

JÉSSICA GUIDO DE ARAÚJO

DESENVOLVIMENTO DE CREME DE
RHIZOPHORA MANGLE L.: AVALIAÇÃO
DO POTENCIAL CICATRIZANTE EM
FERIDAS CUTÂNEAS

Recife

2015

JÉSSICA GUIDO DE ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO DE CREME DE
RHIZOPHORA MANGLE L.: AVALIAÇÃO
DO POTENCIAL CICATRIZANTE EM
FERIDAS CUTÂNEAS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jeymesson R. C. Vieira

Co-orientadora: Profa. Dra. Ivone A. de Souza

Recife

2015

A663d Araújo, Jéssica Guido de.
Desenvolvimento de creme de *Rhizophora mangle* L: avaliação do potencial cicatrizante em feridas cutâneas / Jéssica Guido de Araújo. – 2015.
132 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Jeymesson R. C. Vieira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Recife, 2015.
Inclui referências e anexos.

1. *Rhizophora mangle*. 2. Mangue vermelho. 3. Citotoxicidade. 4. Cicatrização de feridas. 5. Metabólitos secundários. I. Vieira, Jeymesson R. C. (Orientador). II. Título.

610 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-242)

JÉSSICA GUIDO DE ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO DE CREME DE *RHIZOPHORA MANGLE* L.: AVALIAÇÃO
DO POTENCIAL CICATRIZANTE EM FERIDAS CUTÂNEAS**

Dissertação ou Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para
a obtenção do título de MESTRE em
CIÊNCIAS DA SAÚDE.

Aprovada em: 05/08/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Simone Cristina Soares Brandão (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Matilde Campos Carréra (Examinador Externo)
Faculdade Pernambucana de Saúde – IMIP

Prof^a. Dr^a. Paloma Lys de Medeiros (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. Frederico Jorge Ribeiro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

CIÊNCIAS DA SAÚDE

COORDENADOR

Prof. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

VICE-COORDENADOR

Prof. Brivaldo Marckman Filho

CORPO DOCENTE

Prof^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Prof^a. Ângela Luiza Pinto Duarte

Prof^o. Ary Gomes Filho

Prof^o Brivaldo Marckman Filho

Prof^o. Bruno Severo Gomes

Prof^a. Cláudia Diniz Lopes Neto

Prof^o. Décio Medeiros Peixoto

Prof^o. Dinaldo Cavalcanti de Oliveira

Prof^o Edgar Guimarães Victor

Prof^o Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Prof^o. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

Prof^a. Emília Chagas Costa

Prof^a Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof^o. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

Prof^o José Ângelo Rizzo

Prof^a. Lucila Maria Valente

Prof^o Lucio Villar Rabelo Filho

Prof^o. Marcelo Renato Guerino

Prof^o. Marcelo Tavares Viana

Prof^o. Paulo Sérgio Ramos Araújo

Prof^a Patrícia Érika de Melo Marinho

Prof^a. Romualda Castro do Rêgo Barros

Prof^o. Sandro Gonçalves de Lima

Prof^o. Simone Cristina Soares Brandão

*À minha mãe, Glória Ruth, que sempre
me ensinou a ir em busca dos meus sonhos*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre ao meu lado na vida.

À minha mãe, Glória Ruth, e aos meus irmãos, Carlos Guido e Adolpho Guido, por serem meu alicerce e por me amarem e apoiarem em todos meus projetos durante toda minha vida. Ao meu pai, Carlos Alberto, que mesmo na sua ausência física, seus exemplos foram importantes para a minha construção.

Ao meu noivo, Eliaquim Sá, por todo amor, carinho e companherismo em todas as etapas do mestrado e da vida. Seu apoio nas etapas informatizadas foi muito importante.

Ao meu orientador, prof. Dr. Jeymesson Vieira, pela amizade, confiança e disponibilidade em todas as etapas deste trabalho. Sua ajuda e seus ensinamentos foram fundamentais.

À minha co-orientadora, profa. Dra. Ivone Souza, pelo seu exemplo profissional e dedicação à UFPE e ensinamentos nesse trabalho.

