Ponta Grossa, Paraná, Brasil, 2017

| Variáveis                    | Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica |             | Risco Relativo | [IC 95%]       | Valor de p |
|------------------------------|-------------------------------------------|-------------|----------------|----------------|------------|
|                              | Não<br>n(%)                               | Sim<br>n(%) |                |                |            |
| Sexo                         |                                           |             |                |                |            |
| Feminino                     | 182 (85,45)                               | 31 (14,55)  | 1,19           | [0,79- 1,77]   | 0,401      |
| Masculino                    | 273 (82,73)                               | 57 (17,27)  |                |                |            |
| Faixa etária                 |                                           |             |                |                |            |
| Média, anos                  | 60,85                                     | 54,31       | -              | [2,23- 10,85]  | 0,003*     |
| Tempo em ventilação mecânica |                                           |             |                |                |            |
| Média, dias                  | 05,07                                     | 15,03       | -              | [-11,84- 8,07] | <0,001*    |
| Diagnóstico inicial          |                                           |             |                |                |            |
| Cardiovascular               | 114 (85,71)                               | 19 (14,29)  | 1,20           | [0,68 - 2,11]  | 0,530      |
| Causas externas              | 56 (74,67)                                | 19 (25,33)  | 2,13           | [1,23- 3,66]   | 0,006†     |
| Respiratório                 | 37 (77,08)                                | 11 (22,92)  | 1,92           | [1,00-3,66]    | 0,050      |
| Doenças infecciosas          | 78 (82,98)                                | 16 (17,02)  | 1,43           | [0,79-2,57]    | 0,236      |
| Outros                       | 170 (88,08)                               | 23 (11,92)  | -              | -              | -          |
| Higiene oral                 |                                           |             |                |                |            |
| Sim                          | 356 (80,91)                               | 84 (19,09)  | 4,91           | [1,84- 13,09]  | <0,001†    |
| Não                          | 099 (96,12)                               | 04 (03,88)  |                |                |            |
| Total                        | 455 (83,79)                               | 88 (16,21)  |                |                |            |

Nota:\*Diferença estatística significativa pelo Teste de Regressão Linear. †Diferença estatística significativa pelo Teste Qui-Quadrado de Pearson.

**Tabela 2** - Incidência de Eventos Associados ao Ventilador segundo o critério diagnóstico da National Healthcare Safety Network/Center for Disease Control and Prevention, Ponta Grossa, Paraná, Brasil, 2017

| Classificação de eventos                           | Incidência (%) | Densidade de Incidência (casos/1000 VM-dia) |
|----------------------------------------------------|----------------|---------------------------------------------|
| Eventos Associados ao Ventilador                   | 23,40          | 35,00                                       |
| Condições Associadas ao Ventilador                 | 03,31          | 04,96                                       |
| Infecções Associadas ao Ventilador                 | 02,21          | 03,30                                       |
| Possível Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica | 17,86          | 26,71                                       |

**Tabela 3** - Concordância de diagnósticos de complicações respiratórias, Ponta Grossa, Paraná, Brasil, 2017

| Critério NHSN (n=127)                              | Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica<br>Critério Anvisa |     | Total | Kappa  | Valor de p |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----|-------|--------|------------|
|                                                    | Não                                                          | Sim |       |        |            |
| Condições Associadas ao Ventilador                 | 15                                                           | 03  | 18    | 0,0017 |            |
| Infecções Associadas à Ventilação                  | 03                                                           | 09  | 12    | 0,0263 |            |
| Possível Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica | 35                                                           | 62  | 97    | 0,6028 | <0,001     |
| Nenhum                                             | 00                                                           | 14  | 14    | 0      |            |
| TOTAL                                              | 53                                                           | 88  | 141   |        |            |

Nota: *Kappa*: > 0,80 concordância excelente; entre 0,60 e 0,80 concordância boa; entre 0,40 e 0,60 concordância regular e < 0,40 concordância ruim; NHSN - National Healthcare Safety Network.

De acordo com os critérios diagnósticos de PAV da NHSN/CDC, a incidência de Eventos Associados ao Ventilador foi de 23,40%, conforme a Tabela 2, representando valor maior em comparação com a incidência de PAV pelos critérios da ANVISA que representou 16,21%.

Em relação à concordância entre os diagnósticos de PAV referentes aos critérios da NHSN/CDC e da ANVISA, houve diferença estatística conforme ilustrado na Tabela 3. Do total de 141 casos de complicações respiratórias, 74 (52,5%) apresentaram similaridade quanto aos critérios diagnósticos, enquanto 53 (37,6%) foram atribuídos ao critério diagnóstico da NHSN/CDC e 14 (9,90%) atenderam aos critérios adotados pela Anvisa.

Dos 88 casos de PAV, 62 (70,50%) também atenderam às atribuições de PPAV (*Kappa*: 0,6028;  $p < 0,001$ ), 09 (10,20%) foram diagnosticados como CAVI (*Kappa*: 0,0263) e 03 (03,40%) como

CAV (*Kappa*: 0,0017), totalizando aproximadamente 80,1% de cobertura dos critérios EAV na detecção dos casos de PAV com base no critério da Anvisa.

## DISCUSSÃO

No que concerne aos fatores de risco, sexo, idade e comorbidades, foram similares com os achados de outros estudos em que a maioria dos pacientes com o quadro PAV era do sexo masculino, e a faixa etária média não ultrapassou 60 anos de idade<sup>(15,19-20)</sup>. Contudo, outros estudos relatam que os idosos são susceptíveis em relação aos adultos jovens, em razão das alterações fisiológicas do envelhecimento, do declínio da resposta imunológica, da realização de procedimentos invasivos, bem como da maior predisposição às doenças crônicas<sup>(21-22)</sup>.



No presente estudo, a média de dias passados em VM por pacientes que desenvolveram PAV foi significativa em comparação com aqueles que não manifestaram quadro infeccioso. Corroborar os resultados dessa pesquisa um trabalho realizado no Estado de Minas Gerais que utilizou critérios estabelecidos pela Anvisa e identificou que pacientes com tempo de VM maior que dez dias se mostraram suscetíveis a desenvolver PAV<sup>(6)</sup>. Em consonância com outros estudos nacionais, que reportaram o valor médio de 15,85 dias para indivíduos com PAV, em contraste com os que não foram acometidos e permaneceram 8,55 dias a menos sob ventilação<sup>(7)</sup>.

O aumento do tempo de permanência do paciente em VM contribui com elevados índices de mortalidade e com aumento dos custos hospitalares<sup>(23-24)</sup>. Esses indicadores reforçam a necessidade de realizar estratégias para redução do tempo de VM que devem ser usadas para diminuir o risco de PAV, por exemplo, o desmame precoce da VM por mobilização precoce e despertar diário como tipos de componentes do cuidado preventivo<sup>(6,24-25)</sup>.

Quanto às comorbidades, em razão da gravidade das manifestações clínicas das doenças pré-existentes nos pacientes, como as cardiovasculares, respiratórias, renais e hepáticas, têm sido relatados fatores determinantes da necessidade de internação em UTI<sup>(25-26)</sup>. Pela análise da Tabela 1, verificou-se que o perfil do diagnóstico de admissão diferiu em relação a outras pesquisas. O risco de PAV foi maior nos pacientes adultos jovens (média de idade de 54,3 anos), o que pode estar correlacionado com a gravidade apresentada, visto ser a segunda causa de internação em decorrência de traumas. Desse modo, indivíduos na faixa etária adulta estão mais expostos a acidentes, portanto, necessitam de suporte respiratório, o que contribui para desenvolvimento de PAV<sup>(27)</sup>.

Com relação à análise da densidade de incidência de PAV pelos critérios da NSHN/CDC, em comparação com estudos internacionais, a densidade foi relativamente maior. Em pesquisa realizada na China, a densidade de incidência para EAV foi de 13,31 casos/1.000 dias, para CAV, 7,53 casos/1.000, para CAVI, 3,52 casos/1.000 e para PPAV, 2,26 casos/1.000<sup>(24)</sup>. Já em estudo desenvolvido na Arábia Saudita, a densidade de incidência para EAV e CAV foi de 11,12 e 7,93 casos/1.000, respectivamente<sup>(28)</sup>.

