

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

*TRATAMENTO DE LESÕES TRAUMÁTICAS AGUDAS DE PELE
NA MÃO COM *Calendula Officinalis* L. Estudo Clínico Randomizado*

Aluna: Giana Silveira Giostri

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza

Co-Orientadora: Profa. Dra. Marcia Olandoski

Curitiba, novembro/2021

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TRATAMENTO DE LESÕES TRAUMÁTICAS AGUDAS DE PELE
NA MÃO COM Calendula officinalis L. Estudo Clínico Randomizado

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza
Co-Orientadora: Profa. Dra. Marcia Olandoski

Curitiba, novembro/2021

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

G499t
2021

Giostri, Giana Silveira

Tratamento de lesões traumáticas agudas de pele na mão com *calendula officinalis* L : um estudo clínico randomizado / Giana Silveira Giostri ; orientador: Luiz Cezar Guarita de Souza ; co-orientadora: Marcia Olandoski. – 2021.
76, [10] f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2021
Bibliografia: 70-76

1. Mãos - Ferimentos e lesões. 2. Dedos - Ferimentos e lesões.
3. Cicatrização de feridas. 4. Calendula. I. Souza, Luiz Cezar Guarita de.
II. Olandoski, Marcia. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617.575



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos **30** do mês de novembro de 2021 às **19:00**, realizou-se a sessão aberta de Defesa de Tese “**TRATAMENTO DE LESÕES TRAUMÁTICAS AGUDAS DE PELE NA MÃO COM Calendula Officinalis L.: Estudo Clínico Randomizado**” apresentado por **Giana Silveira Giostri** para obtenção do título de Doutor; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

| MEMBROS DA BANCA | ASSINATURA |
|---|-------------------|
| Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza - Presidente | |
| Profa. Dra. Lucia da Noronha (PUCPR) | |
| Prof. Dr. Jamil Faissal Soni (PUCPR) | |
| Prof. Dr. Carlos Henrique Fernandes (UNIFESP) | |
| Prof. Dr. Júlio César Francisco (Universidade Positivo Paraná) | |

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

| | |
|--|--------------------|
| Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza | Conceito: Aprovada |
| Profa. Dra. Lucia da Noronha | Conceito: Aprovada |
| Prof. Dr. Jamil Faissal Soni | Conceito: Aprovada |
| Prof. Dr. Carlos Henrique Fernandes | Conceito: Aprovada |
| Prof. Dr. Júlio César Francisco | Conceito: Aprovada |

Parecer Final: Aprovada

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

FOLHA INFORMATIVA

Esta tese de doutorado foi elaborada seguindo a normatização estabelecida pela American Medical Association.

O trabalho foi realizado nas instalações do Hospital Universitário Cajuru PUCPR, Ambulatório de Cirurgia da Mão.

O produto estudado foi adquirido pelos autores do trabalho com recursos próprios.

Declaramos que não houve conflito de interesse na realização da presente tese.

Os dados que embasam os achados deste estudo estão disponíveis abertamente no ReBEC (Plataforma Brasileira de Registro de Ensaio Clínicos) em <https://ensaiosclinicos.gov.br/>, número de referência RBR-3sg8mbc.

Esta pesquisa resultou em artigo publicado no *Journal Tissue Barriers. Treatment of Acute Wounds in Hand with Calendula officinalis L. A randomized trial*. DOI: 10.1080/21688370.2021.1994822. Aceito para publicação em 10 de outubro de 2021. Taylor & Francis em 22 de outubro de 2021 (anexo 2).

AGRADECIMENTOS

Dedico esta tese de doutorado à PUCPR, onde aprendi a ser médica e tenho a satisfação de colaborar atualmente como professora adjunta da Escola de Medicina.

Agradeço aos meus orientadores pela paciência e atenção. À Prof. Marcia Olandoski por compartilhar seu conhecimento e ajudar com dados e análises estatísticas.

Sinceros agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR por ter me acolhido e incentivado. À eficiência e profissionalismo da secretária Paula Maira do Nascimento e a todos os professores que me enriqueceram com seus ensinamentos. Em especial nomino, Prof^a. Cristina Baena e Prof. Thyago de Moraes por sua sempre solicitude e norteamento preciso; Prof^a Lucia de Noronha e Prof. Ricardo Pinho por opiniões claras e pontuais durante as recomendações sobre metodologia científica e; Prof. Paulo Kotze por seus conselhos esmerados.

Gratidão a todos que participaram e auxiliaram na etapa de recrutamento e avaliação de pacientes do estudo clínico e em especial à enfermeira Franciele de Freitas por sua ajuda na coleta de dados.

Agradeço à Prof^a. Areta Ulhana Galat, Mestre em Artes no Ensino de Inglês como Segunda Língua da Universidade de Illinois, Urbana – Champaign, pela edição da língua, por sua amizade e dedicação no auxílio com a língua inglesa.

Ao grupo de cirurgia da mão iniciado em 2001 como serviço formador de médicos residentes na especialidade, que cresceu gradualmente nestes 20 anos e se tornou o IEP Mão (Instituto de Ensino e Pesquisa em Cirurgia da Mão). Obrigada amigos pelo apoio e compreensão incondicionais.

Agradecimento ao Prof. Dr. Eduardo Murilo Novak pela parceria profissional e total apoio não somente na realização desta pesquisa, mas, especialmente por todas as palavras e atitudes animadoras durante meu período como doutoranda. Meu profundo respeito, admiração e amizade.

A minha família. Meus pais, Dra. May Silveira Giotri e Dr. José Giotri Sobrinho que educaram seus três filhos com preceitos de justiça, honestidade e equidade e, marcaram indelevelmente nossas vidas elevando o patamar de possibilidades e oportunidades pessoais e profissionais. Aos meus irmãos, Marco e Helena, Jomar e Sueli, por seu sempre apoio e carinho em todos os momentos de minha vida. Gratidão aos filhos amados Luiza e Francisco que desde sempre compreenderam e acompanharam a natureza intensa de sua mãe e trilharam seus caminhos com sensibilidade e respeito ao próximo.

À César Augusto Baggio Pereira por compreender minha inquietude, trazer leveza para minha existência e balizar minhas decisões com carinho e atenção. Meu amor eterno.

RESUMO

Cicatrização por segunda intenção é prática usual em perdas superficiais de pele. Traumas de mão e dedos, frequentes emergências hospitalares, especialmente em polpas digitais são apropriadas para cura por segunda intenção. *Calendula officinalis* L. representa fonte de compostos facilitadores a cura cicatricial podendo acelerar epitelização de feridas agudas e retorno mais rápido a função da mão. O objetivo foi analisar por planimetria a progressão e velocidade cicatricial por segunda intenção em feridas agudas de mão e dedos utilizando extrato padronizado de *Calendula officinalis* L. (EPC). Estudo clínico randomizado controlado e alocação de 20 pacientes com perda de pele em mão e dedos tratados com cicatrização por segunda intenção em cada grupo. Controle (GC) usou óleo mineral e intervenção (GI), EPC. Fotografias das feridas foram tomadas a cada avaliação ambulatorial até a epitelização. Áreas das feridas foram mensuradas com ImageJ. Os 17 pacientes com 19 lesões do GI e 19 pacientes com 19 lesões do GC apresentaram homogeneidade em relação a idade, sexo, presença de diabete e consumo de tabaco. Os dois grupos foram compostos na maioria por homens na quarta década de vida com feridas em dedo indicador e anular, no lado esquerdo. Áreas iniciais das feridas, intervalo entre as avaliações ambulatoriais e contração das lesões foi similar nos dois grupos. Tempo de epitelização foi menor (GI = $13,2 \pm 7,4$ dias *versus* GC = $8,6 \pm 4,7$ dias, $p = 0,046$) e velocidade de cicatrização mais rápida no GI (GI = $9,5 \pm 5,8$ %_{dia} *versus* GC = $6,2 \pm 2,9$ %_{dia}, $p = 0,036$), levando a conclusão de que a cicatrização por segunda intenção em feridas agudas de mão e dedos resultou em epitelização mais veloz com o uso do EPC.

Palavras-chave: cicatrização de feridas; traumatismos da mão; lesões dos dedos; *Calendula officinalis*.

ABSTRACT

Most injuries in the hand and fingers, especially on the digital pulps, are suited for healing by secondary intention. Nevertheless, delay in epithelization seems to unfavorably restrict this technique. The purpose of this controlled randomized clinical trial is to analyze by means of photo planimetry the progression of the healing process by secondary intention in acute wounds of the hand using the standardized extract of *Calendula officinalis* L. (SEC). The cohort of eligible participants included two groups of 20 patients with skin loss in the hand and fingers treated by secondary intention. Control group (CG) used mineral oil and intervention group (IG) received SEC. Wound pictures were captured at each outpatient assessment until epithelization was achieved and measured with ImageJ. Intervention group (IG) and control group (CG) with 19 wounds each, primarily formed by men in their 40's with wounds in their index and ring fingers on the left side, showed homogeneous variables and similar initial wound areas. Epithelization time was shorter and healing speed was faster in IG (IG= 8.6 ± 4.7 days and $9.5 \pm 5.8\%$ day versus CG = 13.2 ± 7.4 days and $6.2 \pm 2.9\%$ day, $p < 0.05$), leading to the conclusion that healing by secondary intention in acute wounds of the hand and fingers with SEC led to a faster epithelization.

Keywords: wound healing; hand injuries; finger injuries; *Calendula*.

RESUMO POPULAR

A *Calendula officinalis* L., conhecida como calêndula, é uma planta da família *Asteraceae* utilizada em várias preparações, medicinais, cosméticas e alimentícias. A ideia desta pesquisa foi utilizar um produto gerado a partir da extração padronizada da flor de calêndula para auxiliar na cicatrização de feridas em mão e dedos. Pacientes que procuraram o pronto socorro de nossa instituição com perdas cutâneas em mão e dedos foram recrutados para a pesquisa. Essas lesões eram acompanhadas rotineiramente no ambulatório de cirurgia da mão onde eram orientados para curativos diários em casa com óleo mineral e gaze seca até que a ferida tivesse a pele reconstruída novamente. Semanalmente as feridas eram checadas nas consultas ambulatoriais. Os pacientes que leram e entenderam a motivação da pesquisa foram divididos em dois grupos por meio de sorteio de envelopes fechados. Um grupo, chamado controle, continuou sendo tratado com a mesma prática, de curativos diários com óleo mineral. No outro grupo utilizaram-se curativos diários com o extrato de calêndula. As feridas nos dois grupos foram fotografadas semanalmente até que houvesse epitelização. Posteriormente, mediu-se a área das feridas fotografadas dos pacientes nos dois grupos em cada dia de avaliação ambulatorial, durante todo o processo cicatricial. Por meio de cálculos que envolveram principalmente área e tempo de cicatrização, chegamos à conclusão de que as feridas que foram tratadas com extrato padronizado de calêndula formaram pele mais rapidamente do que as tratadas com o método convencional.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Ferida no dedo em etapa final da cicatrização por segunda intenção..... | 49 |
| Figura 2 - Curva de Kaplan Meier: Evolução da epitelização nos grupos..... | 56 |
| Figura 3 - Evolução clínica do grupo intervenção..... | 57 |
| Figura 4 - Evolução clínica do grupo controle | 57 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Comparação dos grupos em relação à idade e variáveis categóricas (sexo, presença de diabete e consumo de tabaco)..... | 53 |
| Tabela 2 - Distribuição das lesões nos grupos, controle e intervenção, em relação ao local da lesão e lateralidade | 54 |
| Tabela 3 - Variáveis quantitativas referentes as 19 lesões traumáticas em cada grupo (controle e intervenção)..... | 54 |
| Tabela 4 - Modelos de Regressão Linear | 55 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------|--|
| Ai | área inicial |
| Af | área final |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| bFGF | basic fibroblast growth factor |
| CAAE | Certificado de Apresentação de Apreciação Ética |
| CLd | contração da lesão por dia |
| CONSORT | <i>Consolidated Standards of Reporting Trials</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| HPLC | <i>high performance liquid chromatography</i> |
| JAMs | Junctional adhesion molecules |
| NEISS-USA | <i>National Electronic Injury Surveillance System – United States of America</i> |
| PI3K | phosphatidylinositol 3-kinase |
| PUCPR | Pontifícia Universidade Católica do Paraná |
| REBEC | Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos |
| ROS | <i>reactive oxygen species</i> |
| TJs | <i>tight junction proteins</i> |
| TGF- β ₁ | transforming growth factor beta 1 |
| VC%d | velocidade de cicatrização percentual por dia |
| ZOs | zonula occludens |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 | JUSTIFICATIVA..... | 19 |
| 2 | OBJETIVO GERAL | 20 |
| 2.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| 2.2 | OBJETIVO EXPLORATÓRIO..... | 20 |
| 3 | REVISÃO DA LITERATURA | 21 |
| 3.1 | TRAUMAS NA MÃO | 21 |
| 3.2 | CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO..... | 24 |
| 3.2.1 | Processo Cicatricial | 24 |
| 3.2.2 | Segunda intenção em procedimentos de pele | 34 |
| 3.2.3 | Uso de curativos e cicatrizantes durante segunda intenção | 37 |
| 3.2.4 | Mensuração de feridas | 38 |
| 3.2.5 | Fatores que interferem na cura de perdas cutâneas | 40 |
| 3.3 | <i>CALENDULA OFFICINALIS</i> L..... | 41 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 46 |
| 4.1 | RECRUTAMENTO | 46 |
| 4.2 | CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO..... | 47 |
| 4.3 | RANDOMIZAÇÃO E ALOCAÇÃO | 47 |
| 4.4 | INTERVENÇÃO | 48 |
| 4.5 | CAPTAÇÃO DE FOTOGRAFIAS DAS FERIDAS..... | 49 |
| 4.6 | ESTUDO PILOTO..... | 50 |
| 4.7 | PLANIMETRIA..... | 50 |
| 4.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 51 |
| 5 | RESULTADOS..... | 53 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 6 | DISCUSSÃO..... | 59 |
| 7 | CONCLUSÃO | 67 |
| 8 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 68 |
| | REFERÊNCIAS | 70 |
| | ANEXO A - Diagrama de Fluxo | 77 |
| | ANEXO B - Artigo Publicado | 78 |

1 INTRODUÇÃO

Feridas ocasionadas por traumas agudos nos dedos e na mão são comuns nos serviços de urgência médica. Representam entre 20% e 40% de todas as emergências em um pronto atendimento.¹⁻⁴ Os traumas que atingem partes moles nos dedos correspondem a cerca de 70% das lesões nas mãos e ocorrem com maior frequência no ambiente domiciliar.^{5,6} Apesar disso, Shi et al⁷ advertem que 28% de todas as lesões na mão são relacionadas ao trabalho remunerado. Artigos demonstram preocupação com o afastamento desses trabalhadores após um trauma na mão e o custo direto e indireto que esse tempo representa para a comunidade.^{2,7,8}

Em algumas lesões traumáticas na mão ocorre perda cutânea e nem sempre a aproximação completa de suas margens é possível, restando áreas de exposição da tela subcutânea. A condução dessas perdas de pele depende de fatores relacionados a ferida, especialmente tamanho e profundidade; ao paciente, quanto a presença de comorbidades, profissão e estilo de vida; além da experiência do cirurgião.^{9,10} Em áreas pequenas e superficiais, o fechamento por segunda intenção passa a ser considerado como alternativa plausível e com bons resultados. Essas áreas, em que a cicatrização por primeira intenção não foi possibilitada, podem ser deixadas sem cobertura de pele desde que inexista exposição de estruturas diferenciadas como ossos, nervos, vasos e tendões sem sinóvia. A exposição dessas estruturas diferenciadas requer cobertura de pele vascularizada com retalhos locais, pediculados ou até mesmo microcirúrgicos.^{9,10} Tela subcutânea, músculos e tendões cobertos por bainha sinovial apresentam meio propício para progredir no processo de granulação e epitelização. Especificamente nas perdas superficiais de pele da mão, o prazo interfere diretamente no retorno às atividades anteriores ao trauma. Kakar¹⁰ cita que lesões de 1.5 cm sem exposição óssea tendem a epitelizar em período superior a quatro semanas, o que impacta na produtividade de trabalhadores envolvidos nessas lesões. Portanto, o tempo para

a cicatrização por segunda intenção é incerto e pode se tornar o ponto crucial na tomada de decisão para seu uso.

O processo da cicatrização por segunda intenção é descrito em três fases, inflamatória, proliferativa e remodelação.^{11,12} O início do processo de coagulação com ativação das plaquetas e liberação de histamina marca a fase inflamatória com pico entre dois e três dias e perdurando até mais de duas semanas. Neutrófilos e macrófagos recrutados facilitam o desbridamento e a secreção de citocinas e de fatores de crescimento, que fazem a pavimentação para a ação dos fibroblastos e a angiogênese, características da fase proliferativa, onde haverá epitelização da ferida. Para que ocorra proliferação, migração uniforme e diferenciação dos queratinócitos, deve haver adesão entre as células adjacentes e a superfície subjacente. Esse processo é regulado por proteínas integrantes da membrana juncional incluindo claudinas, ocludinas e moléculas de adesão juncional, que interferem especialmente durante a reconstrução da epiderme perdida e reestruturação da derme.¹³ Na continuidade dessa segunda fase, os queratinócitos seguem migrando das margens da ferida, há organização do colágeno, elastina, ação de proteoglicanos, determinando a epitelização. Na última fase de remodelação, que perdura por cerca de um ano, há compactação do tecido de granulação e ação de miofibroblastos que mediam a contração da ferida. Ao final do processo, a rotatividade das metaloproteinases da matriz transforma colágeno III em colágeno I, aumentando resistência e elasticidade no tecido cicatricial.^{11,12}

Durante o processo de epitelização em que houve opção por segunda intenção é recomendada a troca frequente de curativos, porém não há padronização para essa frequência ou para o uso de substâncias que poderiam auxiliar no processo. Lewis et al¹⁴ concluíram em revisão sistemática, não haver superioridade de algum dos protocolos de curativos com ou sem agentes desbridantes durante o processo de cicatrização por segunda intenção. Nesse sentido, a *Calendula officinalis* L. é encontrada entre os produtos estudados para auxiliar no

processo de cicatrização, acelerando a epitelização.^{15,16} A calêndula teve seu uso difundido durante a Guerra Civil Norte Americana e a Primeira Guerra Mundial, no tratamento de ferimentos em soldados. Porém, a forma de utilização simples e indiscriminada, sem a extração específica de suas propriedades, minimizou os benefícios e banalizou sua utilização. A partir do desenvolvimento de técnicas mais controladas e efetivas para a extração de insumos, a calêndula passou a ser utilizada com segurança na indústria cosmética e farmacológica. Atualmente, é considerada uma substância segura por FDA (*Food and Drug Administration*) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).¹⁷ Seguindo o processo padronizado de extração da planta produz-se extrato rico em saponinas, flavonoides, álcool, monoésteres triterpenos, hidroxycumarina, carotenoides e taninos, que age diretamente na cicatrização e apresenta várias outras ações que atuam no controle da inflamação e do edema, além de efeitos imunomoduladores, anti-bacterianos, anti-fúngicos, anti-virais, anti-oxidantes e anti-tumorais.^{17,18} A sistematização da extração dos capítulos florais da planta utilizando-se veículo hidroglicólico associado a pressão, frequência e temperaturas controladas, favorece a síntese otimizada e garante a produção de insumo farmacêutico ativo vegetal padronizado. Essa extração sistematizada da calêndula resulta em alto teor de monoésteres triterpenos, lupeol e faradiol, que agem de forma eficaz na atenuação dos mecanismos inflamatórios e na aceleração dos processos cicatriciais.^{18,19}

O embasamento científico das propriedades benéficas dos triterpenos e sua potencial ação como agentes cicatrizantes são fundamentados em diversas pesquisas científicas. Revisão sistemática com análise de doze artigos concluiu que os triterpenos induziram a redução do tempo de fechamento das lesões por segunda intenção em modelo experimental animal.²⁰ Com base nos mecanismos de ação, os autores relataram que os triterpenos também modulam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no microambiente da lesão, acelerando o processo de reparo tecidual, induzindo migração celular, proliferação celular e

deposição de colágeno no local lesionado.²⁰ Della Loggia et al²¹ foram os primeiros a citar que os resultados da ação anti-inflamatória do extrato de calêndula são proporcionais às concentrações obtidas de monoésteres do faradiol e, que sua associação aos outros componente do extrato, tem importante papel no mecanismo de reparo cicatricial. Zitterl-Eglseer et al,²² ao separar e isolar monoésteres de faradiol em extrações da *Calendula officinalis* L., ressaltaram sua propriedade antiinflamatória e demonstraram que o faradiol apresenta o mesmo efeito da indometacina, em dose equimolar. Outro estudo *in vitro* utilizando a técnica de *scratch assay* em linhagens de fibroblastos determinou efeito positivo nas fases da cicatrização com uso de extrato de calêndula e monoésteres triterpenos, como palmitato e miristato de faradiol.¹⁸ Patel et al¹⁹ avaliaram o potencial biológico de atividade antioxidante e antimicrobiana do lupeol. O trabalho concluiu que esse monoester triterpeno apresenta propriedade para eliminar radicais livres em taxa proporcional a sua concentração utilizada. Os testes realizados com metodologia de disco difusão confirmaram a atividade antimicrobiana observando os halos de inibição formados no ágar.