Ao grupo da pesquisa, Carolina Igrejas e Marllon Nascimento, por dividir anseios e pelas ajudas tão importantes. Agradeço também Mariana Barbosa, Pedro Marcelino, Jefferson Lima, Erwelly Barros e Tiago Fernandes pela disponibilidade em ajudar.

A toda equipe de professores do mestrado do CCS, e pela oportunidade de ter aprendido com cada um de vocês. E agradeço carinhosamente também a Esmeralda e Cybelli Graciliano pelo apoio.

Aos amigos do mestrado, porque além do conhecimento, levarei a amizade de vocês também.

E, finalmente, a todos os professores, preceptores, estagiários, alunos, residentes e funcionários dos laboratórios da UFPE e da Dermatologia para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

Rhizophora mangle L. é a espécie arbórea mais frequente no mangue brasileiro e tem intenso uso popular no tratamento de doenças mucocutâneas. A fim de fornecer base científica para sua utilização, este estudo teve por objetivos avaliar a atividade cicatrizante de creme de extrato aquoso de folha de *Rhizophora mangle* L. em ratos *Wistar*, e investigar a ação citotóxica e o perfil fitoquímico dos extratos aquosos das folhas, caule e raiz de *R. mangle*. O screening fitoquímico dos extratos aquosos de folhas, caule e raiz da planta foi realizado a partir da identificação dos compostos majoritários. Realizou-se a investigação da citotoxicidade dos extratos das três partes da planta, com concentrações de 100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 e 0,00001 µg/mL frente as células Hela (10^4 células/mL), e como controle utilizou-se o Dimetilsulfóxido (0,1%). Para avaliação da atividade cicatrizante do creme de extrato aquoso foram utilizados 45 ratos *Wistar*, fêmeas, submetidos à indução de ferida cirúrgica e divididos em 3 grupos (controle negativo, padrão e tratado). Cada grupo recebeu, respectivamente, aplicação de soro fisiológico a 0,9%, dexpanthenol a 5% em creme e extrato aquoso da folha da *R. mangle* a 5% em creme, e foram acompanhado até o 5º, 10º e 15º dia de pós-operatório para avaliação dos aspectos macroscópicos das feridas e avaliações morfométrica e histomorfométrica. O grupo tratado apresentou feridas uniformes e sem infecção, quando comparado aos outros dois grupos, porém a análise morfométrica não mostrou no 15º dia diferença estatística entre os grupos devido ao formato retangular da ferida inicial. O estudo histomorfométrico demonstrou que todos os animais tratados com o creme de *R. mangle* apresentaram reepitelização completa no 15º dia de pós-operatório ($0,00 \pm 0,00$) em relação ao padrão (1.26 ± 0.77) e controle negativo (2.45 ± 0.62). Houve proliferação de células Hela sob ação das diferentes concentrações de 0,001 a 100 µg/mL nos extratos das folhas e caule, e na raiz em 100 µg/mL com $p > 0,05$. O perfil fitoquímico revelou presença de taninos nos três extratos, além de flavonóides na folha; flavonóides, triterpenos e saponinas no caule, e na raiz revelou também a presença de triterpenos. Através de ensaios fitoquímicos ficou comprovado a presença de taninos, flavonóides, triterpenos e saponinas nos extratos aquosos de *R. mangle* e foi também observado efeito mitogênico em células HeLa. Este estudo revelou que o uso tópico do EAF. *R. mangle* a 5% em creme apresenta efeito

significativo na reepitelização de feridas cirúrgicas em ratos e reforçou a importância da realização da histomorfometria na correlação com os achados morfométricos.

Palavras-chave: *Rhizophora mangle*. Manguê vermelho. Citotoxicidade. Cicatrização de feridas. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