Todavia, a incidência de PAV apontada pela pesquisa, segundo critério ANVISA, foi menor em comparação com estudos nacionais que demonstraram que a frequência de PAV variou em 31,8%, 32,4% e 36,01%<sup>(11,23,27)</sup>. Contudo, as diferenças encontradas podem ter sido causadas por diferentes tipos de doenças dos pacientes e adesão às medidas preventivas<sup>(24,29)</sup>, como demonstra pesquisa realizada no Hospital de Ensino do Ceará, no qual houve um aumento da incidência de 10 para 16 casos de PAV após a implementação das medidas preventivas, reforçando a necessidade de maior adesão e conscientização da equipe ao cumprimento das medidas preventivas<sup>(30)</sup>.

No que concerne à adesão ao pacote de medidas preconizados pela NSHN/CDC e Anvisa, elas têm mostrado resultados satisfatórios na diminuição dos índices de infecção, como mencionam diversos estudos, pois existem fatores que predispõem ao risco de desenvolvimento de PAV, sendo alguns deles modificáveis<sup>(6,12,25)</sup>.

As principais estratégias preventivas incluem um conjunto básico de intervenções conhecido como *Bundle* que, quando

aplicadas em conjunto, resultam em melhorias na qualidade da assistência, com redução de PAV. Tais medidas incluem elevação de cabeceira do leito, protocolos de interrupção diária de sedação, ensaios diários de respiração espontânea, higiene bucal com clorexidina, aspiração subglótica, verificação da pressão do *cuff*, profilaxia de tromboembolismo e profilaxia de úlcera por estresse. A orientação deve ser permanente, com ênfase nas unidades intensivas, sobretudo quando há mudanças ou implementação de protocolos<sup>(25,30)</sup>.

Dessa forma, dentre os itens do *bundle* PAV, a higiene oral é um dos componentes-chave para a prevenção, em virtude da formação de biofilmes orais e no tubo endotraqueal, desencadeando a infecção do trato respiratório<sup>(21,28)</sup>. Neste estudo, houve uma discordância dos dados de literatura, uma vez que a realização da higiene oral se apresentou como um fator de risco para desenvolver PAV. Tal dado pode ser explicado, pois o conhecimento relativo ao estado de saúde geral e bucal dos pacientes internados em UTI é imprescindível para que a equipe de saúde realize cuidados eficazes e com técnicas adequadas, conseguindo assim realizar o controle de formação de biofilme, seja no tubo ou na cavidade orofaríngea, tornando-se assim uma estratégia importante para prevenção da PAV<sup>(30-31)</sup>.

Estudos prévios relatam a presença de microrganismos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae*, nos pacientes em VM<sup>(31-32)</sup>. Mediante discussão, a prevenção da colonização de microrganismos na orofaringe é essencial para prevenir a PAV, com a higienização oral realizada com clorexidina 0,12%, de três a quatro vezes ao dia<sup>(33-34)</sup>. Entretanto, verificou-se também que a realização da higiene oral apresentou risco aumentado para PAV em relação aos pacientes que não realizaram a higiene com esse antisséptico. Esses achados corroboram estudo de coorte retrospectivo que avaliou 5539 pacientes sob VM, o que resultou na análise da higiene oral com clorexidina que foi associada com um aumento do risco de PAV e mortalidade naqueles pacientes ventilados<sup>(34)</sup>.

Em relação aos resultados entre os critérios de diagnósticos de PAV da ANVISA e da NSHN/CDC, nesta pesquisa, houve baixa concordância do coeficiente de *kappa* para VAC e CAVI, no entanto, para PPAV foi considerada moderada, com valor de  $p < (0,001)$ . Com base na análise, sugere-se que os critérios da NSHN detectaram maior sensibilidade para PPAV. Os dados da pesquisa diferem dos da literatura. Estudo realizado no estado de Santa Catarina mostrou baixa concordância entre os dois métodos, identificou 18 CAVI e 14 PPAV entre os 168 pacientes em VM, com sensibilidade de 0,37 para casos de PPAV pelo método NSHN<sup>(16)</sup>. Vale ressaltar que outro estudo apontou que sensibilidade combinada de PPAV para detecção de PAV não excedeu 50%<sup>(29)</sup>.

Ainda não há um consenso nacional quanto à utilização dos critérios NSHN/CDC, em virtude das diferenças conceituais entre os dois métodos, estudos apontam a necessidade de pesquisas clínicas para delinear a abordagem desses critérios, no intuito de compreender os fatores de risco para EAV e prevenção da PAV<sup>(35-36)</sup>. Com base na literatura, sugere-se que a agência reguladora ANVISA, em conjunto com as Coordenações Estaduais de Controle de Infecção, estude a viabilidade de se realizar um projeto piloto com um grupo de hospitais previamente selecionados e realize

estudos de comparação entre os critérios atualmente propostos e os critérios NSHN/CDC, a fim de se avaliar a aplicabilidade e viabilidade para os hospitais brasileiros<sup>(4)</sup>.

#### Limitação do Estudo

A limitação deste estudo está relacionada à escolha do tipo estudo e também por ter sido desenvolvido em uma única UTI de um hospital universitário, sendo necessárias futuras investigações com enfoque na continuidade de pesquisas de abordagem prospectiva que permitam realizar comparações entre critérios diagnósticos de mais UTIs, trazendo assim benefício aos serviços de saúde.

#### Contribuições para a Área

Considera-se que o enfermeiro tem destaque nas comissões de controle de infecções e nas Unidades de Terapia Intensiva, principalmente na realização mensal da vigilância epidemiológica

das topografias infecciosas e no uso dos critérios diagnósticos e definição de casos de IRAS que podem ser utilizados para promover uma padronização e proporcionar intervenções, em casos de EAV, aos pacientes submetidos à Ventilação Mecânica, especialmente no cuidado focado na prevenção de PAV.

#### CONCLUSÕES

Este estudo analisou os dois métodos diagnósticos da PAV - ANVISA e NHSN/CDC - e verificou que os critérios da NHSN detectaram maior sensibilidade para possível PAV. Com relação aos fatores de risco, idade, tempo de ventilação mecânica, causas externas e higiene oral, foram significativos para o desenvolvimento da doença. Sugere-se a continuidade dos estudos comparativos, a fim de sistematizar critérios diagnósticos de PAV, para contribuir com a avaliação da vigilância epidemiológica da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e subsidiar a equipe multidisciplinar da UTI nas discussões diárias de prevenção e tratamento de PAV.

#### REFERÊNCIAS

1. Micek ST, Chew B, Hampton N, Kollef MH. A case-control study assessing the impact of nonventilated hospital-acquired pneumonia on patient outcomes. *Chest*. 2016;150(5):1008-14. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.04.009>
2. Corbacho-Re MF, Rocchetti NS, Settecase CJ, Bagilet DH. Valor diagnóstico de la procalcitonina en la neumonía asociada a ventilación mecánica. *Med Clin (Barc)*. 2019;152(6):216-21. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.06.019>
3. Gomes RFT, Castelo EF. Hospital dentistry and the occurrence of pneumonia. *Rev Gaúcha Odontol*. 2019:e20190016. <https://doi.org/10.1590/1981-86372019000163617>
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde [Internet]. Brasília: Anvisa. 2017 [2019 Aug 08]. Available from: [https://site.medicina.ufmg.br/cegrad/wp-content/uploads/sites/10/2016/01/criterios\\_diagnosticos\\_iras\\_2.pdf](https://site.medicina.ufmg.br/cegrad/wp-content/uploads/sites/10/2016/01/criterios_diagnosticos_iras_2.pdf)
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Nota Técnica n.3/2019 [Internet]. Brasília. 2019 [2020 Aug 08]. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Nota+tecnica+3+2019+GVIMS-GGTES-ANVISA/85f6927c-761d-43bd-ba95-b4115bf30600>
6. Mota EC, Oliveira SP, Silveira BRM, Silva PLN, Oliveira AC. Incidência da pneumonia associada à ventilação mecânica em unidade de terapia intensiva. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2017;50(1):39-46. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v50i1p39-46>
7. Canzi KR, Colacite J. Frequência de pneumonia associada à ventilação mecânica com base em resultados de culturas quantitativas de secreções traqueais. *Rev Bras Anal Clin [Internet]*. 2016[cited 2018 Apr 28];48(2):118-22. Available from: [http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2016/06/artigo-3\\_rbac-48-2-2016-ref-386.pdf](http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2016/06/artigo-3_rbac-48-2-2016-ref-386.pdf)
8. Chicayban LM, Souza Terra ELV, Ribela JS, Barbosa PF. Bundles de prevenção de pneumonia associada à ventilação mecânica: a importância da multidisciplinaridade. *Biol Saúde*. 2017;7(25). <https://doi.org/10.25242/886872520171200>
9. García RMR, Sarmiento RP, Carrasco JO, Barroso MB. Neumonía asociada a la ventilación mecánica en una unidad polivalente de cuidados intensivos. *Rev Med Electron [Internet]*. 2015[cited 2019 Dec 7];37(5):439-49. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/rme/v37n5/rme040515.pdf>
10. Khan R, Al-Dorzi HM, Al-Attas K, Ahmed FW, Marini AM, Mundeckadan S, et al. The impact of implementing multifaceted interventions on the prevention of ventilator-associated pneumonia. *Am J Infect Control*. 2016;44(3):320-6. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.09.025>
11. Bork LCA, Gaspar MDR, Reche PM, Arcaro G. Accession to preventive measures of pneumonia associated with mechanical ventilation. *Rev Epidemiol Contr Infec*. 2015;5(1):12-6. <https://doi.org/10.17058/reci.v5i1.4885>
12. Alecrim RX, Taminato M, Belasco A, Longo MCB, Kusahara DM, Fram D. Estratégias para prevenção de pneumonia associada à ventilação mecânica: revisão integrativa. *Rev Bras Enferm*. 2019;72(2):521-30. <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2018-0473>
13. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis*. 2016;63(5):61-111. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw353>
14. Neuville M, Mourvillier B, Bouadma L, Timsit JF. Bundle of care decreased ventilator-associated events - implications for ventilator-associated pneumonia prevention. *J Thorac Dis*. 2017;9(3):430-3. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.02.72>