Em modelo animal, o uso da *Calendula officinalis* L. em perdas cutâneas apresenta resultados animadores na análise histopatológica das lesões, como estímulo na angiogênese, aumento de hidroxiprolina e hexosamina, as quais impactam na formação do colágeno e na redução do tempo de epitelização comparado a um grupo controle.²³ No mesmo sentido, extratos de calêndula vêm sendo citados por autores com bons resultados em feridas complicadas e crônicas, como as resultantes de úlcera venosa, de pressão e diabética, por sua propriedade inicial anti-inflamatória e interferência positiva na síntese de colágeno.²³⁻²⁵ Entretanto, o uso de extratos da calêndula em ensaios clínicos com feridas agudas é pouco documentado e, especificamente em perdas cutâneas traumáticas de mão e dedos não foi encontrado em busca científica na atualidade. Motivada por caso clínico com grande perda cutânea tratada com extrato de calêndula que evoluiu com rápida epitelização e baseada em

propriedades facilitadoras para a cura cicatricial citadas na literatura, surgiu a hipótese se a *Calendula officinalis* L. seria capaz de acelerar a epitelização de feridas agudas e propiciar retorno mais rápido as atividades funcionais da mão. Nesse contexto, a dissertação desta tese de doutorado busca comparar a *Calendula officinalis* L. com um grupo controle, procurando evidências de seu papel no processo de regeneração tecidual superficial.

1.1 JUSTIFICATIVA

As perdas de substância de pele em mão e dedos demandam tempo para a cicatrização completa e resultam no afastamento das atividades manuais dos indivíduos acometidos. O tempo de cura dessas feridas é crucial para que a produtividade do trabalhador não seja prejudicada. Por isso, acelerar o processo de epitelização quando a segunda intenção foi utilizada nos parece justificativa plausível para o estudo, visando propiciar o retorno precoce de atividades diárias nos indivíduos acometidos por perdas cutâneas traumáticas agudas em mão e dedos.

Outro ponto a ser considerado é a lacuna existente na literatura referente ao uso de extratos de *Calendula officinalis* L. em estudos clínicos de feridas agudas. Especificamente para perdas cutâneas agudas em mão e dedos não foi encontrado registro do uso desses extratos.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo é verificar o processo de cicatrização por segunda intenção em lesões traumáticas agudas de pele em mão e dedos em grupo utilizando extrato de calêndula e grupo controle, documentando a evolução do processo cicatricial por planimetria com fotos digitais e analisando sua eficácia, notadamente por meio da velocidade de cicatrização da lesão.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar o tempo de cicatrização nas lesões de mão e dedos nos dois grupos;
- ✓ Comparar a contração da lesão durante o processo de cicatrização entre os grupos.

2.2 OBJETIVO EXPLORATÓRIO

- ✓ Investigar fatores preditores de parâmetros clínicos dos sujeitos da pesquisa que notadamente influenciam no processo cicatricial de feridas, como presença de diabetes e uso diário de tabaco.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 TRAUMAS NA MÃO

Clark et al¹ publicaram estudo prospectivo com 1.074 traumas em mão atendidos no departamento de emergência de forma consecutiva em período de oito semanas, contabilizando 1 a cada 5 atendimentos por acidente. A maioria dos pacientes era homem com idade entre 12 e 29 anos, apresentando ferimentos em partes moles de mão. Dessas lesões, 26% ocorreram no local de trabalho desses indivíduos. Os autores apontam a importância do atendimento adequado a essas lesões em mãos e recomendam melhorias nos padrões de segurança no trabalho manual.

Sorock et al,² em revisão narrativa que considerou informações listadas no Sistema Nacional de Vigilância Eletrônica de Lesões (NEISS-USA), estabeleceram que lesões agudas na mão (ferimentos, lacerações, esmagamentos) atingiram 30% de 3,3 milhões de trabalhadores feridos, ou seja, 990 mil trabalhadores no período de um ano. Ainda referiram que ferimentos e lacerações, especificamente em dedos, são a terceira causa em perda de dias no trabalho remunerado nos EUA (após lombalgia e distensões musculares em membros inferiores). Estudando sete ambientes de trabalhadores de máquinas manuais apontaram 4 a 11 traumas nas mãos a cada 100 trabalhadores por ano. Outros dados relevantes foram, homens apresentaram taxas mais altas de lesões graves nas mãos do que mulheres e 24 anos foi a idade de trabalhadores que apresentou maior risco para lesão em mãos. Recomendaram estudo e compreensão especialmente da etiologia dessas lesões que apresentam alta frequência entre os trabalhadores e resultam em significativo tempo perdido no trabalho remunerado.

Dias e Garcia-Elias,⁸ em artigo que explorou e discutiu os custos do tratamento de ferimentos nas mãos em várias partes do mundo, citaram que um quinto (1/5) de todas as emergências que se apresentam em departamentos de emergência de hospitais referem-se a

lesões que acometem as mãos. Os custos diretos do tratamento dessas lesões dependem de magnitude do trauma, método de tratamento escolhido, complicações e especialmente da forma como é executado o primeiro atendimento desses traumas. Ressaltaram que nesse primeiro momento, a cirurgia da mão realizada por especialista que indica adequadamente os procedimentos necessários e os realiza com prudência e rigor técnico resultará em diminuição de despesas para o serviço de saúde além de beneficiar o paciente em menor número de complicações e resultado funcional desejado. Boas decisões tomadas precocemente e executadas com competência são as mais econômicas para o sistema de saúde.

Davas Aksan et al³ levantaram o total de 8.946 lesões envolvendo 8.817 pacientes em estudo retrospectivo que avaliou a epidemiologia das lesões traumáticas em mãos. Idade mais jovem e falta de experiência foram apontadas como fatores de risco importantes na ocorrência dessas lesões. A maioria foi ferimentos em mãos, ocorridos no trabalho com máquinas manuais (70,5% dos casos) em indivíduos masculinos com menos de 35 anos de idade. Os autores enfatizam a importância de campanhas informativas e uso de equipamentos de proteção individual para a prevenção de acidentes entre os trabalhadores.

Ootes et al,⁵ em estudo epidemiológico descritivo transversal, considerando o banco de dados do NEISS com amostra representativa dos departamentos de emergência apontaram a chance de 1 em 88 de um indivíduo residente nos EUA se apresentar no setor de emergência com lesão no membro superior dentro de um determinado ano. Observaram ainda que a maioria das lesões ocorreram em dedos da mão (38,4%) por traumas no domicílio (45,4%). Considerando lesões em membro superior, a laceração em dedos foi o diagnóstico mais comum nos departamentos de emergência (77,5%, ou seja, 221,1 casos por 100.000 pessoas nos EUA).

Jong et al,⁴ em estudo epidemiológico de coorte retrospectiva de base populacional para incidência de lesões tendinosas em mão e punho afirmaram que os traumas penetrantes nas mãos são as lesões mais comuns. Representam aproximadamente 10% de todos os atendimentos emergenciais e até 20% de todas as lesões submetidas a cirurgias. Lesões em partes moles da mão predominam as estatísticas de visitas aos setores de emergência e são responsáveis por até 82% dos traumas avaliados em mãos.

Shi et al,⁷ em revisão sistemática, evidenciaram fatores prognósticos que interferem no retorno ao trabalho após lesões traumáticas na mão e referiram que 28% das lesões em mãos são relacionadas ao trabalho remunerado. Encontraram evidências consistentes de que gravidade da lesão e baixa renda estão associados a tempo mais prolongado para retorno ao trabalho, enquanto outros fatores como idade, gênero e nível educacional demonstraram nenhum ou efeitos variáveis em estudos. Referiram a importância de atendimento especializado e reabilitação adequada diante de lesões em mãos que ocorrem no trabalho, especialmente as mais graves e complexas.

Biswas et al⁹ forneceram abordagem algorítmica baseada na localização da perda cutânea em mão e dedos conduzir potenciais fontes de cobertura cutânea, com uso de retalhos de pele locais e a distância. Enfatizaram que defeitos cutâneos pequenos e médios sem exposição de estruturas profundas, têm a cicatrização por segunda intenção como alternativa de bons resultados, enquanto lesões maiores ou com estruturas profundas expostas tendem a se beneficiar com cobertura de retalho ou aplicação de modelos de regeneração dérmica.

Kakar¹⁰ enfatizou que a cicatrização por segunda intenção é técnica simples, efetiva, aplicável a qualquer idade e com baixo custo. É mais bem indicada para perdas cutâneas em mãos e dedos em que não haja exposição de tecidos profundos como osso, nervo, vaso e tendão. Citou que perdas cutâneas de aproximadamente 1,5 cm tendem a epitelizar

aproximadamente em três a quatro semanas. Durante esse período, que pode chegar a um ou dois meses, é indicada troca frequente de curativos. Referiu que, especialmente para perdas cutâneas da polpa digital a técnica de cicatrização por segunda intenção proporciona resultados excelentes com retorno completo da sensibilidade tátil e discriminação entre dois pontos.

Ribak et al,⁶ em estudo clínico prospectivo avaliaram os dados de 613 pacientes atendidos por traumas em mão. A maioria foi composta por homens (67,9%) com idade média de 31 anos. Citaram que 66,6% das lesões ocorreram devido a acidente doméstico, 12,8% envolveram acidentes de trânsito e 20,6% foram ocupacionais. Considerando os traumas ocupacionais, a lesão mais prevalente acometeu os dedos da mão (54,2%).

3.2 CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO

3.2.1 Processo Cicatricial

Winter,²⁶ em estudo experimental com feridas provocadas no dorso de porcos, ressaltou que nas primeiras 24 horas após perdas superficiais na pele iniciará migração de fibroblastos vindos de folículos pilosos e bordas da ferida. Levantou o conceito do benefício em se manter úmido o leito da perda cutânea. Se a ferida for mantida úmida a epiderme migrará livremente no exsudato seroso, os leucócitos sairão com o exsudato diminuindo possibilidade de infecção e a superfície da ferida/perda cutânea se torna a nova epiderme. Crostas ressecadas que podem se formar no leito da ferida retardam a epitelização. Em seu experimento, Winter²⁶ concluiu que perdas cutâneas mantidas úmidas cicatrizam duas vezes mais rápido do que as mantidas secas, expostas ao ar. Considerando todo o processo de cicatrização até a regeneração completa, ressaltou que manter a ferida úmida vai além da fase de epitelização.

Singer e Clark,²⁷ em revisão narrativa a respeito de cicatrização em feridas cutâneas, estabeleceram que métodos conservadores e consagrados de tratamento são bem-sucedidos na maioria de pacientes com perdas cutâneas e devem ser tentados inicialmente a outros mais elaborados. Esses métodos incluem, curativos padrão, limitação da pressão no local da ferida, desbridamentos de tecidos inviáveis com restauração da perfusão tecidual adequada e controle de eventuais alterações clínicas subjacentes nos pacientes, como hiperglicemia e desnutrição. Citaram as fases de cicatrização das feridas por segunda intenção (inflamação, epitelização e remodelação) e listaram mediadores, células sanguíneas, matriz extracelular, células parenquimatosas, citocinas e fatores de crescimento envolvidos no processo de cicatrização da ferida, adjetivando-o de dinâmico e interativo. Os autores referiram substitutivos de pele, por exemplo, culturas de células epidérmicas autólogas, alogênicas, colágeno bovino, pele alogênica criopreservada, entre outros, como exemplos de métodos mais elaborados de tratamento e indicados para coberturas de pele em queimaduras extensas e em situações de perdas graves, como na epidermólise bolhosa distrófica. Expuseram a experiência desanimadora com uso de fatores de crescimento e outros mediadores para acelerar a cicatrização de feridas em estudos clínicos. Para o sucesso do uso desses fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas, seriam necessárias intervenções precisas em intervalos cronometrados durante o processo de cicatrização, considerando que o reparo de feridas é resultado de conjunto de interações complexas em tempos específicos. Resumimos do texto dos autores os principais eventos, que explicam mais detalhadamente os processos cicatriciais. Inicialmente, sobre inflamação, granulação e angiogênese. A perda tecidual ocasiona ruptura de vasos sanguíneos com extravasamento de constituintes do sangue formando o coágulo que restabelece a hemostasia e fornece matriz extracelular para migração celular. As plaquetas facilitam a formação desse tampão hemostático e secretam vários mediadores, como o fator de crescimento derivado de

plaquetas, que atraem e ativam macrófagos e fibroblastos. Os macrófagos se ligam a proteínas específicas da matriz extracelular por meio de seus receptores de integrinas, estimulando a fagocitose de microrganismos e fragmentos da matriz extracelular. A adesão à matriz extracelular induz monócitos e macrófagos a expressarem fatores de crescimento (citocinas, fatores de necrose tumoral, derivados de plaquetas quimioatraentes e mitógenos para fibroblastos) que iniciam e propagam a formação de novos tecidos, e, exercem papel central na transição entre inflamação e reparo tecidual. Neutrófilos também são recrutados e infiltrados na área da perda cutânea para limpar o local de partículas estranhas e bactérias e, então são extrudados com a escara ou fagocitados por macrófagos. Da mesma maneira, monócitos se infiltram na ferida atraídos por fragmentos de proteína da matriz extracelular e se tornam macrófagos ativados. Então, fatores de crescimento como o derivado de plaquetas e o endotelial vascular iniciam a formação do tecido de granulação. Esse novo estroma, começa a invadir o espaço da ferida aproximadamente quatro dias após a perda tecidual. Numerosos capilares novos conferem sua aparência granular. Macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos se movem para o espaço da ferida ao mesmo tempo, estimulando fibroplasia e a angiogênese. Os fibroblastos são responsáveis pela síntese, deposição e remodelação da matriz extracelular necessária para suportar o crescimento interno e a migração celular. Fatores de crescimento, especialmente fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento transformador, juntos com a matriz extracelular estimulam os fibroblastos do tecido ao redor da perda cutânea a proliferar, expressar receptores de integrina e migrar para o espaço da ferida. Ao mesmo tempo, vasos sanguíneos transportam oxigênio e nutrientes necessários para sustentar o metabolismo celular. Angiogênese é um processo complexo que depende da matriz extracelular no leito da ferida, de migração e estimulação mitogênica das células endoteliais. Células epidérmicas ativadas na ferida secretam grande quantidade de fatores de crescimento de células endoteliais

vasculares. fundamentais para a angiogênese durante a formação do tecido de granulação entre 4 e 7 dias após a lesão epidérmica. Uma vez preenchida a perda cutânea com o novo tecido de granulação, a angiogênese cessa e muitos dos novos vasos sanguíneos se desintegram como resultado da apoptose. A epitelização é o evento seguinte. Horas após a lesão, as células epidérmicas dos apêndices da pele, como os folículos pilosos, removem rapidamente o sangue coagulado e o estroma danificado do espaço criado pela perda cutânea. Ao mesmo tempo, as células sofrem alteração fenotípica acentuada que inclui retração dos tonofilamentos intracelulares, dissolução da maioria das interações entre as células e formação de filamentos de actina citoplasmáticos periféricos, que permitem o movimento celular. A movimentação lateral das células epidérmicas é possibilitada pela dissolução das ligações entre a epiderme e a membrana basal. Isso permite expressão de receptores nas células epidérmicas que ocasiona interação entre colágeno tipo I na margem da ferida e fibrina do coágulo no espaço da ferida. Na perda cutânea vai ocorrendo separação entre escara desidratada e tecido viável. A degradação de matriz extracelular é necessária para a migração de células epidérmicas, que expressam colagenase (matriz metaloproteinase) e plasminogênio (ativador de plasmina) e, facilitam a degradação de matriz extracelular e transformação de colágeno. Poucos dias após a perda cutânea, as células epidérmicas na margem da ferida começam a estimular a migração ativa e proliferação de novas células. Nesse momento fatores de crescimento (fator de crescimento epidérmico, transformador e de queratinócitos) e seus receptores estimulam o processo. Então, a epitelização acontece como o fechamento de um zíper. As proteínas da membrana basal surgem em sequência ordenada da margem da ferida para dentro e as células epidérmicas voltam ao fenótipo normal, fixando-se firmemente na membrana basal restabelecida e na derme subjacente. Na sequência do processo cicatricial haverá contração da ferida e reorganização da matriz extracelular. Na segunda semana do processo de cura da ferida, os fibroblastos assumem um

fenótipo de miofibroblastos, correspondendo ao início da compactação do tecido conjuntivo e contração da ferida. A contração depende do estímulo de fatores de crescimento, receptores de integrina e feixes de colágeno secretados por macrófagos, células epidérmicas, células endoteliais e fibroblastos. A reparação de feridas é composta por fases dependentes de estímulo e inibição das metaloproteinases. Nas primeiras três semanas o colágeno se acumula rapidamente e ocorre contração da ferida em cerca de 20%. Depois disso, a contração é lenta e gradual refletindo também, em remodelação mais lenta do colágeno, porém, com formação de mais feixes de colágeno e maior número de interligações cruzadas. Apesar desse processo intenso e preciso, as cicatrizes atingem apenas 70% do tensionamento da pele normal.²⁷

Rice²⁸ referendou que todas as feridas cicatrizam por contração resultante da conversão de fibroblastos em miofibroblastos, e, cicatrizes inconvenientes são resultantes de contração inadequada. A epitelização ocorrerá se na fase inicial da cicatrização os efeitos acumulados de trauma e enzimas bacterianas, não excederem a capacidade das células disponíveis se dividirem e se moverem pela superfície do leito da ferida. Enfatizou que a ingestão adequada de vitaminas e minerais pelo indivíduo é imprescindível para produzir taxa de cura mais célere e tecido cicatricial apropriado. No processo de cicatrização das perdas cutâneas, Rice²⁸ descreveu as fases de inflamação, com duração entre zero e 3 dias, proliferativa, entre 3 e 25 dias, de remodelação epitelial, entre 15 dias e um ano. Reforçou que o tecido necrótico no leito da ferida durante o processo de cicatrização torna-se um fator inibidor da epitelização. Enzimas liberadas de leucócitos e células danificadas tendem a remover esse tecido desvitalizado e formar exsudato fibrinoso, secretado por fibroblastos e rico em colágeno (denominada crosta úmida, tecido macio branco-amarelado). Desde que mantida umidade na perda cutânea, esse exsudato fornece estrutura para novos vasos sanguíneos e estabelecimento do tecido de granulação. No entanto, se as condições forem de

ressecamento haverá tendência a formação de tecido duro, coriáceo e descamativo (crosta seca). Rice²⁸ destacou que, a progressão considerada saudável e efetiva do processo de cicatrização por segunda intenção resulta em tecido de granulação saudável, vermelho, carnudo, de aparência firme e granular. Esse novo tecido necessita interface úmida sem excesso de umidade para continuar crescendo e preenchendo o espaço da ferida. Na sequência amadurecerá o tecido epitelial, inicialmente nas bordas da ferida, distinguível por sua cor rosa perolada, tecido opaco fosco e pegajoso ao toque. O autor também referiu, o conceito de cronicidade de uma ferida. Quando não há redução de 40 por cento ou mais da área da ferida em seis semanas. Isso aponta para a presença de fatores adversos que afetam a continuidade do processo de cicatrização. Rice²⁸ citou ainda a diversidade de produtos para o cuidado de feridas crônicas existentes no mercado, sendo difícil a padronização do mais apropriado. Entre esses, produtos de proteção das feridas, hidratação, retenção de umidade, gerenciamento de exsudato e desbridamento. Referiu, filmes e espumas de poliuretano, hidrocoloides, hidrogéis, alginatos de cálcio, géis de hidropolímero e hidrofibras.

Jones²⁹ revisitou o conceito de George Winter sobre a importância de manter certa umidade na perda cutânea para proteger a derme e permitir a formação da nova epiderme. Feridas deixadas ao ar tendem a formar crostas secas que desidratam a camada basal da derme, acumulam leucócitos polimorfonucleares e inibem a benéfica migração celular através do exsudato fibroso formado. Diante do ressecamento, as células epidérmicas são forçadas a migrar dos folículos pilosos e das bordas da ferida em construção desalinhada que leva a morte da camada basal da derme e maior incidência de escaras indesejáveis.

Winter³⁰ ressaltou três fatores que afetam drasticamente o padrão, velocidade e qualidade de cicatrização em perdas cutâneas. Foram apontados pelo autor, desidratação e exposição da derme, suprimento vascular e oxigenação deficiente e infecção local. O autor também enfatizou a importância de manter umidade local e troca frequente de curativos.