15. Center for Disease Control and Prevention. Surveillance for ventilator associated events[Internet]. 2015[cited 2020 Aug 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/nhsn/faqs/faq-vae.html#q28>
16. Waltrick R, Possamai DS, Aguiar FP, Dadam M, Souza Filho VJ, Ramos LR, et al. Comparison between a clinical diagnosis method and the surveillance technique of the Center for Disease Control and Prevention for identification of mechanical ventilator-associated pneumonia. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2015;27(3):260-5. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20150047>
17. Spalding MC, Cripps MW, Minshall CT. Ventilator-Associated Pneumonia: new definitions. *Crit Care Clin*. 2017;33(2):277-92. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2016.12.009>
18. Zigart JAA, Contrin LM, Beccaria LM, Frutuoso IS, Silveira AM, Werneck AL. Adesão ao protocolo de pneumonia associado à ventilação mecânica. *Rev Enferm UFPE*. 2019;13(1):655-63. <https://doi.org/10.5205/1981-8963-v13i3a234873p655-663-2019>
19. Walażek M, Kosiarska A, Gniadek A, Kolpa M, Wolak Z, Dobros W, et al. The risk factors for hospital-acquired pneumonia in the Intensive Care Unit. *Przegl Epidemiol*[Internet]. 2016[cited 2020 Aug 08];70(1):107-10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27344468/>
20. François B, Cariou A, Clere-Jehl R, Dequin PF, Renon CF, Daix T. Prevention of early ventilator-associated pneumonia after cardiac arrest. *N. Engl J Med*. 2019;381(19):1831-42. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1812379>
21. Diaconu O, Siriopol I, Poloşanu LI, Grigoraş I. Endotracheal tube biofilm and its impact on the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia. *J Crit Care Med*. 2018;4(2):50-5. <https://doi.org/10.2478/jccm-2018-0011>
22. Nogueira LS, Oliveira ML, Freitas Filho NF, Freitas Filho GA, Cabral RMC, Dias R, et al. Relação do período de permanência em Ventilação Mecânica Invasiva com o Gênero e a idade dos pacientes da UTI do Hospital Municipal de Rio Verde. *Rev Univap*. 2016;22(40):498-500. <https://doi.org/10.18066/revistaunivap.v22i40.1099>
23. Ribeiro CL, Barbosa IV, Silva RSM, Cestari VRF, Penaforte KL, Custódio IL. Caracterização clínica dos pacientes sob ventilação mecânica internados em unidade de terapia intensiva. *Rev Pesqui Cuid Fundam*. 2018;10(2):496-502. <https://doi.org/10.9789/2175-5361.2018.v10i2.496-502>
24. Liu J, Zhang S, Chen J, Mao Y, Shao X, Li Y, et al. Risk factors for ventilator-associated events: a prospective cohort study. *Am J Infect Control*. 2019;47(7):744-9. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.09.032>
25. Klompas M, Li L, Kleinman K, Szumita PM, Massaro AF. Associations between ventilator bundle components and outcomes. *JAMA Intern Med*. 2016;176(9):1277-83. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.2427>
26. Storms AD, Chen J, Jackson LA, Nordin JD, Naleway AL, Glanz JM, et al. Rates and risk factors associated with hospitalization for pneumonia with ICU admission among adults. *BMC Pulm Med*. 2017;17:208. <https://doi.org/10.1186/s12890-017-0552-x>
27. Kock KS, Rosa BC, Martignago N, Maurici R. Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAVM): incidência e desfecho clínico em uma unidade de terapia intensiva no sul de Santa Catarina. *ACM Arqui Catarin Med*[Internet]. 2017[cited 2019 Aug 08];46(1):02-11. Available from: <http://www.acm.org.br/acm/seer/index.php/arquivos/article/view/248/135>
28. Khan RM, Al-Juaied M, Al-Mutairi H, Bibin G, Alchin J, Matroud A, et al. Implementing the comprehensive unit-based safety program model to improve the management of mechanically ventilated patients in Saudi Arabia. *Am J Infect Control*. 2019;47(1):51-58. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.06.022>
29. Fan Y, Gao F, Wu Y, Zhang J, Zhu M, Xiong L. Does ventilator-associated event surveillance detect ventilator-associated pneumonia in intensive care units? a systematic review and meta-analysis. *Critical Care*. 2016;20(01):1-13. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1506-z>
30. Rodrigues AN, Fragoso LVC, Beserra FM, Ramos IC. Determining impacts and factors in ventilator-associated pneumonia bundle. *Rev Bras Enferm*. 2016;69(6):1045-51. <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2016-0253>
31. Damascena LCL, Rodrigues LV, Costa RC, Nobrega JBM, Dantas ELA, Valença AMG. Factors associated with oral biofilm in ICU patients with infectious diseases. *Rev Odontol UNESP*. 2017;46(6):343-50. <https://doi.org/10.1590/1807-2577.05117>
32. Teixeira KCF, Santos LM, Azambuja FG. Análise da eficácia da higiene oral de pacientes internados em unidade de terapia intensiva em um hospital de alta complexidade do Sul do Brasil. *Rev Odontol Univ Cid São Paulo*[Internet]. 2018[cited 2019 Dec 08];30(3):234-45. Available from: [https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/04/988106/analise-da-eficacia-da-higiene-oral-de-pacientes-internados-em\\_qBllPX8.pdf](https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/04/988106/analise-da-eficacia-da-higiene-oral-de-pacientes-internados-em_qBllPX8.pdf)
33. Araújo DB, Gonçalves EMB, Martins GB, Lima MJP, Araújo TB. Saúde bucal: a importância dos enxagatatórios com antissépticos. *Rev Ciênc Méd. Biol*. 2015;14(1):88-93. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v14i1.13561>
34. Bouadma L, Klompas M. Oral care with chlorhexidine: beware! *Intensive Care Med*. 2018;44(7):1153-55. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5221-x>
35. Fortaleza CMCB, Ferreira Filho SP, Silva MO, Queiroz SM, Cavalcante RS. Sustained reduction of healthcare-associated infections after the introduction of a bundle for prevention of ventilator-associated pneumonia in medical-surgical intensive care units. *Braz J Infect Dis*. 2020;24(5):373-9. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.08.004>
36. Klompas M. Barriers to the adoption of ventilator-associated events surveillance and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(10):1180-5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.027>

## **ANEXOS**



**ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO – CEUA**

**UEPG**

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Processo CEUA – 014/2016**

Protocolo UEPG – 6378/2016

**Título** - "Mucilagem de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees.: Caracterização química, análise reológica, desenvolvimento de fitomedicamento inovador e testes *in vivo* para cicatrização de feridas"

**Interessado:** Professor Dr. Luis Antonio Pinheiro

**Data de Entrada** – 11/05/2016

**Resultado:** Aprovado

**Data/Prazo** – 11/05/2016 a 11/05/2018

**Considerações**

Prezado Professor Dr. Luis Antonio Pinheiro e Guilherme Arcaro

Em relação á utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, a utilização cento e quarenta ratos Wistar, machos.

Ponta Grossa, 11 de maio de 2016.

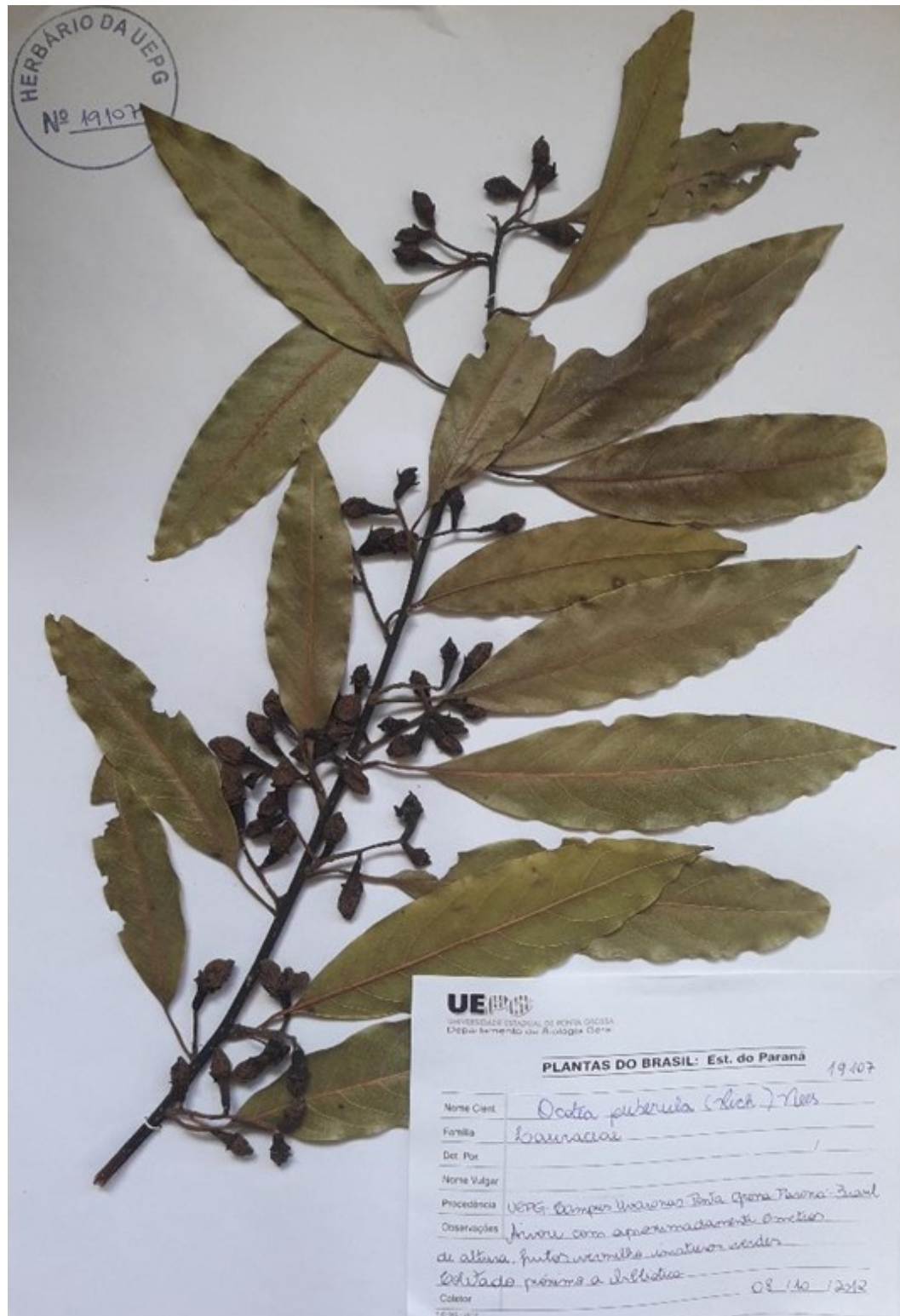
Atenciosamente

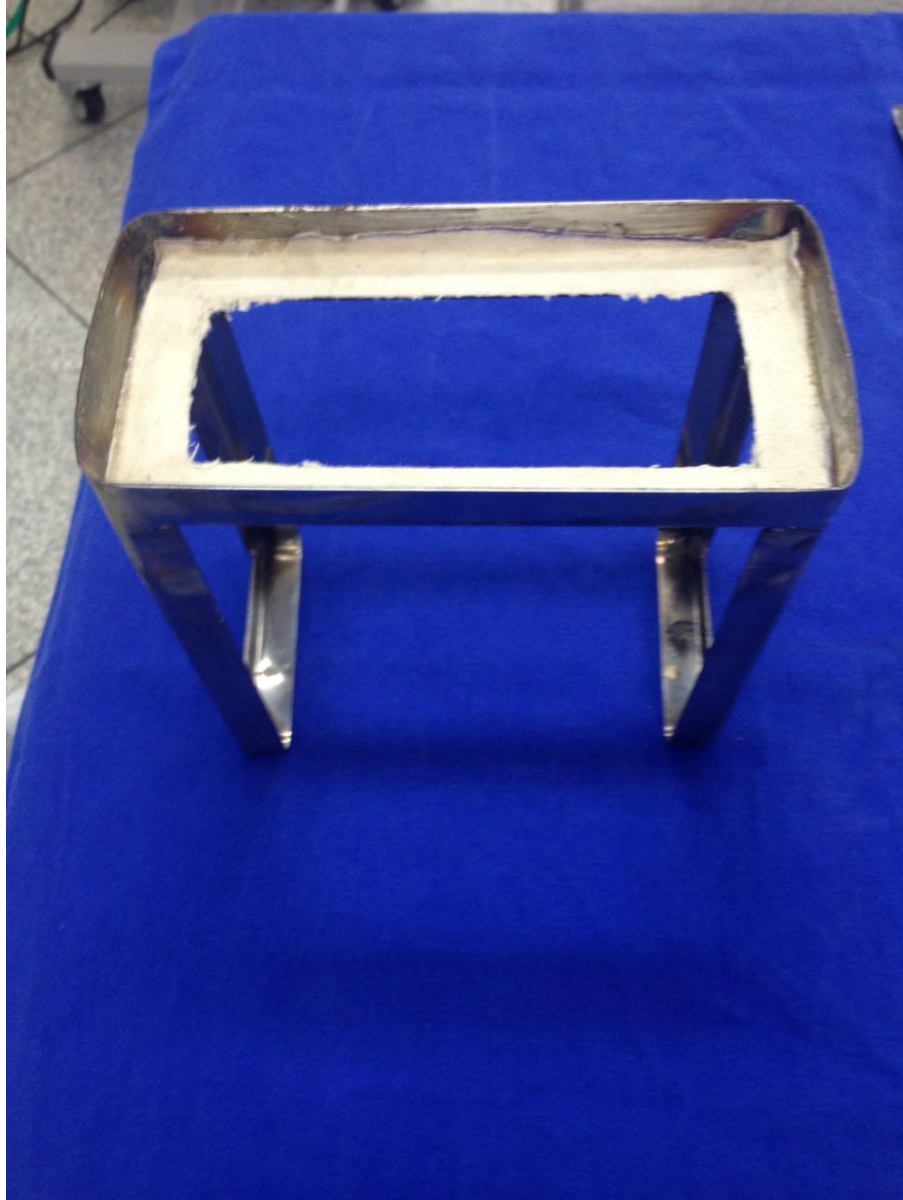
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROESP - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof.<sup>a</sup> *Dra. Maria Marta Lodi*  
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas  
Ponta Grossa – Paraná  
Bloco da Reitoria - anexo a PROESP  
Fone: (042) 3220-3264

# ANEXO B – Excicata *Ocotea puberula*



**ANEXO C – INSTRUMENTO PARA REALIZAÇÃO DAS IMAGENS DAS LESÕES**

## ANEXO D – ARTIGO RELACIONADO À PESQUISA A SER PUBLICADO EM REVISTA

### **Preclinical trial of the guaika laurel barks extract in wound healing: validation of a traditional medicine practice used by indigenous groups in southern Brazil**

Guilherme Arcaro <sup>a</sup>, Adriana Yuriko Koga <sup>b</sup>, Bruna Carletto <sup>b</sup>, Giovana Manfron Budel <sup>c</sup>, Maria Dagmar da Rocha Gaspar <sup>b</sup>, Jessica Mendes Nadal <sup>b</sup>, Andressa Novatski <sup>a</sup>, Leandro Cavalcante Lipinski <sup>a</sup>, Paulo Vitor Farago <sup>a,b,\*</sup>, Luís Antonio Pinheiro <sup>a</sup>

First Author, <sup>a,1</sup> Second Author, <sup>b,1</sup> Third Author, <sup>b</sup> Corresponding Author <sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Health Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

<sup>b</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

<sup>c</sup> Santo Anjo High School, Curitiba, Brazil

#### **\* Corresponding author at:**

\*Corresponding author at: State University of Ponta Grossa, 4748, Carlos Cavalcanti Ave., Zip Code 84030-900, Ponta Grossa, Parana, Brazil. Tel. +55 42 32203080. Fax. +55 42 32203079. E-mail address: pvfarago@uepg.br, pvfarago@gmail.com (P. V. Farago).