Ehrlich e Hunt³¹ estudaram o processo progressivo e benigno de contração das perdas cutâneas que ocorre das bordas para o centro. Cicatrização por segunda intenção desde que em perdas de pele que não exponham tecidos profundos (como vasos, nervos, tendões, ossos e articulações), tendem a progredir de forma benéfica com resultado estético e funcional superior a enxertia de pele. Citaram que o enxerto é procedimento cirúrgico que provoca nova ferida e determina desconforto e alteração estética ao paciente. Terapêuticas que acelerem o processo de cicatrização por segunda intenção reduzirão a necessidade de enxerto. Os autores postularam que a contração da ferida depende de forças celulares que organizam o colágeno no tecido de granulação encurtando-o progressivamente e fechando a ferida de fora para dentro. Enfatizaram que o centro do processo desse fechamento tecidual baseia-se na organização do colágeno, realizada por fibroblastos e forças de tração celular, e não, por compactação do tecido conjuntivo devido a contração dos miofibroblastos. Ressaltaram, ainda, que a contração da perda cutânea não deve ser confundida com retração da cicatriz, essa sim, indesejada estética e funcionalmente.

Singh et al³² descreveram detalhadamente as células responsáveis pelo processo de cicatrização; ação, forma e tempo para seu recrutamento, incluindo a sinalização extracelular que as controla. Destacaram a função de plaquetas, neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. Listaram fatores que interferem marcadamente no processo, como deficiência nutricional, infecção, uso de tabaco e diabete. Recomendaram aos cirurgiões afeitos ao tratamento de feridas que compreendam os principais processos fisiológicos envolvidos na cicatrização das feridas para minimizar a morbidade nos pacientes.

Volksdorf et al¹³ estudaram a importância das proteínas de junção rígida (TJs: *tight junction proteins*) no processo de cicatrização de feridas cutâneas. Proteínas de junção rígida são moléculas situadas nas junções rígidas de células epiteliais, endoteliais e mielinizadas. Este complexo juncional multiproteico tem função reguladora da via paracelular na

passagem de íons, água e solutos e pode coordenar o movimento de lipídios e proteínas entre as superfícies apical e basolateral da membrana plasmática. Desse modo, a junção rígida entre as células, conduz moléculas de sinalização que influenciam a diferenciação, proliferação e polaridade intercelular e, desempenha papel fundamental na manutenção de equilíbrio osmótico e transporte transcelular. Devido ao seu envolvimento na proliferação e diferenciação celular, as proteínas da junção rígida (TJs) são essenciais para a cicatrização normal de feridas na pele. Os autores investigaram especificamente, claudina-1 e ocludina em modelos *ex vivo* de cicatrização de feridas cutâneas humanas agudas e crônicas. Observaram grande diferença na localização e expressão dessas proteínas em feridas agudas e crônicas. Frequentemente apresentando uma diminuição de proteínas nas margens das feridas crônicas e na epiderme em regeneração. Experimentos em queratinócitos humanos mostraram que a expressão diminuída de claudina-1 prejudicou a cicatrização de feridas, com retardo na migração celular e diminuição da proliferação. A diminuição da expressão da claudina 1 atenuou significativamente a sinalização da via *AKT* (conjunto de proteínas quinase específicas que desempenha papel importante em vários processos celulares, como metabolismo de glicose, apoptose, proliferação celular, transcrição e migração celular). A regulação negativa de ocludina somente prejudicou a cicatrização após submissão das células do experimento a estresse mecânico, normalmente presente em feridas durante o processo de cura. Porém, as funções dessas proteínas não foram completamente esclarecidas e parecem ser independentes da formação da estrutura de junção rígida intercelular. Os autores concluíram que as alterações observadas na localização e expressão da claudina-1 e da ocludina em feridas humanas crônicas em comparação com feridas agudas que cicatrizam normalmente, pode explicar a patogênese de feridas que tendem a cronicidade e não evoluem para cura.

Shi et al³³ reafirmaram que as junções rígidas bicelulares (TJs) são compostas por miríade de proteínas transmembrana, incluindo occludinas, claudinas, moléculas de adesão juncional (JAMs) e proteínas estruturantes do esqueleto intracelulares, como a zona ocludente (ZOs). São elementos funcionais que formam uma barreira de controle na passagem paracelular de moléculas. Essas proteínas estão presentes principalmente nas células epiteliais e endoteliais de todos os tecidos e órgãos e, afora funções de barreira e manutenção da polaridade celular são reguladores importantes da transdução de sinal. Ou seja, modulam proliferação, migração e diferenciação celular e, alguns componentes de resposta imune e homeostase. Os autores referiram que apesar da vasta quantidade de pesquisas disponível sobre as proteínas de junção rígida (TJs: *tight junction proteins*) pouco é conhecido sobre seu papel específico na cicatrização de feridas. Lançaram alguns questionamentos apontando lacunas no conhecimento atual sobre a função de barreira e interações intercelulares epiteliais, endoteliais e imunológicas dessas proteínas em cada parte do processo de cicatrização, até a remodelação de lesões cutâneas, tanto em feridas que cicatrizam como nas que se tornam crônicas. Afirmaram que essa compreensão poderá iluminar novas pesquisas de estratégias para regeneração de tecidos e cura de feridas.

Rousselle et al¹² descreveram o processo de formação do novo epitélio após perda cutânea. Referiram que há migração das bordas da ferida para o centro, progredindo sequencialmente no processo de regeneração da epiderme diferenciada sobre a junção dermo-epidérmica em reorganização. Os múltiplos processos celulares e moleculares envolvidos em toda fase de epitelização são essenciais para o fechamento exitoso da ferida. A epitelização depende basicamente da reconstituição da junção dermo-epidérmica, que ancora a epiderme à derme. Ela inicia, aproximadamente, 16 a 24h após a perda cutânea, durante a fase de proliferação e, continua durante a segunda e terceira fase do processo de cicatrização da ferida. Há formação de matriz provisória no leito da ferida formada por

exsudato de proteína, migração de queratinócitos epidérmicos das bordas da lesão formando uma língua epitelial com a proliferação de queratinócitos que migram progressivamente até a estratificação e diferenciação do neopitélio, reestruturação da membrana basal e reaparecimento de células especializadas que direcionam as funções cutâneas como as sensoriais e de pigmentação. Vários moduladores estão envolvidos nesse processo de fechamento epidérmico. Após lesão cutânea aguda, neutrófilos, monócitos e macrófagos são recrutados para o local da lesão. Então, os queratinócitos mudam seu fenótipo ativados por fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas e, sofrem alterações do citoesqueleto e de receptores da superfície celular. Os queratinócitos movem-se para a ferida em cicatrização polimerizando fibras de actina do citoesqueleto e formando novos complexos de adesão. Isso permite que a expressão de integrinas, plasminogênio, metaloproteinases, receptores de fator de crescimento, proteoglicanos da superfície celular e componentes de ECM, transmitam sinais intracelulares e ativem fatores de transcrição que regulam a expressão dos genes da queratina. Alertaram que a falha no desenvolvimento ordenado desse processo de formação do novo epitélio resulta em feridas crônicas que não cicatrizam. O artigo expõe modelos de epitelização que exemplificam a migração de queratinócitos. Ressalta-se o mecanismo de rolamento das células suprabasais que migram sobre as células basais principais e se desdiferenciam para formar células líderes na língua epidérmica que migram juntas e avançam como um grupo coeso. As células superficiais que estão acima são passivamente arrastadas e vão preenchendo o espaço e auxiliando na reconstituição do novo epitélio da ferida. Os autores também abordaram várias estratégias disponíveis atualmente para o tratamento de lesões de pele, especialmente as crônicas. Citaram, a relevância da engenharia de tecidos, armações de tecidos sintéticos (*scaffolds*) carregados com estimulantes da epitelização, estratégias direcionadas as proteínas da matriz extracelular, colágenos, glicosaminoglicanos e polissacarídeos, importantes ao reparo de feridas, e ainda, substitutos

epidérmicos e células-tronco. Alertaram que, embora esses tratamentos tenham comprovações até mesmo clínicas, apresentam limitações importantes, como, morbidade do paciente, dificuldade na aderência do modelo ao leito da ferida, resultados baseados em estudos com incapacidade de reproduzir apêndices da pele e alto custo na fabricação. Porém, recomendaram a continuidade de pesquisas a atrativa combinação de biomateriais, células, fatores de crescimento e técnicas avançadas de biofabricação.

Cañedo-Dorantes e Cañedo-Ayala³⁴ ressaltaram a importância da compreensão aprofundada do processo de cicatrização de feridas. Todas as células, tecidos, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento da pele que participam desse processo revelam interações e funções pleiotrópicas entre muitos dos participantes celulares e extracelulares durante o reparo das feridas. Citaram também que quando as células são saudáveis e as fase orquestradas adequadamente haverá formação normal do novo epitélio. Porém se houver disfunção, como no diabetes, o processo inflamatório tenderá a ser prolongado dificultando a regeneração da pele com formação de úlcera ou fibrose patológica. Os autores enfatizaram também, que os macrófagos são as células dominantes e presentes em todas as fases do reparo tecidual. Têm papel regulador essencial e devem ser considerados em futuros estudos, como alvos terapêuticos importantes no controle do processo de cicatrização de feridas.

3.2.2 Segunda intenção em procedimentos de pele

Zitelli³⁵ revisou as vantagens de utilizar cicatrização por segunda intenção e forneceu diretrizes que preveem os resultados desse método. Reforçou que o tratamento da ferida com perda cutânea deve iniciar com métodos simples, recomendando curativo comum diário, que pode ser trocado em casa pelo próprio paciente ou familiar. Também foram apontadas como vantagens, prescindir de hospitalização (necessária em procedimentos reconstrutivos como enxertia de pele) e diminuição dos custos de tratamento. Referiu que feridas mantidas úmidas

com curativo oclusivo ou semioclusivo são surpreendentemente indolores, não sangram e raramente resultam em infecção. Mesmo feridas maiores e mais profundas podem ser tratadas adequadamente com cicatrização por segunda intenção. Sendo a velocidade de cicatrização uma função logarítmica, a diferença grande na área inicial entre duas feridas resultará em menor diferença no tempo de epitelização entre elas. O autor exemplificou, ferida de 1 cm poderá levar três semanas para epitelizar enquanto, uma de 4 cm tende a curar em apenas quatro semanas. Na indicação da cicatrização por segunda intenção, complicações como hematoma, seroma, reações de sutura, necrose de retalho de pele e perda de enxerto são evitadas, assim como desconforto e cicatrizes em áreas doadoras. O autor mostrou resultados com uso de cicatrização por segunda intenção especialmente útil no tratamento de perdas causadas por ablação de carcinomas cutâneos com alto risco de recorrência. Citou que perdas de pele em membros tem tendência a cicatrizar um pouco mais lentamente do que perdas cutâneas em face. Em geral, feridas em superfícies côncavas da face tendem a cicatrizar com melhor estética do que feridas em superfícies convexas. Referiu ainda, a importância de considerar a cor da pele do paciente especialmente no tratamento de feridas maiores que 1 cm. Pele mais clara tende a cicatrizar de forma menos perceptível do que pele com pigmentação escura ou telangiectásica.

Cordoro e Russell³⁶ avaliando opções para defeitos cutâneos em face e pescoço ocasionados por trauma ou ressecção tumoral, enfatizaram a importância de restaurar função e estética. Apontaram que feridas de espessura total se contraem em até 40 por cento a mais do que feridas de espessura parcial ou superficiais. Também referiram, que cicatrização por segunda intenção oferece resultados funcionais e cosméticos iguais ou superiores aos alcançados por enxertos e alguns retalhos, respeitando escolha do paciente e preferência do cirurgião.

Vermeulen et al,³⁷ revisaram de forma sistemática, estudos clínicos randomizados sobre o tratamento com cicatrização por segunda intenção de feridas pós cirúrgicas complicadas. Incluíram 13 estudos com uso de curativo simples com gaze, espuma (*foam*), alginato de cálcio (forma de fibras com ou sem outros elementos como sódio e zinco) e hidrocoloide (forma de pasta de polissacarídeos e outros polímeros). Compararam principalmente os resultados quanto a simplicidade do uso, custo e dor do paciente na troca de curativos. Entre os curativos estudados, não encontraram evidência de superioridade quanto a cicatrização por segunda intenção. Alguma evidência da superioridade da espuma sobre a gaze simples com respeito a dor do paciente na troca do curativo.

Christenson et al³⁸ concluíram não haver diferença entre cicatrização por segunda intenção e fechamento primário quanto a satisfação estética de pacientes submetidos a punção biópsias de pele. Os autores estudaram de forma randomizada grupos de pacientes com indicação para punção biópsia com extrator de 4mm ou de 8mm. Nos dois grupos, randomizaram o tratamento usando cicatrização por segunda intenção e fechamento primário. Alguns pacientes do grupo de punção com extrator de 8mm preferiram o fechamento primário. No entanto, os autores ressaltaram custo-benefício e praticidade no uso da cicatrização por segunda intenção nos casos estudados.

Bosley et al³⁹ avaliaram a eficácia da cicatrização por segunda intenção em 49 pacientes submetidos a ressecção de tumores de pele no dorso de mão e dedos. Os defeitos cutâneos variaram entre 0,8 e 6 cm de diâmetro. Após o procedimento foi realizado curativo compressivo com gaze seca, mantido nas primeiras 48 horas. Nos dias seguintes os pacientes foram orientados a lavar a ferida uma a duas vezes ao dia com sabão neutro e água. Após secagem da pele orientou-se a aplicação de antibiótico ou pomada de vaselina. A avaliação foi realizada aos 10 meses após o tratamento cirúrgico. Função global da mão, habilidade para fazer preensão e extensão completa dos dedos, manutenção das propriedades de

distensibilidade, proteção e sensibilidade da nova epiderme formada, e, aspecto estético foram os critérios analisados pelos autores. Concluíram que a cicatrização das perdas cutâneas com segunda intenção é opção efetiva para os casos estudados com preservação da função e estética, sem complicações ou necessidade do uso de enxertia de pele.

Yang et al⁴⁰ usaram o método de correção de cor para calcular automaticamente os tamanhos de defeitos cutâneos ocasionados por cirurgias dermatológicas em 30 pacientes submetidos a cicatrização por segunda intenção. Dividiram as lesões em face (11 pacientes) e fora da face (19 pacientes: área antecubital, couro cabeludo e membro inferior). Apesar dos grupos estudados não serem homogêneos, observaram que o tempo em dias das lesões fora da face foi maior ($14,33 \pm 9,78$ dias) do que nas feridas na face ($8,45 \pm 3,91$ dias). Os autores recomendam a cicatrização por segunda intenção como bom método de tratamento para restauração de defeitos cutâneos.

3.2.3 Uso de curativos e cicatrizantes durante segunda intenção

Lewis et al¹⁴ reportaram os resultados do tratamento com cicatrização por segunda intenção em revisão sistemática que incluiu 17 estudos envolvendo curativos desbridantes usados especialmente em feridas crônicas, complicadas e cavitárias. Citaram resultados promissores com espuma de poliuretano e elastômero de silicone, alginato, hidrocolóide e polissacarídeo de dextranômero. Concluíram alguma evidência que sugere efeito benéfico desses curativos para feridas cirúrgicas cavitárias em desfechos como dor e desempenho do curativo, embora, não haja indício favorável quanto a eficácia clínica e análise custo-efetividade.

Chaby et al,⁴¹ em linha com Vermeulen et al, citados anteriormente, também encontraram fraca evidência de superioridade depara os curativos modernos comparados a gaze úmida ou parafinada usados durante o tratamento com segunda intenção em perdas

cutâneas agudas e crônicas. Analisaram critérios de performance geral, como facilidade e dor na troca de curativo, e, absorção de exsudatos. Nesta revisão sistemática os autores encontraram alguma vantagem com o uso de hidrocoloides considerando os critérios estudados.

Ibrahim et al¹⁵ revisando os mecanismos envolvidos na cicatrização de feridas por produtos naturais reafirmaram as propriedades medicinais dos constituintes fitoquímicos bioativos, como flavonóides, alcalóides, óleos essenciais, taninos, saponinas e compostos fenólicos. Os autores abordaram a regulação do processo complexo de regeneração tecidual por múltiplos fatores de crescimento e citocinas liberadas no sítio das feridas cutâneas.

3.2.4 Mensuração de feridas

Flanagan⁴² demonstrou a importância da mensuração de feridas em revisão narrativa e listou métodos para checagem da área de feridas, especialmente crônicas, durante a progressão da cicatrização por segunda intenção. Entre os métodos apresentados em artigos revisados citou a planigrafia digital e referiu alto grau de concordância para qualquer dos métodos utilizados (planimetria mecânica, planimetria digital, contagem aproximada de quadrados, medição de diâmetro), desde que a área da perda cutânea não ultrapassasse 10 cm². Áreas maiores tendem a ter sua imagem distorcida seja qual método de mensuração for escolhido. Ressaltou que a padronização na tomada da fotografia diminui erros na mensuração, recomendando atenção para modificação do ângulo da tomada, qualidade da câmera digital e curvatura do segmento onde está localizada a ferida. Ainda, que programas computadorizados para determinação de área das feridas são fáceis de usar e demonstram alta precisão clínica. Ressaltou a importância do cálculo da circunferência da ferida, pois a redução da área não ocorre de forma linear. Há constante mudança no formato da ferida durante o processo de cicatrização. O cálculo simples de comprimento multiplicado por

largura de uma lesão foi apontado pelo autor como impreciso, ressaltando a importância de mensuração da circunferência da ferida. A área absoluta da perda cutânea, que inclui o volume, também é inexata, pois diminui rapidamente conforme o crescimento do tecido de granulação e não demonstra o fechamento centrípeto progressivo da ferida. O autor afirmou que a redução percentual da área é parâmetro valioso para prever taxas de cura das feridas e indicador importante para diferenciar feridas que cicatrizam das que não cicatrizam nas primeiras semanas de tratamento. A redução percentual da área entre 20 e 40% dentro das primeiras semanas foi sinalizada como preditora de cura das feridas. A medição da circunferência da área da perda cutânea demonstra crescimento do tecido epitelial e contribui na tomada de decisão clínica durante o processo de cicatrização por segunda intenção de feridas, especialmente de crônicas.

Khoo e Jansen⁴³ afirmaram que a medição precisa do tamanho da ferida ao longo do tratamento de perdas cutâneas avalia taxas de cura e respostas ao tratamento, permitindo intervenções personalizadas, especialmente em feridas crônicas. Confirmaram que a redução da área entre 20 e 40% nas primeiras semanas é preditor preciso de cura da lesão. As autoras apontaram que lesões acima de 10 cm de diâmetro tem maior potencial para distorções e erros na medição. E, concluíram que a planimetria digital é precisa, confiável e superior a métodos convencionais como medição com régua e com tracejado da lesão em papel acetato.

Aragón-Sánchez et al⁴⁴ estudaram a confiabilidade intra e interexaminador, usando o coeficiente de correlação interclasse (ICC), na medição da área de úlceras venosas em fotografias digitais aleatórias. A planimetria foi realizada no programa ImageJ e comparou a medição feita por profissionais treinados com a técnica há mais de oito anos e outros, em treinamento. No trabalho os autores detalham a maneira ideal para captação das fotografias digitais e o passo a passo do treinamento específico necessário para medição das feridas no programa ImageJ. Concluíram que mediante treinamento prévio, o método de medição no

ImajeJ apresenta excelente confiabilidade, é simples e facilmente reproduzível para medição da área de feridas em cicatrização.

3.2.5 Fatores que interferem na cura de perdas cutâneas

Knox et al⁴⁵ em revisão narrativa afirmaram que feridas crônicas são advindas de ruptura do processo normal de cicatrização. Fatores locais (infecção, hipoxia e necrose tecidual, trauma repetido local, história de irradiação) e sistêmicos (diabete, mal nutrição, imunodeficiência) interferem na sequência previsível e sincrônica da cura de perdas cutâneas agudas. Etapas que envolvem coagulação, inflamação, angiogênese, fibroplasia, epitelização, contração da ferida e remodelação são alteradas em seu curso especialmente por infecção local. Os autores advogam o desbridamento cirúrgico de feridas crônicas e complicadas seguindo o conceito de preparação do leito da lesão para permitir a cicatrização sequencial da ferida por segunda intenção ou uso de enxertia de pele local.

Rivera e Spencer⁴⁶ afirmaram que na ausência de doença subjacente, perdas cutâneas que não expõe a derme cicatrizarão com intervenção mínima. A conduta diante dessas lesões requer conhecimento aprofundado de princípios e práticas do processo cicatricial de feridas. A decisão do profissional entre primeira e segunda intenção é guiada por fatores objetivos e subjetivos. Retalhos locais de pele e enxertos são citados como opções para reconstrução de feridas maiores e mais profundas. Lembram que a opção por segunda intenção deve ser associada a curativos oclusivos e adjuvantes. Alertam que substâncias antissépticas como povidine, iodine, peróxido de hidrogênio e prata usados diretamente em perdas cutâneas inibem atividade dos fibroblastos e comprometem a epitelização.