#### **ORCID iD:**

Guilherme Arcaro: 0000-0003-1855-9091

Adriana Yuriko Koga: 0000-0002-9690-4287

Bruna Carletto: 0000-0002-8428-3065

Giovana Manfron Budel: 0000-0002-7541-9258

Maria Dagmar da Rocha Gaspar: 0000-0002-9368-6544

Jessica Mendes Nadal: 0000-0002-2419-2110

Andressa Novatski: 0000-0002-8327-6285

Leandro Cavalcante Lipinski: 0000-0001-5662-622X

Paulo Vitor Farago: 0000-0002-9934-4027

Luís Antonio Pinheiro: 0000-0001-5068-3725

## Abstract

**Background:** Guaika laurel [*Ocotea puberula* (Rich.) Nees] is a native species that is traditionally used by Kaingang indigenous groups for wound healing in southern Brazil. The aim of this study was to extract the mucilage from *O. puberula* bark, to perform its phytochemical and physicochemical characterization, and to investigate its healing potential.

**Methods:** A murine wound model was used as a preclinical trial for authentication of the traditional knowledge from Kaingang indigenous communities.

**Results:** Alkaloids and polysaccharides were identified by usual qualitative reactions and Fourier transform infrared spectroscopy. This natural product showed thermal stability and pseudoplastic properties that were considered suitable for the intended use. A higher initial exacerbation of inflammatory response after 7 days, an improved angiogenesis after 14 days, and an increased wound shrinkage after 21 days were statistically significant for the Guaika laurel barks extract in the preclinical trial when compared to the silver calcium alginate dressing (positive control).

**Conclusion:** The healing potential of the Guaika laurel barks extract, traditionally used by the Kaingang indigenous community from southern Brazil, was preclinically validated. This study paves the way for designing novel wound dressings containing this natural product in order to treat acute and chronic wounds.

## Highlights:

- Guaika laurel [*Ocotea puberula* (Rich.) Nees] bark extract (GLBE) presented mucilage and alkaloids
- This natural product showed thermal stability and pseudoplastic properties
- An improved macroscopic wound repair was observed for GLBE after 21 days
- A statistically higher angiogenesis was observed for GLBE after 14 days of treatment

## Introduction

Chronic wounds are a major health problem with high costs and impacts on care programs, primarily affecting adults and elderly individuals. In the UK's National Health Service (NHS), the cost of wound care is conservatively estimated at \$54 billion, including various outpatient facilities. In

developed countries it has been estimated that 1 - 2% of the whole population may suffer from chronic wounds at some point in their lifetime <sup>1,2,3</sup>.

Wound healing is a complex process that involves an orderly sequence of events, divided into four steps: hemostasis, inflammation, proliferative and remodeling phase<sup>4</sup>. There are commercial dressing for treating acute and chronic wounds that includes silver, nanocrystalline silver, alginate, and hydrogel <sup>5,6,7</sup>.

However, this dressing might not be completely effective due their high cost and prolonged time for treating chronic wounds, such as ulcers and scars, which remain as unresolved health problems <sup>1</sup>. In that sense, innovative polymer membrane dressings based on natural products can be a suitable alternative to improve wound healing process <sup>8,9,10</sup>.

*Ocotea puberula* (Rich.) Nees is an evergreen tree that belongs to the Lauraceae. Its barks present the well-known aporphine alkaloids as dicentrine, which demonstrated antituberculosis activity and antinociceptive effects <sup>11,12</sup>. In addition, there are studies that the mucilaginous gel can be used for wound healing as reported by taxonomic and ethnopharmacological studies <sup>6,13</sup>. However, no previous report was devoted to investigate the wound healing effect of the mucilaginous guaiacum barks extract (GLBE) in order to provide an ethnopharmacological-based strategy for wound repair.

The aim of this paper was to characterize the mucilaginous GLBE and to treat standardized lesions in a wound healing preclinical model by comparing it with a commercially available ionic silver wound dressing.

## **Methods:**

### **Plant material and processing**

Samples of barks of *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae, were collected from six tree specimens at the State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Parana, Brazil (latitude 25°05'39" S and longitude 50°06'05" W) in October 2018. The plant material was identified and a voucher specimen was stored under the number HUPG 19107 at the Herbarium of the State University of Ponta Grossa. *Ocotea puberula* barks were cut into 4 cm<sup>2</sup>-sized fragments, dried at 25±2°C, and then ground into a Wiley-type knife mill (Solab, SL31 model, Piracicaba, Brazil) to obtain a 500 µm sized powder.



This standardized powder was stored in sealed containers in dark conditions at room temperature ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

#### **Preparation and characterization of guaika laurel barks extract**

The guaika laurel barks extract (GLBE) was prepared in triplicate using 20 g of the previously standardized powder of *Ocotea puberula* barks and 800 mL of distilled water by stirring (Fisaton stirrer, 713 model, São Paulo, Brazil) at  $60\pm 2^{\circ}\text{C}$  and 300 rpm for 1 h. The extract was filtered through cotton wool to remove solid particles and then centrifuged twice at  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  and 3600 xg for 15 min. A final ultracentrifugation at  $8\pm 1^{\circ}\text{C}$  and 15000 xg for 10 min was carried out in order to obtain a soluble fraction. The mucilaginous GLBE was obtained after precipitation at  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  for 24 h using ethanol 95% at 1:3 volume ratio (soluble fraction/ethyl alcohol).

Preliminary qualitative assays were carried out in order to confirm the nature of the GLBE extract obtained. The chemical tests included: Molish's test for carbohydrates, ruthenium red test for mucilage, Benedict's test and Fehling's test for reducing/non-reducing sugar, ninhydrin test for proteins, Folin-Ciocalteu test for total phenolic content, Shinoda test for flavonoid, ferric chloride test for tannins, and Dragendorff's test for alkaloids <sup>14, 15</sup>.

The freeze-dried GLBE was investigated by thermogravimetric analysis (TGA) and derivative thermogravimetric analysis (DTG). TGA and DTG analyses were both performed using the STA 6000 instrument (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) with a mass of 5 mg GLBE into an alumina crucible. The equipment was previously calibrated using indium (In, M.P. =  $156.6^{\circ}\text{C}$ ,  $\Delta H$  fusion =  $28.54\text{ J/g}$ ) and was heated at a  $10^{\circ}\text{C/min}$  constant rate, from 20 to  $600^{\circ}\text{C}$ , under constant nitrogen flow ( $50\text{ mL/min}$ ).

The GLBE rheological profile was performed in triplicate using a Discovery DR2 TA-Instrumentals hybrid rheometer (New Castle, DE, USA) coupled to the TC81 Peltier temperature controller kept at  $36.5^{\circ}\text{C}$  (similar to human skin temperature) and to the PP 40 Ti plate-plate sensors. A volume of 20 mL of the mucilaginous GLBE was placed on the Peltier plate in order to obtain the complex viscosity data including storage ( $G'$ ) and loss ( $G''$ ) after moduli. The rheological analysis was carried out using 30 s immersion time, 0.5 Pa tension, and logarithmic sweep with 0.1 to  $100\text{ rad/s}$

angular frequency and 5 points per decade.

FTIR spectrum was recorded using KBr tablet (4 mg of GLBE and 196 mg of spectroscopic grade KBr, 2% w/w) in the 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  range, with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  at 32 scan/min in the IR Prestige 21 equipment (Shimadzu, Kyoto, Japan).

#### **Preclinical trial: wound healing assay**

All the experiments were approved by the Ethics Committee on Animals Experimentation of the State University of Ponta Grossa (CEUA/UEPG) under process number 016/2018. The wound healing assay was carried out in accordance with the ARRIVE Guidelines<sup>16</sup>. The sample number was calculated using the Gpower 3.1 program (2020 version, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany) at 80% test power based on previous studies<sup>4,17</sup>.

The animals were selected in accordance with age and weight (standardized age approximately 3 months, weighing around 290g to 380g). The rats were weighted and separated by the probabilistic random-choice process into 3 groups of 15 animals each, amounting to a 45 Male Wistar *Ratus norvegicus albinus*. These animals were kept in the light-dark cycle of 12 h, temperature of  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , adequate ventilation system and free access to food and water.

For surgical procedure, rats were intraperitoneally (i.p.) anesthetized at 40 mg/kg of 10% ketamine and 10 mg/kg of 2% xylazine. The back of each animal was shaved and a dorsal lesion (2  $\text{cm}^2$ ) was made with a scalpel up to the level of the aponeurotic tissue and then the lesions were cleaned with 0.9% sterile saline solution. Each treatment was then applied using an aseptic procedure. The animals were divided in 3 groups: positive control (PC) – alginate foam with silver (Megisorb Ag 4 x 4 cm, Mölnlycke Health Care, Mölnlycke, Sweden); negative control (NC) – 0.9% sterile saline solution, and GLBE (5 g of mucilaginous gel). All lesions were covered with sterile bandage.

Each wound was macroscopically inspected after 7, 14, and 21 days and photographed by standardized apparatus. At each time interval, 5 animals were euthanized per group for histochemical biopsies. A sample of each dorsal lesion was collected, histologically processed, and stained with hematoxylin and eosin to evaluate the inflammatory cells and the angiogenesis. The Masson's trichrome staining was used to assess the collagen fibers. Histological analysis was blinded, since the



histological slides were identified by coding to which the examiner had no knowledge of which group of animals these slides belonged to. The scores attributed for these histological analyses were absence (0), presence (1), intensely infiltrated (2), and severely infiltrated (3) <sup>4, 17</sup>.

The statistical data were obtained using the GraphPad Prism 5 program (San Diego, CA, USA). The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The one-way ANOVA and the Tukey's post hoc test were used for the histological assays. Values were considered significant when  $p < 0.05$ .

## **Results:**

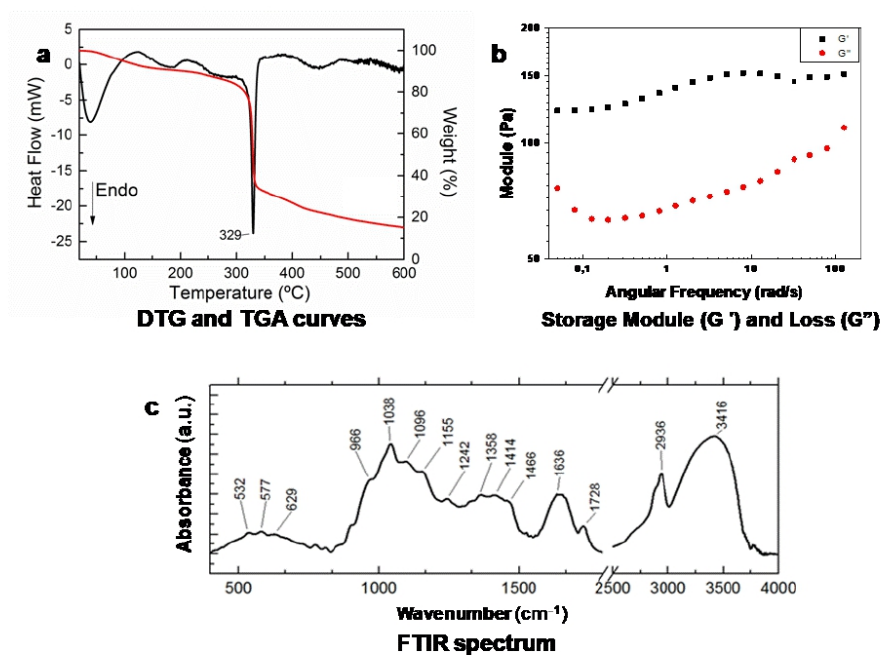
### **Preparation and characterization of guaika laurel barks extract**

The dried and powdered barks of *O. puberula* showed a suitable yield of freeze-dried mucilage (13.43%). The phytochemical results demonstrated the remarkable presence of carbohydrates and mucilage in GLBE using the Molish's test and the ruthenium red test, respectively. The Benedict's test and the Fehling's test revealed no change in color, which was corresponding to the presence of non-reducing sugar. Positive result was also observed using the Dragendorff's reagent, which means that GLBE contains alkaloids. Other photochemical assays for proteins, phenolic compounds, flavonoids, and tannins presented negative results.

The presence of phytochemicals in *O. puberula* barks mainly represented by mucilage corroborates with the indigenous use of GLBE for wound healing. The water retention capacity along with the moisturizing properties make mucilages ideal for the production of dressings for wounds and skin burns <sup>18, 19</sup>. In particular, mucilage from GLBE can also act on healing due to the fact that it is biocompatible and non-toxic since it is composed of carbohydrates. Furthermore, the GLBE is a herbal traditional practice provided by the culture-nature relations of Kaingang groups in southern Brazil and is an ethnobotanical approach for valuing the biodiversity of the Brazilian flora at the same time. There is an extensive report about the presence of aporphine alkaloids in *O. puberula* with antinociceptive effects by nullifying or reducing the perception and transmission of pain-causing stimuli <sup>11, 12</sup>. These alkaloids can increase the wound contraction rate and can reduce the time interval for epithelialization <sup>20, 21</sup>.

Figure 1a depicts the thermal results of TGA and DTG. TGA and DTG curves showed four events of mass loss. The thermal gravimetric data of GLBE sample recorded a decomposition process starting at 38°C. This event may be due to the thermal desorption of the remaining free water molecules in the sample, causing a small amount of mass loss with a loss rate of 4.4%. A second event of water loss occurred at 174°C and was assigned to the water adsorbed to carbohydrate polymers due to the binding of functional groups. After a period of heating up, the temperature reached 329°C, and entered the third stage of decomposition. The sample revealed a large amount of mass loss with a loss rate of 53.8% related to the alkaloid and mucilage compounds. The temperature continued to rise and the sample further decomposed at 445°C, and the remaining sample mass was 19.3%. This event was attributed to the amino group degradation. The obtained data by TGA/DTG revealed a regular mass degradation, which indicated that GLBE showed high purity and could be used as a phytotherapeutic material for wound healing. Furthermore, the thermal degradation of the GLBE compounds occurred above 300°C, which makes it suitable for the proposed use as a dressing for wounds, since the temperature of human skin is remarkably lower.

Fig. 1 – Characterization of GLBE by TGA (a, red line), DTG (a, black line), rheological analysis (b), and FTIR spectrum (c)



Considering the rheological data, the storage modulus ( $G'$ ) and the loss modulus ( $G''$ ) versus angular frequency (rad/s) plots for GLBE sample are described in Figure 1b. GLBE presented higher elastic modulus ( $G'$ ) than viscous modulus ( $G''$ ) and there was no crossing point between  $G'$  and  $G''$  for the range of angular frequencies applied. In that sense, GLBE demonstrated a pseudoplastic behavior that enabled it to be deformable as the share force increases. This material showed resistance to mechanical stresses as tearing, shearing, and elongation, which is an important feature for healing applications<sup>22, 23</sup>.

The FTIR spectrum of GLBE is summarized in Figure 1c. A broad O–H band at  $3,416\text{ cm}^{-1}$  was assigned to the mucilage polysaccharides. The band at  $2,936\text{ cm}^{-1}$  was attributed to the alkyl C–H stretching. The aporphalic alkaloids presented bands at  $1,466$  and  $1,414\text{ cm}^{-1}$  due to the aromatic ring. The FTIR data confirmed the results obtained in the phytochemical qualitative analysis and

demonstrated the potential of GLBE for wound <sup>19</sup> and pain <sup>11</sup> treatment, since mucilage and alkaloids have been reported as healing compounds<sup>24</sup> and angiogenic and anti-inflammatory substances <sup>25</sup>, respectively. However, these findings lack in vivo biological evidence to validate the GLBE traditional use by indigenous Kaingang groups in southern Brazil.