Guo e Dipietro⁴⁷ ressaltaram a importância do estudo do processo de cicatrização em perdas cutâneas e a interferência de vários fatores locais e sistêmicos. Esse processo biológico complexo compreende fases definidas nas quais estão envolvidos vários tipos de

células, como neutrófilos, macrófagos, linfócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais. Apontaram que os seguintes fatores isolados ou em conjunto podem interferir em qualquer das fases do processo tornando deficiente e alterando a cicatrização das feridas. Discutiram especialmente, oxigenação local dos tecidos, infecção, idade (estimaram que idosos têm cicatrização mais retardada do que jovens), hormônios sexuais (homens idosos tendem a pior cicatrização do que mulheres idosas), estresse, diabete, obesidade (feridas complicadas como infecção de sítio cirúrgico, seroma, deiscência de sutura são mais frequentes em obesos), medicamentos (glicocorticoides, anti-inflamatórios não hormonais e quimioterápicos tendem a retardar a cicatrização), alcoolismo, tabagismo e má nutrição.

Okonkwo e DiPietro⁴⁸ apontaram o aumento preocupante da diabete mellitus Tipo II no mundo ressaltaram miríade de comorbidades associadas, incluindo deficitária cicatrização de feridas, possibilidade de úlceras crônicas e, mesmo, amputação em membros. Postularam, baseados em revisão narrativa, que a diabete altera todas as fases definidas e ordenadas da cicatrização de feridas cutâneas, especialmente na proliferação, remodelação e angiogênese da ferida. Citam a etiologia multifacetada das feridas crônicas diabéticas e sugerem ligação direta entre feridas que não cicatrizam e angiogênese deficitária.⁴⁸

3.3 *CALENDULA OFFICINALIS* L.

Della Loggia et al²¹ apresentaram a composição dos extratos das flores de *Calendula officinalis* L. e delinearão as propriedades anti-inflamatórias dos triterpenos. Apontaram que a atividade anti-inflamatória de diferentes extratos de calêndula é proporcional ao seu teor de monoéster de faradiol, que poderia ser considerado um parâmetro adequado no controle de qualidade das preparações com a planta.

Zitterl-Eglseer et al²² separaram e isolaram ésteres de faradiol em flores de *Calendula officinalis* L. por meio de HPLC (*high performance liquid chromatography*), pela primeira

vez. Demonstraram que o faradiol apresenta o mesmo efeito da indometacina, em dose equimolar.

Fronza et al¹⁸ estudaram extratos hexano e etanólico de *Calendula officinalis* em modelo *in vitro* (*scratch assay*) e comprovaram sua propriedade anti-inflamatória, especificamente com estímulo na migração de fibroblastos e proliferação celular.

Parente et al⁴⁹ analisaram os efeitos de extrato etanólico da *Calendula officinalis* cultivada no Brasil, em modelo de membrana corioalantóide e feridas cutâneas em ratos. Realizaram análises macroscópica, morfométrica, histopatológica e imuno-histoquímica que revelaram atividade anti-inflamatória, cicatrizante e antibacteriana do extrato. Assim como propriedades angiogênicas e fibroplásticas que atuaram positivamente nas fases inflamatória e proliferativa do processo de cicatrização de feridas cutâneas.

Neukirch et al⁵⁰ analisaram a quantidade de monoésteres de triterpenos em extratos de diferentes flores de *Calendula officinalis*. Ressaltaram a bioatividade dos seguintes monoésteres, faradiol-3-O-palmitato, faradiol-3-O-miristato, faradiol-3-O-laurato, arnidiol-3-O-palmitato, arnidiol-3-O-miristato, arnidiol-3-O-laurato, calenduladiol-3-O-palmitato e calenduladiol-3-O-miristato. Em particular o laurato de faradiol presente em todas as flores em níveis duas vezes maiores do que os previamente determinados.

Agra et al²⁰ estudaram eficácia de triterpenos para cicatrização de feridas em revisão sistemática. Relataram que além de reduzir o tempo de fechamento em praticamente todos os tipos de feridas, os triterpenos também demonstraram ação moduladora na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no microambiente da ferida, indutora de migração celular, proliferação celular e deposição de colágeno e, aceleraram o processo de reparo tecidual. Os autores alertaram que, embora os efeitos farmacológicos dos triterpenos estejam bem caracterizados, há pouco conhecimento a respeito de seus efeitos específicos sobre queratinócitos, fibroblastos e outras células envolvidas na cicatrização.

Monografia da Espécie *Calendula officinalis* L. (Calêndula), organizada por Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) foram relatadas informações botânicas da planta, detalhamento para controle de qualidade de produtos, segurança e toxicidade, indicações da planta e seus derivados, formas farmacêuticas e citações em monografias e compêndios, entre esses, Farmacopeia Brasileira e Farmacopeia Europeia.¹⁷

Patel et al¹⁹ realizaram ensaios de atividade metabólica celular para um molde de hidrogel e quitosana carregado com lupeol. A atividade biológica do lupeol, triterpeno pentacíclico e um dos principais componentes da extração das flores de *Calendula officinalis* L., foi avaliada por ensaio antioxidante e antibacteriano. Concluíram que o filme de hidrogel de quitosana com liberação progressiva de lupeol pode ser aprimorada e utilizada em curativos durante a cicatrização de feridas.

Carvalho et al²⁵ revisaram o uso de plantas da família *Asteraceae* na cicatrização de feridas e o desenvolvimento de novas e mais eficientes terapias baseadas em suas propriedades farmacológicas. Os mecanismos de ação de compostos derivados de *Asteraceae* impactam diretamente na cicatrização devido especialmente ao efeito anti-inflamatório. Citaram que produtos com derivados das plantas da família *Asteraceae* demonstraram eficácia quando avaliados em ensaios clínicos de feridas complicadas, incluindo úlceras venosas nas pernas e úlceras nos pés de pacientes diabéticos.

Givol et al²³ revisaram de forma sistemática 14 estudos, 7 experimentos em animais e 7 ensaios clínicos com uso de *Calendula officinalis* L. em feridas. Citaram que o uso de extratos de *Calendula officinalis* L. na cicatrização de feridas agudas resultou em resolução mais rápida da fase de inflamação e aumento da produção de tecido de granulação. Essas descobertas foram consistentes em cinco estudos com animais e um ensaio clínico randomizado para feridas agudas. Em lesões crônicas os resultados foram variados, porém referiram que a calêndula por conter metabólitos secundários, pode prevenir complicações

durante a cicatrização de feridas. Os autores referiram que as evidências da eficácia dos extratos de calêndula no manejo da cicatrização de feridas necessitam de mais estudos continuados, especialmente ensaios clínicos. Apontaram pequeno número de ensaios clínicos e com diferenças metodológicas. Recomendaram estudos prospectivos, com padronização na mensuração das lesões e dos resultados para estabelecer a eficácia dos extratos de calêndula na cicatrização de feridas.

Lania et al⁵¹ avaliaram os efeitos locais e possíveis efeitos sistêmicos de ácidos graxos essenciais aplicados topicamente em perdas cutâneas em ratos. Os autores utilizaram curativo com óleo mineral nos grupos de estudo tanto para tratamento, quando compararam a solução salina, como para controle, quando comparado ao ácido graxo essencial. Explicaram que o óleo mineral foi usado como tratamento por reter a umidade no local da ferida e, como controle por ser inerte, permitindo avaliar devidamente os efeitos do ácido graxo essencial.

Shedoeva et al¹⁶ revisaram artigos que utilizaram extratos de plantas medicinais e apontaram gama de propriedades farmacológicas da *Calendula officinalis*, como, antiinflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiviral, antifúngica e antitumoral, porém, sem a compreensão exata do mecanismo de sua atuação. Citaram culturas de fibroblastos humanos e murinos demonstrando estímulo a migração de fibroblastos e interferência na via PI3K (importante mecanismo regulador do crescimento e metabolismo celular por meio da enzima fosfatidil-inositol-3-quinase sinalizadora de proteínas intercelulares). Referiram também, trabalhos experimentais com resultados satisfatórios para estímulo no tecido de granulação, expressão do fator de crescimento do tecido conjuntivo e aumento da angiogênese. Concluíram a importância do estudo da miríade de produtos naturais e derivados reagentes ainda não descritos que poderiam ter lugar de destaque no inventário terapêutico contemporâneo.

Hormozi et al⁵² fizeram experimento em células de fibroblastos embrionários de camundongo com extrato de *Calendula officinalis* demonstrando ausência de citotoxicidade e estímulo a proliferação dessas células. O aumento da expressão de fatores de crescimento (TGFβ1 e bFGF) após o início do tratamento tende a estimular a função dos fibroblastos durante a cicatrização de feridas.

Chanaj-Kaczmarek et al⁵³ estudaram curativos de hidrogel carregado de extrato liofilizado de *Calendula officinalis* com quitosana em modelo que simula a permeabilidade através da membrana epidérmica, visando o tratamento de feridas crônicas. Os autores reafirmaram as propriedades antiinflamatórias e antimicrobiológicas da *Calendula officinalis*. O hidrogel tendeu a liberar de forma controlada o extrato que se tornou mais aderente pela adição da quitosana, demonstrando resultados animadores para o uso clínico.

Kharat et al⁵⁴ pesquisaram nanofibras eletrofiadas (estrutura de oxido de polietileno com quitosana) carregadas de *Calendula Officinalis*, observando sua ação sobre a cicatrização complicada de feridas por infecção. As estruturas de nanofibras com técnica de eletrofiação tem mostrado resultados promissores no processo de cicatrização de feridas por servirem de alicerce para adesão, proliferação e diferenciação celular. A inclusão do extrato de *Calendula Officinalis* resultou na redução de bactérias gram positivas em 96% e gram negativas em 94% reforçando sua propriedade antibacteriana. Estudos *in vitro* com células de fibroblastos confirmaram aumento da proliferação, crescimento e adesão celular e análise *in vivo* e histológica de feridas em ratos, revelou excelente capacidade de cicatrização de feridas com a utilização de curativos com a estrutura de nanofibras eletrofiadas com adição de *Calendula Officinalis*. Os autores postularam que a aceleração no fechamento da ferida ocorreu devido a melhoria na síntese de colágeno, facilitação na epitelização e remodelação tecidual.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo clínico randomizado controlado que seguiu as recomendações de padrões consolidados para relatar ensaios clínicos, CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) e registro na plataforma ReBEC (Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos), com número de referência RBR-3sg8mbc. Houve aprovação do comitê de ética e pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) por meio da plataforma Brasil com certificado de apresentação de apreciação ética (CAAE) número 28118614.3.0000.0020 e parecer substanciado de aprovação número 4.252.733. A intervenção analisada foi o uso de extrato padronizado de *Calendula officinalis* L. (Plenusdermax®).

4.1 RECRUTAMENTO

Pacientes atendidos no setor de emergência do Hospital Universitário Cajuru (HUC-PUCPR) e que apresentavam trauma em mãos e dedos, especificamente feridas com perda de substância de pele ou feridas em que o fechamento primário não era possível, seguiram o fluxo de atendimento ambulatorial rotineiro quando a opção de tratamento urgente foi a cicatrização por segunda intenção. Após o atendimento inicial os pacientes eram encaminhados ao ambulatório de cirurgia da mão do HUC para curativos semanais seguindo o protocolo previamente estabelecido. Antes do delineamento da pesquisa, os curativos eram feitos utilizando óleo mineral, gaze seca e enfaixamento do local com atadura de crepom. Por essa razão, o óleo mineral padronizado pela instituição e utilizado habitualmente pelo grupo de cirurgias da mão, foi empregado como controle neste estudo. Foram elegíveis 40 pacientes com 42 lesões durante período de um ano. Feridas em mais de um dedo de um mesmo paciente foram contabilizadas. Um paciente com uma lesão foi excluído por apresentar ferida com área superior a definida nos critérios de inclusão, citados a seguir.

Além dos dados demográficos dos sujeitos da pesquisa, foram captados dados clínicos que sabidamente teriam relação com o processo cicatricial, ou sejam, presença de diabetes e consumo de tabaco.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo, adultos, com no mínimo 18 anos, atendidos no pronto socorro de nossa instituição, que sofreram trauma agudo em mão ou dedos, com perda de substância de pele menores do que 10 cm², sem exposição de osso, nervo, vasos ou tendões, nos quais não houve possibilidade de fechamento primário da ferida, ou seja, não foi possível a aproximação completa dos bordos da ferida e a opção inicial para tratamento foi a cicatrização por segunda intenção. Excluíram-se lesões com exposição de osso, nervo, vasos ou tendões, falta de adesão ao tratamento com evidência de higienização inadequada da lesão em desacordo com a orientação médica, sinais clínicos de infecção na ferida, reação adversa ao produto utilizado, ausência de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido ou abandono do tratamento.

4.3 RANDOMIZAÇÃO E ALOCAÇÃO

No ambulatório de cirurgia da mão e após as lesões serem avaliadas por um médico componente do grupo de pesquisadores, visando o cumprimento dos critérios estabelecidos para o estudo, os pacientes eram esclarecidos sobre a intenção da pesquisa e assinaram voluntariamente o termo de consentimento livre e esclarecido. Os sujeitos da pesquisa eram então alocados nos grupos controle e intervenção por meio do sorteio de 40 envelopes lacrados, 20 para cada grupo. Como um paciente havia sido excluído por área de lesão acima de 10 cm², restou um envelope que foi descartado. Após a fase de randomização, grupo

controle (GC) foi composto por 20 pacientes com 20 lesões e, grupo intervenção (GI) por 19 pacientes e 21 lesões.

4.4 INTERVENÇÃO

No grupo intervenção utilizou-se produto cicatrizante à base de *Calendula officinalis* L. a 4% uma vez ao dia, manipulado por uma das farmácias autorizadas seguindo o fluxo de dispensação de fitoterápicos para a população em geral, dentro de critérios legais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.¹⁷ Esse insumo farmacêutico ativo vegetal padronizado feito por extração dos capítulos florais da *Calendula officinalis* L. (Plenusdermax®/Phytoplenus Bioativos S.A.), utilizou veículo hidroglicólico (polietilenoglicol) associado a pressão, frequência e temperaturas controladas. No grupo controle foi aplicado óleo mineral (indústria química Farmacêutica Cearense Ltda) de forma semelhante ao produto estudado. Os veículos utilizados nos produtos, tanto o óleo mineral como o polietilenoglicol não apresentaram propriedades terapêuticas que pudessem afetar o resultado nos grupos. O óleo mineral foi utilizado como controle por ser substância padronizada pela instituição, por ter sido utilizado como controle em outro estudo e por proporcionar hidratação na ferida, evitando perda transepidermal de líquido durante o processo de epitelização.⁵¹

Em ambos os grupos, pacientes e familiares receberam orientação verbal e escrita para a sequência diária de limpeza da ferida, secagem das bordas com papel toalha, e aplicação do produto. Após aspensão do produto sobre a lesão, orientou-se aguardar a secagem natural e adaptar curativo convencional (gaze seca e atadura de crepom). A cada consulta ambulatorial, até que houvesse epitelização completa, essas orientações eram checadas e as feridas fotografadas. Considerou-se epitelizada a ferida que não mais apresentava tecido de granulação, de aparência firme e granular.²⁸ Como exemplificado na

figura 1C o tecido epitelizado apresenta cor rosa perolada semelhante a acabamento fosco opaco. A última área antes da epitelição e o tempo nesse momento (figura 1B) foram utilizados para os cálculos estatísticos como área e tempo finais.



Figura 1. Ferida no dedo em etapa final da cicatrização por segunda intenção. A: Exemplifica área em epitelição que mantém no centro pequena zona de granulação B: Detalhe aproximado da zona de granulação circundada na mesma imagem A para a medição no programa ImageJ. Em preto o delineamento das margens entre o processo de granulação e a área já epitelizada. Considerou-se a medida dessa área de granulação como área final para os cálculos estatísticos. C: Ferida epitelizada. **Fonte:** a autora, 2021.

4.5 CAPTAÇÃO DE FOTOGRAFIAS DAS FERIDAS

Adesivos descartáveis com área uniforme (176,7145 mm²) e cor diferente para cada grupo foram usados como gabarito para posterior medição das lesões, que foram fotografadas com câmera fotográfica digital (Canon, Modelo Powershot SX20is) com resolução de oito *Mega Pixels*, sem utilizar recurso de aproximação. Em média, dez fotos foram captadas perpendiculares às lesões, em ângulo de 90°, com distância aproximada de 50 cm, atentando-se para formação de sombras, variação da iluminação e foco. Os pesquisadores que avaliaram as feridas orientaram os pacientes quanto aos cuidados diários na utilização dos produtos, e os que captaram as fotografias mantiveram o sigilo sobre a identificação dos grupos segundo a cor do gabarito adesivo.

4.6 ESTUDO PILOTO

Estudo piloto com os cinco primeiros casos de cada grupo foi realizado para a obtenção do cálculo amostral utilizando-se o programa *Easy Sample Size Project*.⁵⁵ Utilizou-se teste paramétrico para duas médias considerando o tempo de epitelização como variável de estudo. Estabeleceu-se o valor de 0,05 para alfa e 0,8 para o poder do teste. O resultado da diferença das médias do tempo de epitelização entre os casos piloto dos dois grupos foi igual a 7,04 dias (GC=19,44 / GI = 12,4) e os desvios padrão, 7,32 para GC e 3,91 para GI. A recomendação para o tamanho da amostra foi de 22 indivíduos no total e 11 casos em cada grupo da pesquisa.

4.7 PLANIMETRIA

A etapa de planimetria das feridas foi realizada pelo pesquisador principal, que desconhecia a correspondência entre a cor do gabarito usado na foto documentação e o grupo intervenção ou controle. Utilizou-se o programa computacional Image J (*National Institute of Health/USA*)⁵⁶ para mensuração das áreas das feridas. Seguiram-se as recomendações de Aragón-Sánchez et al⁴⁴ para padronização no contorno das lesões e sua mensuração. Escolheram-se imagens de cada dia da avaliação ambulatorial para a medição da área delimitada entre as bordas epitelizadas ou de necrose seca e a área de granulação ou de necrose úmida nas lesões. As fotografias foram aumentadas com recurso do próprio programa para facilitar a delimitação da área em granulação e epitelizada. Foram tomadas três medidas da área do gabarito e da lesão em *Mega Pixels* na fotografia escolhida de cada um dos dias durante o seguimento do processo de cicatrização por segunda intenção. Após o planilhamento dos dados calculou-se a média dessas três medidas transpondo para milímetros quadrados. A planimetria da lesão tomada em cada dia de avaliação ambulatorial

possibilitou o delineamento do cálculo da contração diária da lesão e do percentual de cicatrização diário que traduz a velocidade de cicatrização.

A contração da lesão (CLd), expressa em mm²/dia, foi calculada como a diferença entre a área inicial (Ai) e a área final (Af) em mm², dividida pelo tempo em dias, considerando-se a fotodocumentação da área inicial e da última área antes da epitelização, de acordo com a expressão a seguir:

$$CL_d = \frac{(A_i - A_f)}{Tempo}$$

A velocidade de cicatrização (VC%d), expressa em percentual por dia, foi calculada considerando o intervalo entre área inicial e final e o tempo na captação das imagens, como na expressão a seguir:

$$VC_{\%d} = \frac{(100 * \frac{(A_i - A_f)}{A_i})}{Tempo}$$

Nesta fase, três lesões foram excluídas por não apresentarem medida anterior à epitelização (2 lesões do GI e 1 do GC). Ou seja, no segundo retorno ao ambulatório já havia epitelização, impossibilitando aferir de forma fidedigna a área antes da epitelização para o cálculo da velocidade de cicatrização da lesão. Portanto, nossa amostra consistiu em 17 pacientes com 19 lesões no GI e 19 pacientes com 19 lesões no GC (Anexo 1).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os cálculos estatísticos foi usado o programa IBM SPSS Statistics v.20.0 (Armonk, NY: IBM Corp.), determinando-se resultados de $p < 0.05$ como estatisticamente significativos.

Os resultados de variáveis quantitativas foram expressos por média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil, e as variáveis qualitativas descritas por frequências e

porcentagens. Considerou-se como área final a última área fotodocumentada antes da epitelização. Nesse mesmo sentido, a variável tempo foi considerada como o dia da última tomada fotográfica antes da epitelização das lesões (figura 1B e C).

Como houve normalidade avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, a comparação dos grupos (controle e intervenção) em relação às variáveis quantitativas idade e velocidade de cicatrização foi feita utilizando-se o teste t de Student para amostras independentes com variâncias iguais não assumidas (teste de Levène). Para as demais variáveis quantitativas, área inicial e final das lesões, número e intervalo entre as coletas da fotodocumentação, tempo de tratamento por segunda intenção e contração das lesões, foi usado o teste não paramétrico de Mann Whitney, devido à ausência da condição de normalidade dessas variáveis. A comparação dos grupos em relação a variáveis categóricas foi realizada por meio de teste exato de Fisher ou teste de Qui-quadrado.

A relação entre o efeito do tratamento nos grupos e a velocidade de cicatrização foi estudada em modelo de regressão linear simples, considerando como variável explicativa o tratamento efetuado nos grupos. Posteriormente, ajustou-se modelo multivariado incluindo-se as covariáveis, sexo, idade, presença de diabete e consumo de tabaco.