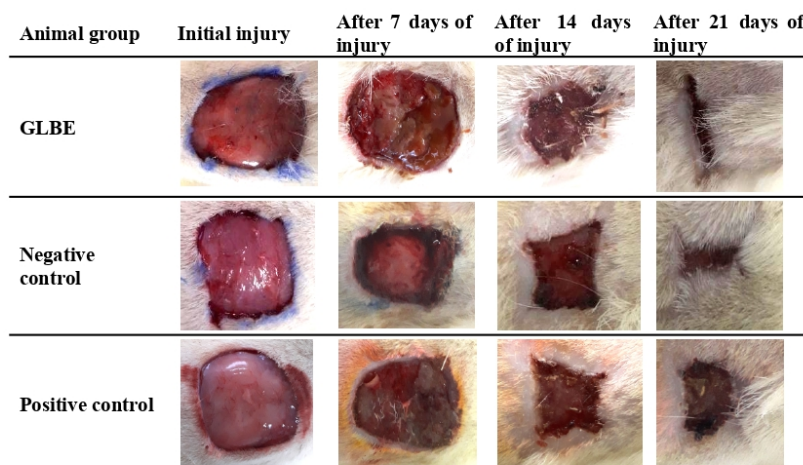
#### **Preclinical trial: wound healing assay**

The results of the macroscopic evaluation for experimental groups are illustrated in Figure 2. The GLBE group showed an increased lesion area after seven days of injury as well as the positive control. These findings are expected in the inflammatory phase of the murine lesion, since the inflammation proceeds as usual and the dominant macrophage population shifts from an inflammatory to a tissue repair phenotype characterized by secretion of various paracrine factors. These factors promote angiogenesis as well as further proliferation of fibroblastic cells, mesenchymal stem/stromal cells, and other local stem and progenitor cells <sup>26, 27</sup>.

After 14 days of injury, the proliferative phase of wound healing is typically occurring and new connective tissue or granulation tissue is formed concurrently with other healing processes, including re-epithelialization, neovascularization, and immunomodulation <sup>28</sup>. However, the macroscopic images of the lesions do not allow to examine these processes and further histological data are required to confirm the healing progression.

After 21 days of injury, GLBE demonstrated a substantial healing potential with the lesion area regression of above 90%. This performance was distinctly superior to the positive control as shown in Figure 2. In particular, the negative control presented the lesion regression behavior in an intermediate degree between the GLBE group and the positive control due to the natural course of the healing process as previously reported <sup>29, 30</sup>.

Fig.2 - Macroscopic aspect of wounds for experimental groups at different time intervals



Images are representative of wounds in Wistar rats using a standard photography apparatus

Considering the promising macroscopic findings, histological analysis was carried out in order to elucidate some probable processes involved in the wound healing progression such as the inflammatory response, the angiogenesis, and the neocollagenesis after 7, 14, and 21 days of injury, respectively. These results are described in Table 1.

Table 1

Histological scores of wounds throughout the experiment according to such criteria: inflammatory response, angiogenesis, and neocollagenesis

| Animal Group     | Inflammatory response after 7 days of injury | Angiogenesis after 14 days of injury | Neocollagenesis after 21 days of injury |
|------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|
|                  | Mean $\pm$ SD                                | Mean $\pm$ SD                        | Mean $\pm$ SD                           |
| GLBE             | 2.20 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>                 | 2.40 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>         | 2.00 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>            |
| Negative control | 1.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>                 | 1.60 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>         | 2.40 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>            |
| Positive control | 1.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>                 | 1.20 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>         | 2.60 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>            |

\*One-way non-parametric ANOVA (Kruskal-Wallis test); different letters on the lines indicate statistical difference ( $p < 0.05$ ).

GLBE – Guaika Laurel Bark Extract; SD – Standart deviation

GLBE demonstrated a statistically higher histological score than the respective controls for the inflammatory response. This enhanced inflammatory process, but not excessive, was essential for the

inflammatory phase of wound healing, since it allowed a suitable activation of cellular and humoral elements fundamental to healing. In addition, the process of wound inflammation is crucial for the optimal completion of hemostasis, as well as the detection and elimination of pathogenic microorganisms, the removal of damaged tissues, and wound cleaning. Furthermore, leukocytes (mainly macrophages) are responsible for the timely and adequate preparation of wound tissues for proliferation<sup>31, 32</sup>.

A significant angiogenesis was reported for the GLBE group after 14 days of injury, when compared to control groups. Remarkably, this finding could not be verified by the macroscopic analysis and was only histologically observed. This experimental evidence may be related to the presence of aporphine alkaloids in the GLBE composition. Alkaloids, according to previous studies, can stimulate new vessels in lesions and can promote fibroblasts proliferation and/or collagen production<sup>19, 20, 21, 24, 33</sup>. As a result of this neovascularization, with suitable supply of micronutrients and tissue oxygenation<sup>27</sup>, a better lesion regression was macroscopically achieved after 21 days of injury.

Considering the neocollagenesis, no statistically significant difference was obtained. The acute wound in a healthy rat model has a rapid course and is usually closed in 21 days, which provides an expanded window of observation and identification of critical events involved in wound repair<sup>34</sup>. Thus, the end of the acute process for all groups did not allow to establish differences between them.

In brief, GLBE was essential in the inflammatory and the proliferative stages of wound healing due to improve the cell migration and the angiogenesis<sup>35, 36, 37</sup>. In that sense, the healing potential of GLBE, traditionally used by the Kaingang indigenous community from southern Brazil, was preclinically confirmed. This study can support the design of novel wound dressings containing this ethnopharmacological-based strategy for wound repair.

#### **Conclusion:**

The mucilaginous guaika laurel barks extract (GLBE) was effective as an indigenous traditional practice for treating wounds. GLBE presented alkaloids and polysaccharides as the main chemical constituents. This natural product showed thermal stability and pseudoplastic rheological

behavior. GLBE provided a remarkable regression of skin lesions in the macroscopic evaluation of tissue repair after 21 days. The histological analysis demonstrated an enhanced inflammatory response and angiogenesis. GLBE proved to be an expressive ethnopharmacological knowledge of the Kaingang community from southern Brazil.

**Keywords:** aporphine alkaloids, ethnomedicine, healing process, mucilage, *Ocotea puberula*.

#### **Acknowledgements**

We thank our colleagues from State University of Ponta Grossa, mainly from the Laboratory of Drug Development and Industrial Pharmacy, who provided insight and expertise that greatly assisted the research.

#### **Author contributions**

All authors had significant contributions to the evaluation and framing of the manuscript. G.A., P.V.F., M.D.R.G., and L.A.P. were responsible for the broad construction of the paper. P.V.F. addressed ethical and botanical considerations. G.M.B., J.M.N., and A.N. collected characterization data. L.C.L., A.Y.K., and B.C. performed the preclinical trial. L.A.P. carried out the statistical analyses. G.A. and G.M.B. wrote the first draft of the manuscript, and G.A., P.V.F., and L.A.P. contributed to writing the final versions of the manuscript.

#### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### **Funding**

This study was supported by the State University of Ponta Grossa and CNPq (grant number 313704/2019-8).

#### **Ethical statement**

This research was approved by the institutional animal care and use committee (CEUA Process 014/2016 and UEPG protocol 6378/2016).

### Data availability

The data supporting the findings of this study are owned by the authors and are available for consultation should you need them.

### References

1. Nussbaum, S. R., Carter, M. J, Fife, C. E., Joan Davanzo, J. Haught, R, Nusgart, M., Cartwright, D. An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. *Value in Health Journal* v. 21, p 27 – 32, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jval.2017.07.007>
2. Guest J. F, Fuller G. W, Vowden P. Cohort study evaluating the burden of wounds to the UK's National Health Service in 2017/2018: update from 2012/2013. *BMJ Open* 2020;10:e045253. doi:10.1136/bmjopen-2020-045253
3. Gupta, S; Sagar, S; Maheshwari, G; Kisaka, T.; Tripathiet, S. Chronic wounds: magnitude, socioeconomic burden and consequences. *Wounds Asia* 2021 Vol 4, Issue 1
4. Carletto B., Koga A. Y., Novatski, A., Mainardes, R. M., Lipinski, L. C., Farago P. V. Ursolic acid-loaded lipid-core nanocapsules reduce damage caused by estrogen deficiency in wound healing. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2021 Jul; 203:111720. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111720.
5. Basu, P; Kumar, U. N; Manjubala, I. Wound healing materials – a perspective for skin tissue engineering – Review Article. *Rev: Current Science*, Vol. 112, No. 2392-2404, 25 June 2017.
6. Silva, T. G., Vasconcelos, A. P. L.; Ramos, E. V. C.; Farias Neto, J. P. Avaliação da qualidade de vida de pacientes portadores de feridas crônicas atendidos no ambulatório de cicatrização do Hospital Universitário de Sergipe. *R. Bras. Qual. Vida*, Ponta Grossa, v. 9, n. 3, p. 234-246, jul./set. 2017.
7. Mir, M., Ali, M. N., Barakullah, A., Gulzar, A., Arshad, M., Fatima, S., Asad, M. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Progress in Biomaterials* V.7 p. 1-21. 2018. <https://doi.org/10.1007/s40204-018-0083-4>