O tempo decorrido até a observação da última área antes da epitelização (desfecho) foi descrito por curvas de Kaplan-Meier. Utilizou-se o teste de logrank para comparação das curvas nos grupos definidos pelo tratamento.

5 RESULTADOS

Passaremos a expor os resultados da amostra que consistiu em 17 pacientes com 19 lesões do grupo intervenção (GI) e 19 pacientes com 19 lesões do grupo controle (GC). Na tabela 1 encontramos a distribuição das variáveis nos dois grupos. Não foram observadas diferenças significativas na distribuição dos grupos controle e intervenção para as variáveis idade, sexo, presença de diabetes e consumo de tabaco (tabela 1).

| Variável | Classificação | Grupo | | p* |
|--------------|---------------|-------------------------|----------------------------|-------|
| | | Controle (19 pacientes) | Intervenção (17 pacientes) | |
| Idade (anos) | Média ± DP | 43,4 ±20,3 | 41,2 ±18,2 | 0,736 |
| | Mediana (AIQ) | 40 (42) | 35 (33,5) | |
| Sexo (%) | Feminino | 26,3 | 17,6 | 0,695 |
| | Masculino | 73,7 | 82,4 | |
| Diabetes (%) | Não | 89,5 | 94,1 | 1 |
| | Sim | 10,5 | 5,9 | |
| Tabaco (%) | Não | 84,2 | 76,5 | 0,684 |
| | Sim | 15,8 | 23,5 | |

Tabela 1. Comparação dos grupos em relação à idade e variáveis categóricas (sexo, presença de diabetes e consumo de tabaco). Comparação dos grupos em relação à idade e variáveis categóricas (sexo, presença de diabetes e consumo de tabaco). *Teste t de Student para amostras independentes (idade); teste exato de Fisher ou teste de Qui-quadrado (variáveis categóricas); $p < 0,05$; DP: desvio padrão; AIQ: amplitude interquartilica. **Fonte:** a autora, 2021.

A distribuição das lesões nos grupos, controle e intervenção, quanto a local acometido e lateralidade está relacionada na tabela 2. No GC, 31,6% dos pacientes sofreram as lesões durante o trabalho remunerado ou a caminho desse. Semelhante proporção foi observada no GI (35,3% dos pacientes).

| Local da lesão | Grupos de Tratamento (N=38) | | | |
|--------------------|-----------------------------|----|--------------------|----|
| | Controle (N=19) | | Intervenção (N=19) | |
| | LD | LE | LD | LE |
| 1° dedo (N=7) | 2 | 2 | 1 | 2 |
| 2° dedo (N=9) | 1 | 3 | 3 | 2 |
| 3° dedo (N=5) | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 4° dedo (N=9) | 2 | 3 | 2 | 2 |
| 5° dedo (N=5) | 0 | 2 | 1 | 2 |
| Palma da Mão (N=3) | 1 | 1 | 0 | 1 |

Tabela 2. Distribuição das lesões nos grupos, controle e intervenção, em relação ao local da lesão e lateralidade. LD = lado direito; LE = lado esquerdo. **Fonte:** a autora, 2021.

Na tabela 3 encontramos a análise das variáveis quantitativas relacionadas às dezenove (19) lesões traumáticas de cada grupo (controle e intervenção) referente a avaliação final (área e tempo da última foto documentação antes da epitelização da ferida).

| VARIÁVEL | Grupo Controle n=19 | | Grupo Intervenção n=19 | | Valor p* |
|--------------------------------------|---------------------|---------------|------------------------|---------------|--------------|
| | Média ± DP | Mediana (AIQ) | Média ± DP | Mediana (AIQ) | |
| Área Inicial mm ² | 182,3±183,5 | 146,2 (120,9) | 171,3 ± 121,2 | 153,7 (117,1) | 0,686 |
| Número Coletas | 4,4±1,8 | 4 (2) | 3,1±1,3 | 3 (2) | 0,018 |
| Intervalo Coletas média dias | 4,1±1,9 | 3,5 (0,8) | 4,2±1,6 | 3,5 (0,5) | 0,931 |
| Área Final** mm ² | 41± 40,6 | 28,7 (51,1) | 64,2±72,3 | 37,2 (64,7) | 0,311 |
| Tempo dias | 13,2±7,4 | 11 (14) | 8,6±4,7 | 7 (7) | 0,046 |
| Contração Lesão mm ² /dia | 12,5±18,5 | 7 (9,3) | 13,8±8,9 | 8,8 (14,3) | 0,103 |
| Velocidade Cicatrização % dia | 6,2±2,9 | 6,2 (3,9) | 9,5±5,8 | 6,9 (9,3) | 0,036 |

Tabela 3. Variáveis quantitativas referentes as 19 lesões traumáticas em cada grupo (controle e intervenção). DP: desvio padrão; AIQ: amplitude interquartílica. * valor de p no Teste t de Student para amostras independentes ou no teste não-paramétrico de Mann-Whitney. **Área final na última avaliação antes da epitelização da lesão. **Fonte:** a autora, 2021.

Considerando-se área inicial e final das feridas e, intervalo de dias entre as coletas (avaliações ambulatoriais e tomadas das fotografias para mensuração das lesões) não houve diferença entre os grupos. A contração das lesões foi semelhante nos grupos. Número de coletas e tempo de epitelização mostraram-se significativamente menores no GI. A velocidade de cicatrização foi maior no grupo intervenção com $p = 0,036$.

O resultado do ajuste do modelo de regressão linear univariado para a velocidade de cicatrização (Modelo 1) indicou haver associação significativa entre o tratamento nos grupos e a velocidade de cicatrização ($p = 0,033$). O coeficiente angular foi igual a 3,33. No grupo intervenção a velocidade de cicatrização foi 3,33 pontos percentuais a mais do que no controle. Adicionando-se a esse modelo de regressão as covariáveis sexo, idade, presença de diabetes e uso de tabaco (Modelo 2), não houve modificação no efeito do tratamento (coeficiente angular = 3,20; $p = 0,048$). (Tabela 4)

| | Variável explicativa | p | Coefficiente estimado | IC95% |
|-----------------|----------------------|-------|-----------------------|--------------|
| Modelo 1 | Tratamento | 0,033 | 3,33 | 0,27 - 6,38 |
| Modelo 2 | Tratamento | 0,048 | 3,20 | 0,02 - 6,37 |
| | Sexo | 0,325 | 1,90 | -1,98 - 5,78 |
| | Idade | 0,700 | -0,02 | -0,10 - 0,07 |
| | Diabete | 0,907 | 0,35 | -5,67 - 6,36 |
| | Tabaco | 0,257 | -2,35 | -6,50 - 1,79 |

Tabela 4. Modelos de Regressão Linear. **Modelo 1:** Análise univariada, considerando variável dependente como velocidade de cicatrização (%_{dia}) e tratamento nos grupos como variável explicativa. A velocidade de cicatrização no grupo intervenção foi 3,33 pontos percentuais a mais do que no controle. **Modelo 2:** Análise multivariada, incluindo como covariáveis: sexo, idade, presença de diabetes e uso de tabaco. A velocidade de cicatrização continuou mais rápida no grupo intervenção, com valor de $p = 0,048$, independente da inclusão de covariáveis. **Fonte:** a autora, 2021.

A figura 2 demonstra as Curvas de Kaplan Meier utilizando como parâmetros a proporção de feridas que epitelizaram nos grupos em relação ao tempo em dias. Considerou-se como desfecho a observação da área final (última área foto documentada antes da epitelização das lesões). Foi observada diferença significativa entre as curvas dos dois grupos no teste de longrank com $p = 0,02$, sendo o tempo de epitelização menor no grupo intervenção em relação ao grupo controle.

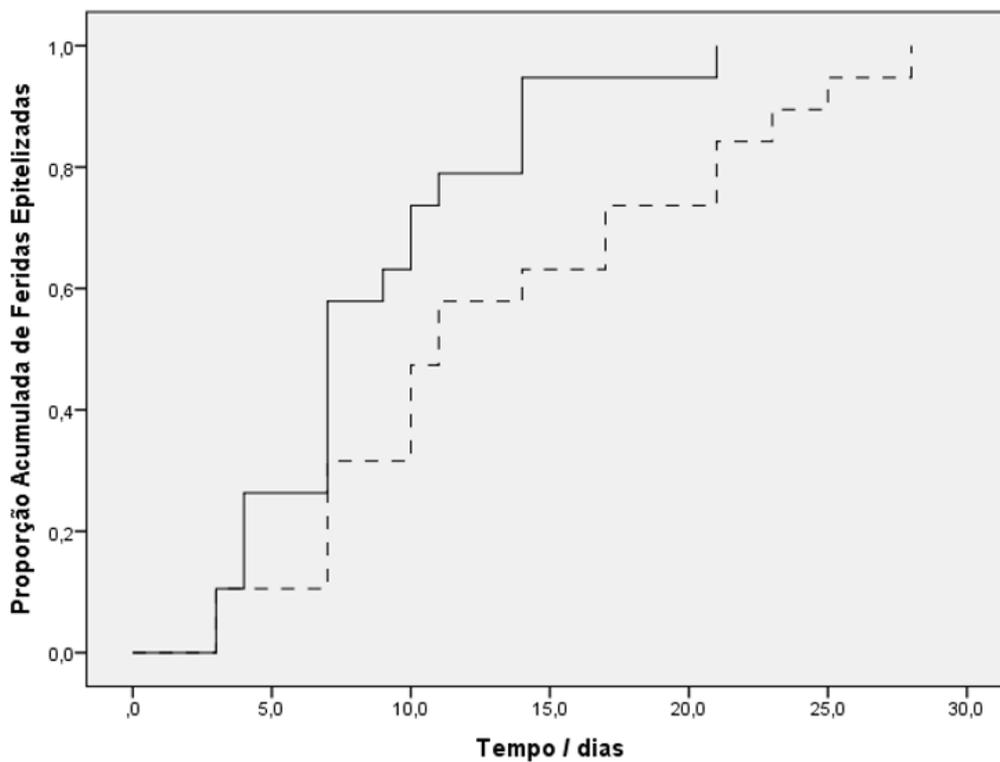


Figura 2. Curva de Kaplan Meier: Evolução da epitelação nos grupos. As curvas demonstram a proporção cumulativa de feridas que se epitelizaram ao longo do tempo. A linha sólida representa o grupo de intervenção e a linha pontilhada representa o grupo de controle. Teste de Logrank $p = 0,02$
Fonte: a autora, 2021.

As figuras 3 e 4 exemplificam a evolução clínica dos pacientes do grupo intervenção e controle, respectivamente.

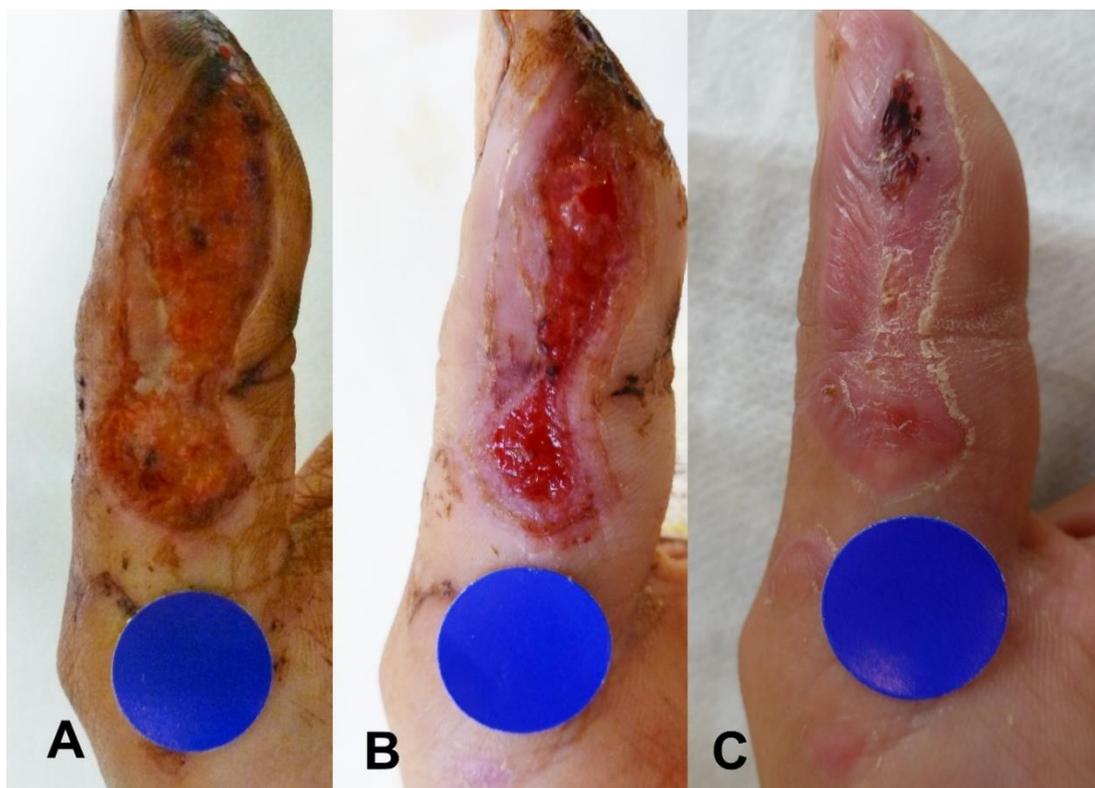


Figura 3. Evolução clínica do grupo intervenção. A: Mostra área inicial de 418,1 mm². B: Aspecto clínico aos 7 dias. C: Epitelização aos 14 dias. Homem, 23 anos. **Fonte:** a autora, 2021.

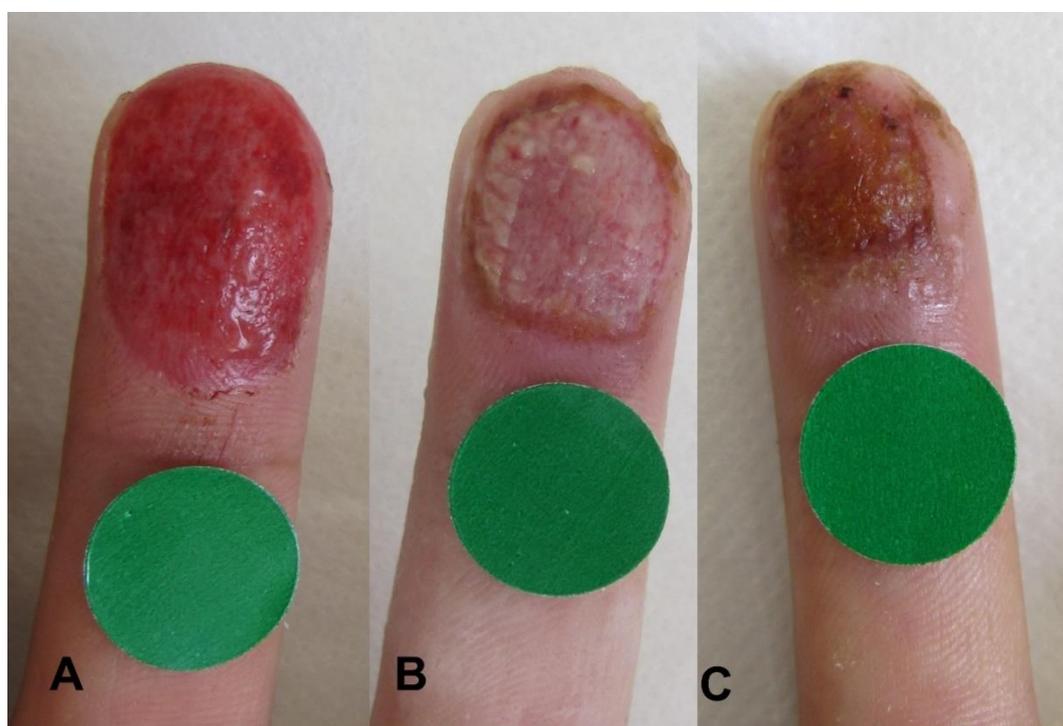


Figura 4. Evolução clínica do grupo controle. A: Mostra área inicial de 268,9 mm². B: Aspecto clínico aos 7 dias. C: Epitelização aos 18 dias. Homem, 20 anos. **Fonte:** a autora, 2021.

Comparando as lesões nos dois exemplos apresentados podemos observar que a lesão inicial do grupo intervenção era consideravelmente maior do que no outro grupo e resultou epitelizada em 14 dias, enquanto no grupo controle em 18 dias.

6 DISCUSSÃO

A mão usada como ferramenta essencial nas atividades diárias do indivíduo e a quantidade significativa de lesões traumáticas encontradas nos atendimentos emergenciais apontam para a importância de acelerar a recuperação, especialmente em lesões cutâneas de mão e dedos tratadas com cicatrização por segunda intenção. Perdas de polpa digital sem exposição óssea progridem no processo de granulação e epitelização com retorno completo de sensibilidade tátil e discriminação entre dois pontos, sendo o resultado da cicatrização considerada superior a cobertura por enxertia de pele.¹⁰ A questão levantada nesta tese de doutorado foi a necessária aceleração da epitelização especialmente de feridas em mão, primordial para a maioria das atividades diárias dos indivíduos.

O uso de extratos de calêndula em modelos experimentais com culturas de fibroblastos, feridas agudas em animais e estudos clínicos de feridas crônicas complicadas demonstrou resultados promissores no estímulo da fase proliferativa e na aceleração da epitelização.^{16,25,52} Autores citaram estímulo na formação do tecido de granulação, expressão de fatores de crescimento do tecido conjuntivo e aumento da angiogênese. Givol et al²³ estabeleceram em revisão sistemática que a cicatrização de feridas agudas, em cinco estudos com animais e um ensaio clínico randomizado em feridas de episiotomia, mostrou resolução mais célere da fase de inflamação com aumento da produção do tecido de granulação nos grupos de teste tratados com extratos de calêndula, na maioria etanólicos, sem especificações de composição. Em lesões crônicas, referiram resultados variáveis com o uso de extratos de calêndula em geral. Entretanto, discutem que a ausência de especificações na composição e concentração pode ter influenciado os resultados. Os autores citaram, a utilização do mesmo extrato padronizado estudado nesta pesquisa, em ensaio clínico do tratamento de úlceras venosas mostrando significativa diminuição da área da lesão comparada a um grupo

controle. Apontaram também, o hiato de estudos clínicos que analisem a evolução de feridas agudas com o uso de extrato de *Calendula officinalis* L.

O insumo farmacêutico ativo vegetal padronizado utilizado nesta pesquisa (Plenusdermax®/Phytoplenus Bioativos S.A.) é feito por extração criteriosa dos capítulos florais da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil, utilizando-se veículo hidroglicólico (polietilenoglicol) associado a pressão, frequência e temperatura controladas. A opção por extração em meio glicólico e não etanólico deve-se a maior segurança na obtenção dos bioativos da planta. O uso de etanóis para a extração tende a desidratar as células e causar seu rompimento preservando menos os componentes vegetais. A extração dos bioativos da planta do produto aqui utilizado é checada rotineiramente por cromatografia líquida de alta eficiência a cada lote. Dez monoésteres triterpenos são identificados e quantificados (Arnidiol-3-0-palmitato; Arnidiol-3-0-miristato; Arnidiol-3-0-laurato; Calenduladiol-3-0-palmitato; Calenduladiol-3-0-myristato; Calenduladiol-3-0-laurato, Faradiol-3-0-palmitato; Faradiol-3-0-miristato; Faradiol-3-0-laurato e Lupeol), perfazendo a concentração de 0,0899 – 0,1868 mg/ml de monoésteres totais, expressos em Lupeol no extrato vegetal à 4%. Ressaltamos que Neukirch, et al⁵⁰ determinaram duas vezes maior quantidade de triterpenos bioativos do que relatada em estudos prévios para todas as espécies de *Calendula officinalis* L., especialmente a variedade *Calypso Orange Florensis*, amplamente cultivada no Brasil.

Este ensaio clínico randomizado controlado analisou a evolução do processo de cicatrização por segunda intenção em feridas agudas de mão e dedos. Por meio da planimetria de imagens das lesões foi possível verificar a diminuição progressiva da área da perda cutânea comparando a velocidade de cicatrização nos grupos de estudo. A amostra nos dois grupos foi composta na maioria por homens na quarta década de vida, com feridas localizadas em segundo e quarto dedos das mãos, sendo mais afetado o lado esquerdo. Analisando os dados aqui encontrados observamos homogeneidade da distribuição nos

grupos, relacionado a idade, gênero, presença de diabetes, uso de tabaco, número de coletas, intervalo de dias entre as coletas e das áreas iniciais (Tabela 1). Essa similitude entre os grupos de estudo, proporcionada pela randomização, permitiu aferir uma velocidade de cicatrização significativamente mais rápida no grupo em que se utilizou o extrato padronizado de calêndula ($GI = 9,5 \pm 5,8$ versus $GC = 6,2 \pm 2,9$, $p = 0,036$) (Tabela 3). A análise da regressão linear demonstrou que a velocidade de cicatrização no grupo intervenção (GI) foi 3,33 pontos percentuais a mais do que no controle (GC), portanto 50,5% mais célere no GI (Tabela 4). Também a comparação das curvas de Kaplan Meier corroborou com esses achados, evidenciando diferença significativa para o GI ($p = 0,02$, Figura 3). A contração diária das lesões não diferiu entre os grupos de estudo ($GI = 13,8 \pm 8,9$ versus $GC = 12,5 \pm 18,5$, $p = 0,103$) (Tabela 3). A tendência da ferida aguda é evoluir para a cura, diminuindo progressivamente sua área durante o processo de cicatrização por segunda intenção, independentemente do tratamento empregado.³¹ Cerca de 20% da contração das lesões ocorre nas primeiras duas semanas após a perda cutânea, durante o processo de proliferação que culmina na epitelização.²⁷ O restante da contração cicatricial ocupa especialmente o período de remodelação da cicatriz. Considerando que comparamos os dois grupos de perdas cutâneas em mão e dedos apenas até o ponto da epitelização é plausível que o resultado da contração das lesões nos dois grupos tenha sido semelhante.

Relevante discorrer sobre os dados de áreas das feridas e tempo de epitelização encontrados em nossas amostras. A área e o tempo reais para a epitelização das lesões foram descartados para os cálculos estatísticos. Utilizou-se a mensuração da área e o tempo da última avaliação ambulatorial das feridas dos pacientes antes da avaliação em que os pesquisadores constataram não haver mais granulação, ou seja, ferida epitelizada. Todas as áreas finais na epitelização seriam iguais a zero e o tempo seria impreciso, pois, não haveria como afirmar categoricamente o dia real da epitelização baseado na informação dos sujeitos

da pesquisa. Importante ressaltar, que o intervalo em dias entre as avaliações ambulatoriais, com coletas das fotografias digitais, foi semelhante nos grupos estudados. Porém, o número de coletas mostrou-se significativamente menor no grupo intervenção, concordante com o menor tempo de epitelização encontrado nesse grupo (GI = 8.6 ± 4.7 versus GC = 13.2 ± 7.4 , $p = 0,046$, Tabela 3).

A epitelização faz parte da fase de proliferação do processo de cicatrização das feridas e depende basicamente da reconstituição da junção dermo-epidérmica, que ancora a epiderme à derme.¹² Os múltiplos processos celulares e moleculares envolvidos em toda fase de epitelização são essenciais para o fechamento exitoso da ferida. Se nesse período não houver adequada proliferação e migração de queratinócitos a ferida poderá não curar e resultar em cronicidade.³⁴ Nesse ponto, as proteínas da junção rígida (*tight junction proteins*, TJs), incluindo claudinas, occludinas e moléculas de adesão juncional têm papel essencial. Esse complexo juncional multiproteico tem função reguladora da via paracelular na passagem de íons, água e solutos e, pode coordenar o movimento de lipídios e proteínas entre as superfícies apical e basolateral da membrana plasmática. Desse modo, a junção rígida entre as células, conduz moléculas de sinalização que influenciam a diferenciação, proliferação e polaridade intercelular e, desempenha papel fundamental na manutenção de equilíbrio osmótico e transporte transcelular.¹³ Autores apontam lacunas no conhecimento atual sobre a completa função de barreira dessas proteínas e suas interações intercelulares epiteliais, endoteliais e imunológicas. Parecem atuar em mais de uma parte do processo de cicatrização, podem interferir sobremaneira na evolução das feridas que cicatrizam ou que não cicatrizam e agir também na fase de remodelação das lesões cutâneas.³³

Apesar da cicatrização por segunda intenção ser prática comum em feridas agudas superficiais em mão e dedos poucos trabalhos na literatura abordam a questão. Geralmente, relacionam a técnica de segunda intenção como opção em feridas resultantes da ressecção

tumoral em vários segmentos corporais.^{35,39,40} Christenson et al³⁸ em ensaio clínico randomizado, compararam aparência e satisfação de pacientes tratados com sutura primária e com segunda intenção após punção biópsia de pele e concluíram não haver diferença entre os grupos, exceto para punções maiores. Bosley et al³⁹ estudaram perdas de pele no dorso de mão e dedos, entre 0,8 a 6 cm, em 48 pacientes submetidos a ressecção de carcinoma escamoso celular e obtiveram resultados excelentes, considerando habilidade funcional, sensibilidade e estética após 10 meses da cicatrização por segunda intenção. Ressaltaram que a cicatrização por segunda intenção, opção efetiva no reparo de perdas cutâneas em mão e dedos, simplifica os cuidados com as feridas e minimiza técnicas cirúrgicas complexas ou elevação do custo de tratamento. Nesse sentido, Ehrlich e Hunt³¹ ao estudarem o mecanismo de contração de feridas em revisão de artigos *in vivo* e *in vitro*, ressaltaram que tornar mais rápido o processo de segunda intenção evitaria o desconforto e o defeito secundário ocasionados por enxertia de pele. Importante mencionar que procedimentos ambulatoriais que diminuem o tempo de hospitalização contribuem para a redução de custos diretos e indiretos do tratamento de lesões na mão, como apontado por Dias e Garcia-Elias.⁸

Durante o processo de epitelização por segunda intenção é recomendada troca frequente de curativos, porém não há padronização para essa frequência ou para o uso de substâncias que poderiam auxiliar nesse processo.^{10,14,37,41} Revisões sistemáticas concluíram não haver superioridade de algum dos protocolos de curativos com ou sem agentes cicatrizantes entre si ou mesmo, se comparados a curativos com uso de solução salina ou gaze vaselinada. Pequena vantagem, especialmente com respeito a dor do paciente na troca do curativo, foi apontada com o uso de hidrocoloides e espuma.^{37,41} Relevante lembrar a importância de manter umidade local nos curativos para evitar desidratação e exposição da derme que impacta diretamente na qualidade da cicatrização.^{26,29,30} Mais recentemente, há relatos de pesquisas em modelos experimentais com armações de hidrogel e de nanofibras

eletrofiadas carregadas com extratos de *Calendula officinalis* L., que reafirmaram suas propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas.^{53,54} Enfatiza-se o estudo de Kharat et al⁵⁴ que utilizou curativos com estrutura de nanofibras eletrofiadas e inclusão de extrato da *Calendula officinalis* L. revelando excelente capacidade de cicatrização de feridas em análises in vivo e histológica de lesões cutâneas em ratos.

Poucos trabalhos citam a velocidade com que uma lesão epiteliza. Alguns artigos referem a importância da medição da área das feridas especialmente no que se refere a cronicidade das lesões. Flanagan,⁴² em revisão narrativa postulou que a maneira mais eficaz de monitorar a cicatrização é calcular a redução percentual da área da ferida ao longo do tempo, especialmente nas primeiras semanas, permitindo a identificação precoce de fatores que poderiam retardá-la. Também Khoo e Jansen,⁴³ registraram a importância na redução da área da ferida entre 20% a 40% nas primeiras semanas como preditora de cura. Esses autores indicaram métodos de planigrafia digital para medir a progressão na epitelização, preferíveis aos de contato.^{42,43} Anuíram que áreas acima de 10 cm² tendem a ser distorcidas nas imagens captadas para análise em programas computacionais, razão pela qual limitamos a inclusão de lesões maiores em nosso estudo. Utilizamos o método de planigrafia digital com o programa ImageJ devido a praticidade do aplicativo, seguindo as recomendações de Aragón-Sánchez et al⁴⁴ para padronização no contorno das lesões e sua mensuração. O autor principal realizou treinamento prévio de quinze minutos diários por quinze dias usando imagens aleatórias de feridas. Então, de forma cega sobre os grupos, mediu três vezes a lesão fotografada de cada dia da avaliação ambulatorial, estabelecendo a área a ser analisada e permitindo a comparação da velocidade de cicatrização entre os grupos.

Encontramos em nossa amostra poucos indivíduos que relataram consumo de tabaco e presença de diabetes, cerca de 20% e 10%, respectivamente (Tabela 1). Autores de revisões narrativas evidenciaram fatores locais e sistêmicos que interferem no processo de

cicatrização das feridas, tanto agudas como crônicas.^{47,48} Oxigenação, infecção, presença de corpos estranhos e insuficiência venosa são apontados como fatores locais. Encontramos a diabetes e o consumo de tabaco dentre os fatores sistêmicos que podem influenciar na cicatrização de lesões cutâneas, tendendo a complicações como infecção e cronicidade. Apesar de não haver diferença na velocidade de cicatrização de pacientes com diabetes ou consumo de tabaco no modelo de regressão multivariado deste estudo, a inferência desses resultados não é possibilitada devido ao pequeno número de casos na amostra. (Tabela 4). Esses dados clínicos compõem o objetivo exploratório desta dissertação devido à forte ligação desses fatores com a evolução do processo cicatricial. Apontamos a ausência de aferição de índices que graduem a gravidade da diabetes ou da quantidade de cigarros consumidos diariamente pelos pacientes como uma limitação de nosso estudo. Outras limitações de nossa pesquisa devem ser explicitadas. A ausência de comparação do produto utilizado com outros produtos supostamente cicatrizantes, ou mesmo com outros extratos de calêndula. Também, não houve estudo da relação entre a velocidade de cicatrização e o local específico das feridas nos dedos e mão. Poderia talvez, uma ferida em espaço interdigital contribuir para desacelerar a epitelização comparada a outra na polpa digital.

Um terço das lesões nos dois grupos deste ensaio clínico ocorreu no trabalho remunerado. Semelhante a isso, Sorock et al² descreveram que feridas e lacerações em mãos foram as mais frequentes lesões ocupacionais, registradas em 30% dos trabalhadores. Entretanto, Davas Aksan et al³ descreveram mais de 70% de lesões na mão no trabalho remunerado com risco mais elevado em homens menores de 35 anos de idade. Ribak et al,⁶ constataram apenas 12,8% de lesões de sua série consideradas ocupacionais, maioria de homens com idade média de 33 anos. Dessas, mais da metade acometeu os dedos das mãos.

A hipótese desta tese de doutorado resultou exitosa, pois os dados aqui apresentados apontaram para a aceleração do processo de cicatrização por segunda intenção em feridas

agudas de mãos e dedos quando se utilizou o extrato padronizado de calêndula. Apesar dos resultados promissores aqui encontrados, sugerimos outras pesquisas que possam comparar de forma randomizada o uso do extrato padronizado de calêndula a outros produtos durante o processo de cicatrização por segunda intenção de feridas agudas.

7 CONCLUSÃO

A análise da progressão do processo cicatricial por segunda intenção em feridas agudas de mão e dedos por planimetria das lesões neste ensaio clínico randomizado controlado, resultou em epitelização mais veloz com uso de extrato padronizado da *Calendula officinalis* L. (EPC).

A velocidade de cicatricial percentual diário e o tempo de cicatrização diferiram significativamente no grupo que utilizou EPC comparado ao grupo controle.

Os dois grupos estudados evoluíram com semelhante contração das lesões.

Não houve diferença na velocidade de cicatrização das lesões em pacientes com diabete ou consumo de tabaco, fatores preditores investigados neste estudo.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos resultados promissores relatados neste estudo é preciso considerar que não houve comparação do extrato padronizado de *Calendula officinalis* L. (EPC) com outros produtos que auxiliam na cicatrização de feridas cutâneas. A maioria dos produtos cicatrizantes estão associados a curativos desenvolvidos atualmente para o tratamento de feridas complicadas por infecção, deficiência vascular ou diabetes crônica e descontrolada. Resumem-se a tipos que absorvem secreções ou desbridam quimicamente segmentos necrosados, mantendo a umidade necessária para a proteção da nova epiderme que se reconstrói. Poucos trabalhos discutem perdas cutâneas agudas, em geral, realizados em feridas resultantes de biópsia ou ablação de câncer cutâneo. Vários autores apontam ausência de padronização para os curativos nessas perdas cutâneas, muitas elegíveis para o tratamento com segunda intenção. Pouco há escrito sobre essa prática em feridas agudas traumáticas. A profundidade e exposição de tecidos considerados nobres é limitação para seu uso. Entretanto tamanho da lesão e especialmente, rotina de curativos durante a evolução da cicatrização são pouco documentados. Mesmo perdas de polpa digital em mãos, onde a segunda intenção é preferível ao enxerto de pele, há dificuldade em regrar o curativo mais apropriado e sua rotina de trocas. A tendência atual no tratamento em geral é facilitar as práticas, encurtar tempo e gerar bem-estar ao paciente. Aliado a isso, percebe-se o uso cada vez maior de produtos naturais que possam auxiliar na cura de doenças. Nesse sentido alguns trabalhos associam curativos ultramodernos como nanofibras eletrofiadas e armações de hidrogel de quitosana com extratos de calêndula, trazendo resultados animadores no sentido de conforto, menos dor na troca dos curativos e aceleração na cicatrização.

Outro ponto a se considerar é o conhecimento limitado disponível sobre a interferência das proteínas das junções rígidas (TJs) na cicatrização de feridas. A ação desses elementos e suas funções de barreira celular parecem interferir tanto na fase de epitelização

como de remodelação da epiderme. Podem ser a resposta para a razão de feridas não evoluírem para cura e se tornarem crônicas.

Deixamos aqui a recomendação para a continuidade de estudos comparativos do EPC com outras substâncias cicatrizantes assim como, estruturação de estudos futuros que englobem o papel do extrato padronizado de *Calendula officinalis* L. na função de barreira e nas interações entre as células epiteliais durante o processo de cicatrização de feridas.

REFERÊNCIAS

1. Clark DP, Scott RN, Anderson IW. Hand problems in an accident and emergency department. *J of Hand Surg Br.* 1985;10(3):297-299. doi:10.1016/S0266-7681(85)80047-4.
2. Sorock GS, Lombardi DA, Courtney TK, Cotnam JP, Mittleman MA. Epidemiology of occupational acute traumatic hand injuries: a literature review. *Saf Sci.* 2001;38(3):241-256. doi:10.1016/S0925-7535(01)00004-2.
3. Davas Aksan A, Durusoy R, Ada S, Kayalar M, Aksu F, Bal E. Epidemiology of injuries treated at a hand and microsurgery hospital. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2010;44(5):352-360. doi:10.3944/AOTT.2010.2372.
4. Jong JP, Nguyen JT, Sonnema AJ, Nguyen EC, Amadio PC, Moran SL. The incidence of acute traumatic tendon injuries in the hand and wrist: a 10-year population-based study. *Clin in Orthop Surg.* 2014;6(2):196-202. doi:10.4055/cios.2014.6.2.196.
5. Ootes D, Lambers KT, Ring DC. The epidemiology of upper extremity injuries presenting to the emergency department in the United States. *Hand (N Y).* 2012;7(1):18-22. doi:10.1007/s11552-011-9383-z.
6. Ribak S, de Oliveira EJM, Rosolino GP, Orru P, Tietzmann A. Epidemiology of traumatic injuries of the upper limbs in a university hospital. *Acta Ortop Bras.* 2018;26(6):370-373. doi:10.1590/1413-785220182606180607.
7. Shi Q, Sinden K, MacDermid JC, Walton D, Grewal R. A systematic review of prognostic factors for return to work following work-related traumatic hand injury. *J Hand Ther.* 2014;27(1):55-62. doi:10.1016/j.jht.2013.10.001.
8. Dias JJ, Garcia-Elias M. Hand injury costs. *Injury.* 2006;37(11):1071-1077. doi:10.1016/j.injury.2006.07.023.

9. Biswas D, Wysocki RW, Fernandez JJ, Cohen MS. Local and regional flaps for hand coverage. *J Hand Surg Am.* 2014;39(5):992-1004. doi:10.1016/j.jhsa.2013.09.027.
10. Kakar S. Digital Amputations. In: Wolfe, SW, Hotchkiss, RN, Pederson, WC, Kozin, SH, Cohen M, ed. *Green's Operative Hand Surgery.* 7th ed. Cambridge, MA: Elsevier; 2017:1709-1711.
11. Donaldson MR, Coldiron BM. Scars after second intention healing. *Facial Plast Surg.* 2012;28(5):497-503. doi:10.1055/s-0032-1325643.
12. Rousselle P, Braye F, Dayan G. Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;146:344-365. doi:10.1016/j.addr.2018.06.019.
13. Volksdorf T, Heilmann J, Eming SA, et al. Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Are Important for Cutaneous Wound Healing. *Am J Pathol.* 2017;187(6):1301-1312. doi:10.1016/j.ajpath.2017.02.006.
14. Lewis R, Whiting P, ter Riet G, O'Meara S, Glanville J. A rapid and systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of debriding agents in treating surgical wounds healing by secondary intention. *Health Technol Assess.* 2001;5(14):1-131. doi:10.3310/hta5140.
15. Ibrahim N 'Izzah, Wong SK, Mohamed IN, et al. Wound healing properties of selected natural products. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(11):2360. doi:10.3390/ijerph15112360.
16. Shedoeva A, Leavesley D, Upton Z, Fan C. Wound healing and the use of medicinal plants. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019;2019:2684108. doi:10.1155/2019/2684108.
17. Ministério da Saúde (BR). *Monografia da espécie Calendula officinalis L. (Calêndula).* Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/novembro/25/Vers--o-cp-Calendula.pdf>. Accessed August 16, 2021.

18. Fronza M, Heinzmann B, Hamburger M, Laufer S, Merfort I. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *J Ethnopharmacol*. 2009;126(3):463-467. doi:10.1016/j.jep.2009.09.014.
19. Patel S, Srivastava S, Singh MR, Singh D. Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing. *Int J Biol Macromol*. 2018;107(Pt B):1888-1897. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.056.
20. Agra LC, Ferro JNS, Barbosa FT, Barreto E. Triterpenes with healing activity: a systematic review. *J Dermatolog Treat*. 2015;26(5):465-470. doi:10.3109/09546634.2015.1021663.
21. Della Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar S, Isaac O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of Calendula officinalis flowers. *Planta Med*. 1994;60(6):516-520. doi:10.1055/s-2006-959562.
22. Zitterl-Eglseer K, Sosa S, Jurenitsch J, et al. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J Ethnopharmacol*. 1997;57(2):139-144. doi:10.1016/S0378-8741(97)00061-5.
23. Givol O, Kornhaber R, Visentin D, Cleary M, Haik J, Harats M. A systematic review of Calendula officinalis extract for wound healing. *Wound Repair Regen*. 2019;27(5):548-561. doi:10.1111/wrr.12737.
24. Buzzi M, de Freitas F, Winter MDB. Therapeutic effectiveness of a Calendula officinalis extract in venous leg ulcer healing. *J Wound Care*. 2016;25(12):732-739. doi:10.12968/jowc.2016.25.12.732.

25. Carvalho AR Jr, Diniz RM, Suarez MAM, et al. Use of some asteraceae plants for the treatment of wounds: from ethnopharmacological studies to scientific evidences. *Front Pharmacol*. 2018;9:784. doi:10.3389/fphar.2018.00784.
26. Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature*. 1962;193:293-294. doi:10.1038/193293a0.
27. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-746. doi:10.1056/NEJM199909023411006.
28. Rice J. Secondary intention wound healing--pathphysiology and management. *Collegian*. 2000;7(3):40-41. doi:10.1016/s1322-7696(08)60377-7.
29. Jones J. Winter's concept of moist wound healing: a review of the evidence and impact on clinical practice. *J Wound Care*. 2005;14(6):273-276. doi:10.12968/jowc.2005.14.6.26794.
30. Winter GD. Some factors affecting skin and wound healing. *J Tissue Viability*. 2006;16(2):20-23. doi:10.1016/s0965-206x(06)62006-8.
31. Ehrlich HP, Hunt TK. Collagen Organization Critical Role in Wound Contraction. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2012;1(1):3-9. doi:10.1089/wound.2011.0311.
32. Singh S, Young A, McNaught CE. The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*. 2017;35(9):473-477. doi:10.1016/j.mpsur.2017.06.004.
33. Shi J, Barakat M, Chen D, Chen L. Bicellular tight junctions and wound healing. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):3862. doi:10.3390/ijms19123862.
34. Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *Int J Inflamm*. 2019;2019:3706315. doi:10.1155/2019/3706315.
35. Zitelli JA. Secondary intention healing: an alternative to surgical repair. *Clin Dermatol*. 1984;2(3):92-106. doi:10.1016/0738-081x(84)90031-2.