8. Sarmento, P.A.; Ataíde, T. R.; Souza e Pinto, A. P.; Araújo-Júnior, J. X.; Lúcio, I. M. L.; Bastos, M. L. A. Avaliação do extrato da *Zeyheria tuberculosa* na perspectiva de um produto para cicatrização de feridas. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 22, n.1, p. 165-72, 2014.
9. Bernardo, T. H. L.; Veríssimo, R. C. S. S.; Alvino, V. et al. Antimicrobial Analysis of an Antiseptic Made from Ethanol Crude Extracts of *P. granatum* and *E. uniflora* in Wistar Rats against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *The Scientific World Journal*, v. 2015, p. 1-7, 2015.
10. Santos, V. P., Trindade, L. M. P. Nursing in the use of medicinal plants and phytotherapy with emphasis in public health. *Revista Científica Fac Mais*, V.8, I. 1. P. 17-34. 2017.
11. Montrucchio, D. P.; Córdova, M. M.; Santos, A. R. S. Plant Derived Aporphinic Alkaloid S-(+)-Dicentrine Induces Antinociceptive Effect in Both Acute and Chronic Inflammatory Pain Models: Evidence for a Role of TRPA1 Channels. *Rev. PLOS ONE*. Vol 8 Ed 7 pág 1-9 July 2013.
12. Albarracín, L. T., Patiño O. J., Guzmán, J. D., Begum, P. N., Mchugh, T. D., Cuca, L. E., Ávila, M. C. Aporphine alkaloids with antitubercular activity isolated from *Ocotea discolor Kunth* (Lauraceae). *Rev. Colomb. Quím.* V.46 I. 3. P. 22-27. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n3.62963>
13. Brotto, M. L. *Estudo Taxonômico Do Gênero Ocotea Aubl. (Lauraceae) Na Floresta Ombrófila Densa No Estado Do Paraná, Brasil*. Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba / PR 2013
14. Choudhary, P. D., Pawar, H. A. Recently Investigated Natural Gums and Mucilages as Pharmaceutical Excipients: An Overview. *Hindawi Publishing Corporation / Journal of Pharmaceutics*. Volume 2014, Article ID 204849, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/204849>
15. Singhal, A., Mazumder, R., Mazumder, A. Chakraborty, G.S. Phytochemical screening and

antioxidant property of methanolic extract of *Bauhinia variegata* leaves. *Advance Pharmaceutical Journal* 2016; 1(4): 90-94.

16. Percie, S. N, Hurst V, Ahluwalia, A *et al.*. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biology*. 2020 doi: 10.1371/journal.pbio.3000410.

17. Santos, T.S.; Santos, I.D.D.d.; Pereira-Filho, R.N.; et al. Histological Evidence of Wound Healing Improvement in Rats Treated with Oral Administration of Hydroalcoholic Extract of *Vitis labrusca*. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2021, 43, 335–352. <https://doi.org/10.3390/cimb4301002818>.

18. Martelli, A.; Andrade, T. A. M.; Santos, G. M. T. Perspectivas na utilização de fitoterápicos na cicatrização tecidual: revisão sistemática. *Arch Health Invest* 2018, v.7 n.8, p. 344-350. <http://dx.doi.org/10.21270/archi.v7i8.3047>

19. Stepien, D. K.; Otlewska, A.; Gózd, P.; Piotrowska, M. The Renaissance of Plant Mucilage in Health Promotion and Industrial Applications: A Review. *Nutrients* 2021, 13, 3354. <https://doi.org/10.3390/nu13103354>

20. Fetse, J. P.; Kyekyeku, J. O. Dueve, E. Mensah, K. B. Wound healing activity of total alkaloid extract of the root bark of *Alstonia boonei* (Apocynaceae) *British Journal of Pharmaceutical Research* 4(23): 2642-2652, 2014.

21. Sukmawan, Y. P.; Alifiar, I.; Nurdianti, L. Ningsih, W. R. Wound Healing Effectivity of the Ethanolic Extracts of *Ageratum conyzoides* L. Leaf (White and Purple Flower Type) and *Centella asiatica* and Astaxanthin Combination Gel Preparation in Animal Model. *Turk J Pharm Sci* 2021; 18(5): 609-615 DOI: 10.4274/tjps.galenos.2021.34676

22. Stojkov, G.; Niyazov, Z.; Picchioni, F.; Bose, R.K. Relationship between Structure and Rheology of Hydrogels for Various Applications. *Gels* 2021, 7, 255. <https://doi.org/10.3390/gels7040255>

23. Milan, E.P.; Bertolo, M.R.V.; Martins, V.C.A.; Bogusz Junior, S.; Plepis, A.M.G. Chitosan and

Collagen-Based Materials Enriched with Curcumin (*Curcuma longa*): Rheological and Morphological Characterization. *Polysaccharides* 2022, 3, 236–249. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3010013>

24. Tosif, M.M.; Najda, A.; Bains, A.; Kaushik, R.; Dhull, S.B.; Chawla, P.; Walasek-Janusz, M. A Comprehensive Review on Plant-Derived Mucilage: Characterization, Functional Properties, Applications, and Its Utilization for Nanocarrier Fabrication. *Polymers* 2021, 13, 1066. <https://doi.org/10.3390/polym13071066>

25. Lu, K.; Bhat, M. and Basu, S. Plants and their active compounds: natural molecules to target angiogenesis. *Angiogenesis*. 2016 July ; 19(3): 287–295. doi:10.1007/s10456-016-9512-y.

26. Mescher, A. L. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration*. 2017;4:39–53. DOI: 10.1002/reg2.77

27. Gushiken, L.F.S.; Beserra, F.P.; Bastos, J.K.; Jackson, C.J.; Pellizzon, C.H. Cutaneous Wound Healing: An Update from Physiopathology to Current Therapies. *Life* 2021, 11, 665. <https://doi.org/10.3390/life11070665>

28. Rodrigues, M.; Kosaric, N.; Bonham, C. A.; Gurtner, G. Wound healing: a cellular perspective. *Physiol Rev* 99: 665–706, November 21, 2018. doi:10.1152/physrev.00067.2017

29. Baron, J. M.; Glatz, M. and Proksch, E. Optimal Support of Wound Healing: New Insights. *Dermatology* 2020; 236:593–600. DOI: 10.1159/000505291

30. Abbade, L. P. F., Frade, M. A. C.; Pegas, J. R. P. et al. Consensus on the diagnosis and management of chronic leg ulcers - Brazilian Society of Dermatology. *An Bras Dermatol*. 2020; 95 (S1): 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2020.06.002>

31. Gonzales, A. C. O.; Costa, T. F.; Andrade, Z. A.; Medrado, A. R. A. P. Wound healing - a literature review. *An Bras Dermatol*. 2016;91(5):614-20.DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>

32. Stupin, V. Manturova, N, Silina, E. et al. The Effect of Inflammation on the Healing Process of

Acute Skin Wounds Under the Treatment of Wounds with Injections in Rats. *Journal of Experimental Pharmacology* 2020;12 409–422. <http://doi.org/10.2147/JEP.S275791>

33. Vitale, S.; Colanero, S.; Placidi, M.; Di Emidio, G.; Tatone, C.; Amicarelli, F.; D'alessandro, A.M. Phytochemistry and Biological Activity of Medicinal Plants in Wound Healing: An Overview of Current Research. *Molecules* 2022, 27, 3566. <https://doi.org/10.3390/molecules27113566>

34. Grada, A.; Mervis, J; Falanga, V. Research techniques made simple - animal models of wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* (2018), 138, 2095e2105; doi:10.1016/j.jid.2018.08.005

35. Childs, D.; Murthy, A. S. Overview of wound healing and management. *Surg Clin N Am* 97 (2017) 189–207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2016.08.013>

36. Zhang X-n, Ma Z-j, Wang Y, Sun B, Guo X, Pan C-q, et al. *Angelica Dahurica* ethanolic extract improves impaired wound healing by activating angiogenesis in diabetes. *PLoS ONE* 2017 12(5): e0177862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177862>

37. Wilkinson, H.N.; Hardman; M.J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol.* V. 10, p. 2002-23. 2020 <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.200223>