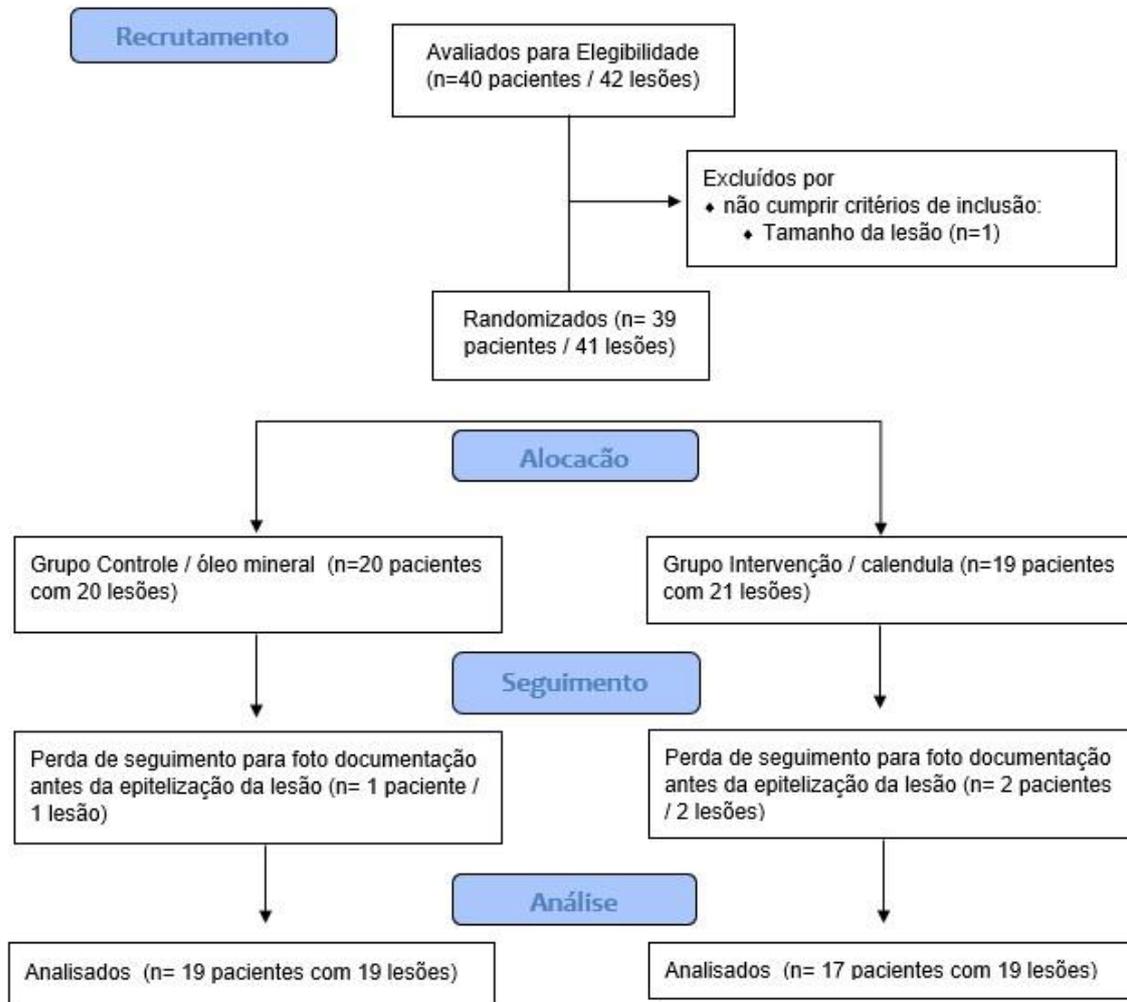
36. Cordoro KM, Russell MA. Minimally invasive options for cutaneous defects: secondary intention healing, partial closure, and skin grafts. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2005;13(2):215-230. doi:10.1016/j.fsc.2004.11.008.
37. Vermeulen H, Ubbink DT, Goossens A, de Vos R, Legemate DA. Systematic review of dressings and topical agents for surgical wounds healing by secondary intention. *Br J Surg.* 2005;92(6):665-672. doi:10.1002/bjs.5055.
38. Christenson LJ, Phillips PK, Weaver AL, Otley CC. Primary closure vs second-intention treatment of skin punch biopsy sites: a randomized trial. *Arch Dermatol.* 2005;141(9):1093-1099. doi:10.1001/archderm.141.9.1093
39. Bosley R, Leithauser L, Turner M, Gloster HM Jr. The efficacy of second-intention healing in the management of defects on the dorsal surface of the hands and fingers after Mohs micrographic surgery. *Dermatol Surg.* 2012;38(4):647-653. doi:10.1111/j.1524-4725.2011.02258.x.
40. Yang S, Park J, Lee H, et al. Sequential Change of Wound Calculated by Image Analysis Using a Color Patch Method during a Secondary Intention Healing. *PLoS One.* 2016;11(9):e0163092. doi:10.1371/journal.pone.0163092.
41. Chaby G, Senet P, Vaneau M, et al. Dressings for acute and chronic wounds: a systematic review. *Arch Dermatol.* 2007;143(10):1297-1304. doi:10.1001/archderm.143.10.1297.
42. Flanagan M. Wound measurement: can it help us to monitor progression to healing?. *J Wound Care.* 2003;12(5):189-194. doi:10.12968/jowc.2003.12.5.26493.
43. Khoo R, Jansen S. The Evolving Field of Wound Measurement Techniques: A Literature Review. *Wounds.* 2016;28(6):175-181. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27377609/>. Accessed September 15, 2021.

44. Aragón-Sánchez J, Quintana-Marrero Y, Aragón-Hernández C, Hernández-Herero MJ. ImageJ: A Free, Easy, and Reliable Method to Measure Leg Ulcers Using Digital Pictures. *Int J Low Extrem Wounds*. 2017;16(4):269-273.
doi:10.1177/1534734617744951
45. Knox KR, Datiashvili RO, Granick MS. Surgical wound bed preparation of chronic and acute wounds. *Clin Plast Surg*. 2007;34(4):633-641.
doi:10.1016/j.cps.2007.07.006.
46. Rivera AE, Spencer JM. Clinical aspects of full-thickness wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):39-48. doi:10.1016/j.clindermatol.2006.10.001.
47. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010;89(3):219-229. doi:10.1177/0022034509359125.
48. Okonkwo UA, DiPietro LA. Diabetes and wound angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7):1419. doi:10.3390/ijms18071419.
49. Parente LML, Lino Júnior RDS, Tresvenzol LMF, Vinaud MC, de Paula JR, Paulo NM. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula Officinalis* L. growing in Brazil. *Evi Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:375671. doi:10.1155/2012/375671
50. Neukirch H, D'Ambrosio M, Dalla Via J, Guerriero A. Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula officinalis* L. and characterisation of a new triterpenoid monoester. *Phytochem Anal*. 2004;15(1):30-35. doi:10.1002/pca.739.
51. Lania BG, Morari J, de Almeida AR, et al. Topical essential fatty acid oil on wounds: Local and systemic effects. *PLoS One*. 2019;14(1): e0210059.
doi:10.1371/journal.pone.0210059.

52. Hormozi M, Gholami M, Babaniazi A, Gharravi AM. Calendula officinalis stimulate proliferation of mouse embryonic fibroblasts via expression of growth factors TGF β 1 and bFGF. *Inflamm Regen.* 2019;39(1):1-7. doi:10.1186/s41232-019-0097-x.
53. Chanaj-Kaczmarek J, Paczkowska M, Osmalek T, et al. Hydrogel Delivery System Containing Calendulae flos Lyophilized Extract with Chitosan as a Supporting Strategy for Wound Healing Applications. *Pharmaceutics.* 2020;12(7):634. doi:10.3390/pharmaceutics12070634.
54. Kharat Z, Amiri Goushki M, Sarvian N, Asad S, Dehghan MM, Kabiri M. Chitosan/PEO nanofibers containing Calendula officinalis extract: Preparation, characterization, in vitro and in vivo evaluation for wound healing applications. *Int J Pharm.* 2021;609:121132. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.121132.
55. Santos TR, Quinino RC, Tavares R. Easy Sample Size Project (ESSP). Universidade Federal de Minas Gerais. <http://www.est.ufmg.br/~thiagords/ESSP.htm>. Published January 1, 2018. Accessed September 20, 2021.
56. ImageJ. Image Processing and Analysis in Java. <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>. Updated September 28, 2021. Accessed April 11, 2019.

ANEXO A - Diagrama de Fluxo*

*Diretrizes Equator Network



Treatment of acute wounds in hand with *Calendula officinalis* L.: A randomized trial

Giana Silveira Giostri ^a, Eduardo Murilo Novak ^a, and Luiz Cesar Guarita-Souza ^b

^aSchool of Medicine, Pontifical Catholic University of Parana (PUCPR), Hospital Universitario Cajuru, Curitiba, Brazil; ^bSchool of Medicine, Pontifical Catholic University of Parana (PUCPR), Institute of Biological and Health Sciences (CCBS), Curitiba, Brazil

ABSTRACT

Most injuries in the hand and fingers, especially on the digital pulps, are suited for healing by secondary intention. Nevertheless, delay in epithelization seems to unfavorably restrict this technique. The purpose of this controlled randomized clinical trial is to analyze by means of photo planimetry the progression of the healing process by secondary intention in acute wounds of the hand using the standardized extract of *Calendula officinalis* L. (SEC). The cohort of eligible participants included two groups of 20 patients with skin loss in the hand and fingers treated by secondary intention. Control group (CG) used mineral oil and intervention group (IG) received SEC. Wound pictures were captured at each outpatient assessment until epithelization was achieved and measured with ImageJ. Intervention group (IG) and control group (CG) with 19 wounds each, primarily formed by men in their 40's with wounds in their index and ring fingers on the left side, showed homogeneous variables and similar initial wound areas. Epithelization time was shorter and healing speed was faster in IG (IG = 8.6 ± 4.7 days and $9.5 \pm 5.8\%$ day versus CG = 13.2 ± 7.4 days and $6.2 \pm 2.9\%$ day, $p < 0.05$), leading to the conclusion that healing by secondary intention in acute wounds of the hand and fingers with SEC led to a faster epithelization.

ARTICLE HISTORY

Received 27 August 2021
Revised 5 October 2021
Accepted 10 October 2021

KEYWORDS

Wound healing; *Calendula officinalis*; finger injuries

Introduction

Injuries in the hand and wrist represent approximately 20% of all hospital emergencies, and 4 in each 10 cases correspond to finger injuries.¹⁻³ Many of these lesions involve loss of skin which demands healing by secondary intention. To find a procedure that speeds the re-epithelization process is of utmost importance, so patients can resume their professional and daily activities in the shortest possible time.⁴

Wound healing process is the result of complex interactions expressed in inflammation, repair and remodeling phases. Healing by secondary intention depends on the wound contraction by means of the centripetal movement of the normal skin.⁵ Proliferation, uniform migration and differentiation of keratinocytes depend on the adhesion between adjacent cells and the underlying surface regulated by tight junctional integral membrane proteins, such as claudins, occludin and junctional adhesion molecules, during the process of rebuilding the lost epidermis.⁶

The indication for secondary intention consists of the lack of exposure of the deep tissues (bone, vein, nerve, and tendon), which tend to pull the wound and lead to esthetic defects, contractures, and limitations of movements, especially close to the joint areas.⁵ Small and superficial skin loss or surfaces where healing by primary intention is incomplete may require healing by secondary intention as a plausible and successful alternative.^{5,7,8} Skin losses on hands and fingers are appropriate for this type of treatment. However, the unprecise and many times prolonged time for the epithelization of the wounds in the hand and fingers is an unfavorable aspect of the use of secondary healing.⁴

Calendula officinalis L., a plant of the Asteraceae family, popularly known as calendula, is used in several medicinal products and represents an important source of compounds that may serve as new and efficient products for the wound care.⁹ Extracts obtained from the calendula flower are rich in saponins, flavonoids, sesquiterpenes, alcohol, triterpenoids, hydroxycoumarin,

carotenoids, tannin, and essential oils, responsible for the antioxidative, anti-inflammatory, wound healing, antibacterial, antifungal, antiviral, antiedematous and immunomodulating factors.^{10,11} Faradiol monoesters (triterpenoids) are considered the main active components of the calendula's anti-inflammatory activity.¹² They can induce fibroplasia and angiogenesis and positively contribute to the wound healing processes *in vitro* and *in vivo*.^{13,14} In animal models, the use of *Calendula officinalis* L. in skin loss presents encouraging results in histopathological analysis of wounds, such as angiogenesis stimulation and increase of hydroxyproline and hexosamine, which impact the formation of collagen and the decrease of epithelization time when compared with the control group.¹⁵ Similarly, good results in the use of calendula extracts have been reported in the management of complicated and chronic wounds, such as the ones resulting from venous, pressure and diabetic ulcers, due to its initial anti-inflammatory property and positive interference in the collagen synthesis.^{9,15,16} Nevertheless, the authors could not identify in the researched studies the use of the calendula extract in clinical trials of traumatic skin loss of the hand and fingers treated with healing by secondary intention. Hence, the question that is raised is whether, according to its potential wound healing properties, *Calendula officinalis* L. can accelerate the epithelization of acute wounds and promote the prompt return of the functional activities of the hand.

Based on these considerations, the objective of this controlled randomized clinical study is to analyze the progression and speed of the healing process by secondary intention in acute wounds of the hand and fingers by using the standardized extract of *Calendula officinalis* L. (SEC), assessed by photoplanimetry.

Material and methods

Recruitment

Control and intervention groups were formed by patients seen at the emergency room of the School Hospital who presented acute trauma in the hand and fingers, mainly with skin loss or wounds in which primary healing was not possible. Each group was composed of 20 patients, under the age of 18, presenting acute wounds smaller than 10 cm² in the hand and fingers, whose treatment by the

emergency physician was defined as secondary intention healing. Randomization was performed by using sealed envelopes in the first outpatient evaluation under the supervision of one of the authors.

Wounds in more than one finger of the same patient were included. Exclusion criteria consisted of wounds with exposed bones, nerves or tendons, lack of adherence to treatment evidenced by inappropriate wound cleansing, clinical signals of wound infection, adverse reaction to prescribed medication, absence of signed informed consent or treatment withdrawal. Patients' data about diabetes control and smoking were also considered. The research was approved by the Committee of Ethics and Research (number: 28118614.3.0000.0020) and registered at ReBEC (Brazilian Registry of Clinical Trials) RBR-3sg8mbc.

Products

In the intervention group, 2% standardized extract of *Calendula officinalis* L. (SEC) was used twice a day, prepared by state-licensed compounding pharmacies, according to the legal criteria of the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA). This product is extracted from the flowers of *Calendula officinalis* L. (Plenusdermax[®]/Phytoplenus Bioativos S.A.), using specific extractors (polyethylene glycol hydroxytoluene, paraben, ethanol) under controlled pressure, frequency, and temperature. Mineral oil (Farmacêutica Cearense Ltda Chemical Industry) routinely provided by our institution, was used as control product¹⁷ and, like SEC, provides hydration to the wound and prevents trans-epidermal fluid loss during the epithelization process.¹⁸

In both groups, patients and their families received oral and written instructions about the daily sequence of wound management, the drying of the wound edges with paper towel, and product application. Similar dispensers were used for both products delivered to patients. After the sprinkling of the product on the wound, they were recommended to wait for natural drying and apply conventional dressing (dry gauze and bandage). These recommendations were verified and photographed at each outpatient consultation until complete epithelization was achieved. We have considered a fully epithelialized wound as the one that appears firm and granular and presented no granulation tissue.¹⁹ As exemplified in Figure 1, the epithelialized tissue presents a pearl pink color like an opaque and frosted finish.



Figure 1. Final stage of wound healing by second intention in the index finger. (a): Exemplifies an area in process of epithelization that keeps a central small granulation area (b): Close detail of the small granulation zone measured with ImageJ software. In black, the outline of the margins between the granulation process and the area already epithelized. The measurement of this granulation area was the one used for statistical calculations (c): Epithelized wound.

Planimetry

Disposable stickers with a uniform area (176.7145 mm^2) and a different color for each group were used as a gauge for further measurement of the wounds, which were photographed with an 8-megapixel digital camera (Canon, Powershot SX20is). About ten pictures were taken perpendicular to the wounds, in a 90° angle, approximately 50 cm far, and close attention was paid to the formation of shades, variation of lighting and focus. Both researchers that assessed the wounds advised the patients about daily care in the use of products, and those who took the pictures maintained confidentiality about the identification of groups.

The wound planimetry phase was performed by the main researcher, who was blinded about the correspondence between the gauge color used in the photodocumentation, the intervention and control. Image J (National Institute of Health/USA)²⁰ software was used to measure the wound areas. Recommendations by Aragón-Sánchez et al were used to standardize the outline of the wounds and their measurements.²¹ To measure the delimited area between the epithelized or dry necrosed margins and the granulation or wet necrosed area in the wounds, images obtained from each outpatient evaluation were used. These images were amplified using the same software program to obtain better delimitation of the areas. Three readings of the gauge and the wound areas were performed from the images captured in each one of the days during the healing process by secondary intention. The mean value of the three readings in Mega Pixels was transformed into square millimeter. The

planimetry of the wound performed each day during the outpatient assessment enabled the calculation of the daily contraction of the wound and its healing speed.

The wound contract (WC_d), expressed in mm^2/day , was measured as the difference between the initial area (iA) and the final area (fA) in mm^2 , divided by the time in days, considering the photo documentation of the initial area and of the last one before epithelization, as shown in the expression below:

$$WC_d = \frac{(iA - fA)}{\text{Time}}$$

Healing speed (HS%_d), expressed in daily percentage, represents epithelization rate, and was calculated considering the interval between the initial and final area and the time used to capture the images, as expressed below:

$$HS_{\%d} = \frac{\left(100 * \frac{(iA - fA)}{iA}\right)}{\text{Time}}$$

Statistical analysis

IBM SPSS Statistics v.20.0 (Armonk, NY: IBM Corp.) was used for statistical calculations and $p < .05$ values were considered statistically significant. The results of the quantitative variables were expressed by the mean, standard deviation and interquartile interval, and the qualitative variables were described by frequencies and percentages. The last photo documented area before complete epithelization was

considered the final one as the final time was the day of the last picture taken before the healing (Figure 1 (c)). The comparison between the groups (control and intervention) in relation to the quantitative variables age and healing speed was performed using Student's t test for independent samples with equal variances not assumed (Levene's test). Non-parametric Mann-Whitney U test was used to analyze the other quantitative variables – initial and final areas of the wounds, number, and interval between the collection of photo documentation, treatment time by secondary intention and contraction of wounds, due to the lack of normality of these variables. Normality was evaluated with the Shapiro-Wilk test. Comparison between the groups in relation to categorical variables was performed using either Fisher's exact test or Chi-Square Test.

The relationship between the treatment effect within the groups and the healing speed was achieved using a simple linear regression model, considering the group treatment as the explanatory variable. In further analysis, the multivariate model was adjusted, including the covariables gender, age, diabetes, and smoking.

The time elapsed until the observation of the last area before epithelization (outcome) was described by Kaplan-Meier curves. Logrank test was used to compare the curves defined by the control and intervention groups.

Results

The 40 randomized patients of both groups totalized 40 wounds, 22 in the intervention group (IG), which used standardized extract of *Calendula Officinalis* L. (SEC), and 20 in the control group (CG), treated with mineral oil. After the measurement of the initial wound with the ImageJ software, patients of the IG with wounds larger than 1000 mm² were excluded. Three wounds were excluded for not presenting previous measures of epithelization (2 wounds from the IG and 1 from the CG), that is, in the second outpatient visit epithelization was already present, preventing the accurate measurement of the area before epithelization and determination of the wound healing speed. Hence, the study cohort consisted of 17 patients with 19 IG wounds and 19 CG wounds. Table 1 shows the distribution of the variables in both groups. No significant

differences were observed in the distribution of the control and intervention groups for the variables age, gender, diabetes, and smoking (Table 1).

The distribution of the wounds in the groups regarding wound location and laterality is shown in Table 2. In the CG, 31.6% of the patients suffered injuries on their way to or during their paid work. Similar proportion was observed in the IG (35.3% of the patients).

Table 3 shows the analysis of the quantitative variables related to the 19 trauma wounds of each group. Considering the initial and final area of the wounds and the interval between the days for outpatient wound assessments and capturing of photographs (sampling interval) there was no difference between the groups. Epithelialization time and number of samplings were significantly lower in IG ($p = 0.046$ and $p = 0.018$, respectively) and healing speed was higher ($p = .036$).

The result of the univariate linear regression model for the healing speed (Table 4 – model 1) indicated that there was a significant association between the treatment groups and the healing speed ($p = 0.033$). The attained angular coefficient

Table 1. Comparison of groups in relation to age and categorical variables (gender, presence of diabetes and smoking)

| Variable | Classification | Group | | p* |
|--------------|----------------|--------------------------|-------------------------------|-------|
| | | Control (19 patients) | Intervention (17 patients) | |
| Age (years) | Mean ± SD | 43,4 ± 20.3 | 41.2 ± 18.2 | 0.736 |
| | Median (IQR) | 40 (42) | 35 (33.5) | |
| Gender (%) | Female | 26.3 | 17.6 | 0.695 |
| | Male | 73.7 | 82.4 | |
| Diabetes (%) | No | 89.5 | 94.1 | 1 |
| | Yes | 10.5 | 5.9 | |
| Smoking (%) | No | 84.2 | 76.5 | 0.684 |
| | Yes | 15.8 | 23.5 | |

*Student's t test for independent variables (age); Fisher's exact test or Chi-Square test (categorical variables); $p < .05$; SD: standard deviation; IQR: interquartile range.

Table 2. Distribution of wounds of the control and intervention groups, in relation to the wound location and laterality.

| Location | Control Group 19 lesions | | Intervention Group 19 lesions | |
|------------------------|-----------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|
| | right side | left side | right side | left side |
| 1 st finger | 2 | 2 | 1 | 2 |
| 2 nd finger | 1 | 3 | 3 | 2 |
| 3 rd finger | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 4 th finger | 2 | 3 | 2 | 2 |
| 5 th finger | 0 | 2 | 1 | 2 |
| Palm (N = 3) | 1 | 1 | 0 | 1 |

Table 3. Quantitative variables of the 19 wounds in each group (control and intervention).

| VARIABLE | Control Group n = 19 | | Intervention Group n = 19 | | p* Value |
|--------------------------------|----------------------|---------------|---------------------------|---------------|----------|
| | Mean ± SD | Median (IQR) | Mean ± SD | Median (IQR) | |
| Initial Wound Area mm2 | 182.3 ± 183.5 | 146.2 (120.9) | 171.3 ± 121.2 | 153.7 (117.1) | 0.686 |
| Number of Samplings | 4.4 ± 1.8 | 4 (2) | 3.1 ± 1.3 | 3 (2) | 0.018 |
| Sampling Interval mean of days | 4.1 ± 1.9 | 3.5 (0.8) | 4.2 ± 1.6 | 3.5 (0.5) | 0.931 |
| Final Area** mm2 | 41 ± 40.6 | 28.7 (51,1) | 64.2 ± 72.3 | 37.2 (64.7) | 0.311 |
| Time days | 13.2 ± 7.4 | 11 (14) | 8.6 ± 4.7 | 7 (7) | 0.046 |
| Wound Contraction mm2/day | 12.5 ± 18.5 | 7 (9.3) | 13.8 ± 8.9 | 8.8 (14.3) | 0.103 |
| Healing Speed % day | 6.2 ± 2.9 | 6.2 (3.9) | 9.5 ± 5.8 | 6.9 (9.3) | 0.036 |

SD: standard deviation; IQR: interquartile range. * p value in Student's t test for independent variables or in non-parametric Mann-Whitney test. **Final area was the last assessment before the wound epithelization.

of 3.33 indicates that the healing speed in the intervention group is 3.33 percentage points per day faster when compared to the control group.

No changes in the treatment effects were observed when covariables such as gender, age, diabetes, and smoking were added to this regression model, that is, the healing speed remained significantly faster in the intervention group ($p = 0.048$; angular coefficient = 3.20). (Table 4 – model 2)

Figure 2 demonstrates the Kaplan Meier curves using as parameters the proportion of epithelialized wounds in the groups related to time in days. The outcome was the observation of the final area (last area photographed before epithelialization of the wounds). A significant difference was observed between the curves of the two groups in the long-rank test ($p = 0.02$). Epithelialization time was shorter in the intervention group when compared to the control group.

Figure 3 exemplifies the clinical evolution of patients in the intervention group.

Discussion

This randomized clinical trial analyzed the evolution of the healing process by secondary intention in hand and finger wounds. By means of image planimetry, it was possible to verify the progressive decrease in the wound area by comparing the healing speed reported in the study groups. The aspect raised by the authors was the necessary acceleration of the process, mainly in the hand and finger wounds, relevant for the performance of most daily activities. The similarity of the samples in both groups enabled the authors to identify a shorter epithelization time and faster healing speed in the intervention group (Table 3).

It should be pointed out that few articles report the secondary intention healing process in acute wounds, although it is a common practice among surgeons who recommend it for the treatment of superficial wounds. Much of what we found in the literature referred to the treatment of acute wounds in experimental studies^{17,22,23} and in

Table 4. Models of Linear Regression.

| | Explanatory Variable | p | Estimated Coefficient | CI 95% |
|---------|----------------------|-------|-----------------------|------------|
| Model 1 | Treatment in group | 0.033 | 3.33 | 0.27–6.38 |
| Model 2 | Treatment in group | 0.048 | 3.20 | 0.02–6.37 |
| | Gender | 0.325 | 1.90 | –1.98–5.78 |
| | Age | 0.700 | –0.02 | –0.10–0.07 |
| | Diabetes | 0.907 | 0.35 | –5.67–6.36 |
| | Smoking | 0.257 | –2.35 | –6.50–1.79 |

Model 1: Univariate analysis, considering the dependent variable as the healing speed (% day) and the treatment in groups as the explanatory variable. The healing speed in the intervention was 3.33 percentage points higher than the one in the control group

Model 2: Multivariate analysis, including as co-variables: gender, age, presence of diabetes and smoking. Healing speed remained faster in the intervention group, $p = 0,048$, regardless of the inclusion of the covariables.

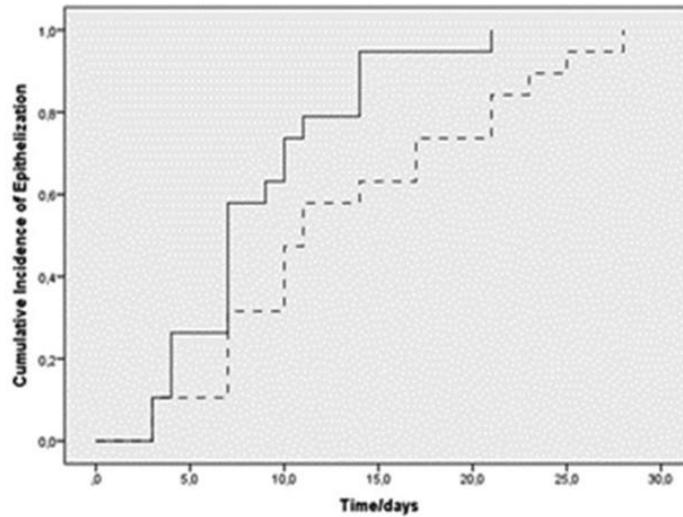


Figure 2. Kaplan Meier curve: Evolution of epithelialization in groups. The curves demonstrate the cumulative proportion of wounds that epithelialized over time. Solid line represents intervention group and dotted line represents control group. Logrank test $p = 0.02$.



Figure 3. Intervention group clinical evolution. (a): Shows initial area of 418.1 mm². (b): Clinical aspect at 7 days. (c): Epithelialization at 14 days. Male, 23 years old.

resection of skin tumors.^{24–26} A study by Bosley et al about skin loss on the dorsal part of the hand and fingers in 48 patients who underwent resection of squamous cell carcinoma, between 0.8 and 6 cm, reports excellent results based on functional ability, sensitivity and esthetics after 10 months of healing by secondary intention.⁸ They stress out that healing by secondary intention is an effective

option in the repair of skin losses in the hand and fingers, simplifies wound care procedures, minimizes complex surgical techniques, and reduces treatment costs. Similarly, Ehrlich and Hunt in their thorough review on wound contraction mechanism conclude that a faster secondary intention process would avoid discomfort and secondary defects caused by skin grafting.⁵

Additionally, as reported by Dias and Garcia Elias, outpatient procedures with shorter hospitalization time help decrease direct and indirect costs for the treatment of wounds in the hand.²⁷ There are reports of good results from the use of secondary intention in acute wounds without exposure of deep tissues, superior to skin grafting, especially in tip amputations. Kakar cited that wound with skin loss progress in the process of granulation and epithelialization by secondary intention with complete return of sensitivity and discrimination between two points, providing better results when compared to the use of surgical skin grafts.⁴

Importance should be given to recent studies on the role of tight junction (TJ) proteins in the wound healing process. Knockdown experiments in primary human keratinocytes revealed delayed migration and reduced proliferation due to the decreased expression of claudins.⁶ The authors concluded that the effects caused by changes in the location and expression of claudin-1 and occludin KD in human keratinocytes may be an important feature in the pathogenesis of non-healing wounds. Although TJ proteins are expressed by epithelial cells at wound edges and regulate signal transduction, modulate cellular processes and also interfere on the immune response and homeostasis, little is known about the complete action of TJ proteins in the healing process. TJs may be more essential to wound remodeling than early healing stages. Shi et al raised several questions about the role of TJs in the different phases of wound healing and the way in which the expression of TJ proteins impacts the inflammatory response in healing and in non-healing wounds.²⁸

Calendula officinalis L. was selected to be used in this study as it is known for accelerating epithelialization and offering advantages during the healing process.^{13,14,29} Variation in the composition and concentration of the plant extract make it difficult to compare the effect of *Calendula officinalis* L. in wound healing *in vivo*.^{9,15} Givol et al, in their five studies with animals and a randomized clinical trial with episiotomy wounds stated that healing of acute wounds was faster at the inflammation stage with the increase in the production of granulation tissue in the groups treated with calendula extract, most of them ethanolic with no specifications about its composition. In chronic wounds, they reported variable results with the use of calendula extract, in

general. However, the lack of specifications regarding its composition and concentration may have influenced the results.¹⁵ The authors also mention the use of the standardized extract of *Calendula officinalis* L. of this study in a clinical trial which reports a significant decrease in the wound area when compared to the control group for the treatment of venous ulcers.¹⁶ The option for the use of the SEC in this research study, in glycolic and non-ethanol vehicle, may be accounted for by the higher security in obtaining the plant bioactive compounds and in the topical use of the product, due to its humectant properties for the skin. Conversely, the ethanolic extract tends to dehydrate the wounded tissue and cause discomfort when applied.

Kharat et al, studying infection as a barrier to wound healing added *Calendula officinalis* L. to chitosan/polyethylene oxide (CS/PEO) scaffolds by electrospinning. They observed an improvement in the mechanical properties of CS/PEO nanofibers and a significant reduction in Gram positive and negative bacteria (96% and 94%, respectively). The authors reported *in vitro* studies of fibroblast cells using CS/PEO loaded with *Calendula officinalis* L. that resulted in increased proliferation, growth and cell adhesion. Moreover, histological analysis of acute wounds in rats showed that CS/PEO/*Calendula officinalis* L. dressings acted positively in collagen synthesis, epithelialization and tissue remodeling resulting in excellent wound healing.³⁰

Few studies report the healing speed of acute wounds until the epithelialization phase. Some articles address the importance to measure the wound areas mainly when referring to wound chronicity. Flanagan, in a narrative review, suggested that the most efficient way to monitor healing is by calculating the reduction in the percentage of the wound area over time, mainly in the first weeks, which will provide the early identification of the factors that could delay it.³¹ Khoo & Jansen also emphasize the importance of the decrease in the wound area between 20% and 40% in the first weeks as predictors of healing.³² They also suggest that larger than 10 cm² areas tend to be distorted in the captured images for computer program analysis, the reason why we have limited the inclusion of larger wounds in our study.^{31,32} One factor that can lead to some difficulties in the measurements was the date of the

patient's last assessment that would not always match with the precise time of the epithelialization evidence. Therefore, in our study we used the measurement of the area and time of the last outpatient appointment before verifying the epithelialized wound.

It is also noteworthy that the total number of samplings was significantly lower in the intervention group, due to the shorter time of epithelialization in these lesions. We also emphasize that acute and uncomplicated wounds tend to heal by second intention, evolving to granulation, contraction and epidermal migration in a progressive and expected way,^{5,31} resulting in equivalent wound contraction in both groups. (Table 3)

In this randomized clinical trial, both groups were mostly made up of men in their forties. The majority answered "no" to the use of drugs for the control of diabetes (CG: 89.5%, IG: 94.1%) and almost one fourth reported daily use of cigarettes (CG: 15.8%, IG: 23.5%) (Table 1). DiPietro, as a coauthor in narrative reviews, suggested that local and systemic factors interfere in the wound healing process, both acute and chronic.^{33,34} Oxygenation, infection, presence of foreign bodies and venous insufficiency are some of the referred local factors. We also point out diabetes and smoking among the systemic factors that may affect the healing of skin wounds, leading to complications such as infection and chronicity. There was no difference in the healing speed of the patients with diabetes or smoking habit in our study, verified in the multivariate regression model (Table 4). The healing speed in the intervention group (SEC) remained faster regardless of the inclusion of variables such as diabetes, smoking and even age or gender (Table 4). Indexes that grade the severity of diabetes and daily smoking of our patients were not measured, representing one of the limitations of our study. We also refer to the limitations of the wound measurement techniques and the examiner-dependent effect variations, although minimized by the previous training performed by the main author of this research.

Despite the promising results reported in this study and the limited knowledge available about the interference of TJ proteins in wound healing, further studies on the standard extract of *Calendula*

officinalis L. are recommended, mainly to explore its role in barrier function and interactions between epithelial cells during the wound healing process.

Acknowledgments

The authors would like to express their deep gratitude to Nurse Practitioner Franciele de Freitas for her assistance with data collection.

We also are very grateful to Prof. Marcia Olandoski for sharing her knowledge and help with data and statistical analysis.

We thank Prof. Areta Ulhana Galat, Master of Arts in Teaching of English as a Second Language of University of Illinois, Urbana-Champaign, for language editing.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

The author(s) reported there is no funding associated with the work featured in this article.

ORCID

Giana Silveira Giostri  <http://orcid.org/0000-0001-9184-3828>

Eduardo Murilo Novak  <http://orcid.org/0000-0002-2480-0737>

Luiz Cesar Guarita-Souza  <http://orcid.org/0000-0003-2781-9705>

Data availability statement

The data that support the findings of this study are openly available in ReBEC (Brazilian Registration Platform of Clinical Trials) at <https://ensaiosclinicos.gov.br/>, reference number RBR-3sg8mbc.

Authors' contributions

GSG: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Software, Validation, Writing- Original draft preparation; EMN: Data curation, Visualization, Investigation Writing- Reviewing and Editing; LCGS: Writing- Reviewing and Editing, Supervision

References

- Ootes D, Lambers KT, Ring DC. The epidemiology of upper extremity injuries to the ED in the USA. *Hand*. 2012;7:18–22. doi:10.1007/s11552-011-9383-z.
- de Jong JP, Nguyen JT, Sonnema AJM, Nguyen EC, Amadio PC, Moran SL. The incidence of acute traumatic tendon injuries in the hand and wrist: a 10-year population-based study. *Clin Orthop Surg*. 2014;6:196–202. doi:10.4055/cios.2014.6.2.196.
- Ribak S, de Oliveira EJM, Rosolino GP, Neto PO, Tietzmann A. Epidemiology of traumatic injuries of the upper limbs in a university hospital. *Acta Ortopedica Bras*. 2018;26:370–373. doi:10.1590/1413-785220182606180607.
- Kakar S. Digital Amputations. In: Wolfe SW, Hotchkiss RN, Pederson WC, Kozin SH, Cohen M editors. *Green's operative hand surgery*. Elsevier; 2017. p. 1709–1711.
- Ehrlich HP, Hunt TK. Collagen organization critical role in wound contraction. *Adv Wound Care*. 2012;1:3–9. doi:10.1089/wound.2011.0311.
- Volkendorf T, Heilmann J, Eming SA, Schawjinski K, Zorn-Kruppa M, Ueck C, Vidal-y-sy S, Windhorst S, Jücker M, Moll I, et al. Tight junction proteins claudin-1 and occludin are important for cutaneous wound healing. *Am J Pathol* [Internet] 2017; 187:1301–1312. Available from: .; doi:10.1016/j.ajpath.2017.02.006.
- Rivera AE, Spencer JM. Clinical aspects of full-thickness wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25:39–48. doi:10.1016/j.clindermatol.2006.10.001.
- Bosley R, Leithauser L, Turner M, Gloster HM. The efficacy of second-intention healing in the management of defects on the dorsal surface of the hands and fingers after Mohs micrographic surgery. *Dermatologic Surg*. 2012;38:647–653. doi:10.1111/j.1524-4725.2011.02258.x.
- Carvalho AR, Diniz RM, Suarez MAM, Figueiredo CSSS, Zagnignan A, Grisotto MAG, Fernandes ES, Da Silva LCN. Use of some asteraceae plants for the treatment of wounds: from ethnopharmacological studies to scientific evidences. *Front Pharmacol*. 2018;9:1–11. doi:10.3389/fphar.2018.00784.
- Zitterl-Eglseer K, Sosa S, Jurenitsch J, Schubert-Zsilavec M, della Loggia R, Tubaro A, Bertoldi M, Franz C. Anti-oedematous activities of the main triterpenoid esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J Ethnopharmacol*. 1997;57:139–144. doi:10.1016/S0378-8741(97)00061-5.
- Shedoeva A, Leavesley D, Upton Z, Fan C. Wound healing and the use of medicinal plants. *Evidence Based Complementary Altern Med*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/2684108.
- Hamburger M, Adler S, Baumann D, Förg A, Weinreich B. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia*. 2003;74:328–338. doi:10.1016/S0367-326X(03)00051-0.
- Fronza M, Heinzmann B, Hamburger M, Laufer S, Merfort I. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *J Ethnopharmacol*. 2009;126:463–467. doi:10.1016/j.jep.2009.09.014.
- Parente LML, Lino Júnior RDS, Tresvenzol LMF, Vinaud MC, De Paula JR, Paulo NM. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evidence Based Complementary Altern Med*. 2012;2012. https://doi.org/10.1155/2012/375671.
- Givol O, Kornhaber R, Visentin D, Cleary M, Haik J, Harats M. A systematic review of *Calendula officinalis* extract for wound healing. *Wound Repair Regener*. 2019;27:548–561. https://doi.org/10.1111/wrr.12737.
- Buzzi M, Freitas F de Winter MDB, Doctor M, Bioativos SA. Therapeutic effectiveness of a *Calendula officinalis* extract in venous leg ulcer healing. *J Wound Care*. 2016;25:732–739. doi:10.12968/jowc.2016.25.12.732.
- Lania BG, Morari J, de Almeida AR, Da Silva MN, Vieira-Damiani G, de Almeida Lins K, César CL, Velloso LA, Maia NB, Cintra ML, et al. Topical essential fatty acid oil on wounds: local and systemic effects. *Plos one*. 2019;14:1–15. doi:10.1371/journal.pone.0210059.
- Jones J. Winter's concept of moist wound healing: a review of the evidence and impact on clinical practice. *J Wound Care*. 2005;14:273–276. doi:10.12968/jowc.2005.14.6.26794.
- Rice J. Secondary intention wound healing - pathophysiology and Management. *Collegian*. 2000;7:40–41. doi:10.1016/S1322-7696(08)60377-7.
- Rasband W. ImageJ [Internet]. Available from: <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>, accessed on April 11, 2019.
- Aragón-Sánchez J, Quintana-Marrero Y, Aragón-Hernández C, Hernández-Herero MJ. ImageJ: a free, easy, and reliable method to measure leg ulcers using digital pictures. *Int J Lower Extremity Wounds*. 2017;16:269–273. doi:10.1177/1534734617744951.
- Winter George D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nat Int J Sci*. 1962;193:293–294. doi:10.1038/193293a0.
- Kataria K, Gupta A, Rath G, Mathur RB, Dhakate SR. In vivo wound healing performance of drug loaded electrospun composite nanofibers transdermal patch. *Int J Pharm* [Internet] 2014; 469:102–110. Available from: .; doi:10.1016/j.ijpharm.2014.04.047.
- Zitelli JA. Secondary intention healing: an alternative to surgical repair. *Clin Dermatol*. 1984;2:92–106. doi:10.16/0738-081x(84)90031-2.
- Christenson LJ, Phillips PK, Weaver AL, Otley CC. Primary closure vs second-intention treatment of skin punch biopsy sites: a randomized trial. *Arch Dermatol*. 2005;141:1093–1099. doi:10.1001/archderm.141.9.1093.

26. Donaldson M, Coldiron B. Scars after second intention healing. *Facial Plast Surg.* 2012;28:497–503. doi:10.1055/s-0032-1325643.
27. Dias JJ, Garcia-Elias M. Hand injury costs. *Injury.* 2006;37:1071–1077. doi:10.1016/j.injury.2006.07.023.
28. Shi J, Barakat M, Chen D, Chen L. Bicellular tight junctions and wound healing. *Int J Mol Sci.* 2018;19:1–20. doi:10.3390/ijms19123862.
29. Patel S, Srivastava S, Singh MR, Singh D. Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing. *Int J Biol Macromol [Internet]* 2018; 107:1888–1897. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.056.
30. Kharat Z, Amiri Goushki M, Sarvian N, Asad S, Mehdi Dehghan M, Kabiri M. Chitosan/PEO nanofibers containing *Calendula officinalis* extract: preparation, characterization, in vitro and in vivo evaluation for wound healing applications. *Int J Pharm [Internet]* 2021; 121132. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517321009388>
31. Flanagan M. Wound measurement: can it help us to monitor progression to healing? *J Wound Care.* 2003 May;12(5):12. doi:10.12968/jowc.2003.12.5.26493.
32. Khoo R. The evolving field of wound measurement techniques: a literature review. *Wounds.* 2016 Jun;28(6):175–181. PMID: 27377609.
33. Guo S, DiPietro LA. Critical review in oral biology & medicine: factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89:219–229. doi:10.1177/0022034509359125.
34. Okonkwo UA, Dipietro LA. Diabetes and wound angiogenesis. *Int J Mol Sci.* 2017;18:1–15. doi:10.3390/ijms18071419.