Rhizophora mangle L. is the most common species in Brazilian mangrove and has intense popular use in treatment of mucocutaneous disease. In order to provide scientific basis for its use, this study aimed to evaluate the healing activity of aqueous extract cream of *Rhizophora mangle* L. leaves in rats, and to investigate the cytotoxic activity and phytochemical screening of aqueous extracts of leaves, stem and root of *R. mangle*. Phytochemical screening of aqueous extracts of leaves, stem and root of the plant was done by identification of major compounds. The cytotoxicity of the extracts of the three parts of the plant, with concentrations of 100; 10; 1; 0.1; 0.01; 0.001; 0.0001 and 0.00001 ug / mL was evaluated on Hela cells (10^4 cells / ml) and dimethylsulfoxide (0.1%) was used as control. To evaluate the healing activity of aqueous extract cream were used 45 Wistar rats, females undergoing induction wound and divided into 3 groups (negative control, standard and treated). Each group received respectively 0.9% saline, 5% dexpanthenol in cream and 5% aqueous extracts of leaves of *R. mangle* in cream, for a period of 5th, 10th and 15th day postoperatively to evaluate the macroscopic aspects of the wounds and morphometric and histomorphometric evaluations. The treated group showed uniform wounds without infection when compared to the other two groups, but the morphometric analysis did not show on the 15th day statistical difference between the groups due to the rectangular shape of the original wound. The histomorphometric study showed complete epithelialization of the animals treated with *R. mangle* cream on the 15th day after surgery ($0,00 \pm 0,00$) compared to the standard (1.26 ± 0.77) and negative control (2.45 ± 0.62). There was proliferation of Hela cells different concentrations from 0.001 to 100 mg/mL of the extract of leaves and stem, and 100 mg / ml of root with $p > 0.05$. The phytochemical profile revealed the presence of tannins in the three extracts, and flavonoid in leaves; flavonoids, saponins, triterpenes in stem, and in root was also revealed the presence of triterpenes. Through phytochemical assays it was proven the presence of tannins, flavonoids, triterpenes and saponins in aqueous extracts of *R. mangle* and mitogenic effect was also observed in HeLa cells. This study showed that the topical use of aqueous extract of leaves of *R. mangle* in cream at 5% has significant effect on

epithelialization of surgical wounds in rats and reinforced the importance of holding the histomorphometry in correlation with the morphometric findings.

Keywords: *Rhizophora mangle*. Mangue red. Cytotoxicity. Wound healing. Secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Mapa ilustrativo das áreas de mangue no mundo.....	29
Figura 3.1- Fluxograma do estudo	37
Figura 3.2- <i>Rhizophora mangle</i> L. no manguezal da cidade de Itamaracá - Pernambuco- Brasil.....	38
Figura 3.3- <i>Rhizophora mangle</i> L. com a presença dos rizóforos	39
Figura 3.4- Imagem de satélite do local de coleta da planta	39
Figura 3.5- Liofilizador utilizado na confecção dos extratos de <i>R. mangle</i>	42
Figura 3.6- Placa cromatográfica com o extrato (à esquerda) e com o padrão (à direita)	44
Figura 3.7- Cuba cromatográfica.....	44
Figura 3.8- Etapa do uso de reveladores.	45
Figura 3.9- Procedimento para detecção de alcalóides nos extratos	45
Figura 3.10- Realização da pesquisa de saponinas.....	46
Figura 3.11- Estufa do Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia-UFPE	47
Figura 3.12- Espectrofotômetro	48
Figura 3.13- Fluxograma do Estudo <i>in vivo</i>	48
Figura 3.14- Rato <i>Wistar</i> após tricotomia	50
Figura 3.15- Confecção de ferida cirúrgica em rato <i>Wistar</i>	50
Figura 3.16- Medição inicial da ferida cirúrgica com paquímetro.	51
Figura 3.17- EAF <i>R.mangle</i> a 5% em creme.....	52
Figura 3.18- Três grupos de animais com as substâncias analisadas	52
Figura 5.1- Animais dos grupos I, II e III com as substâncias analisadas.	75
Figura 5.2 - Aspectos macroscópicos das feridas cirúrgicas nos três grupos no 0, 5º, 10º e 15º dia de pós-operatório.	77
Figura 5.3- Médias do percentual de contração das feridas em relação aos grupos.	79

Figura 5.4- Média da diferença da distância entre os epitélios em relação ao tempo.	
.....	79

Figura 5.5- Fotografias das lâminas no 15º dia de pós-operatório dos animais do grupo I, II e III	81
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Metabólitos e materiais utilizados para perfil fitoquímico do extrato de <i>R. mangle</i> L.....	43
Tabela 4.1- Metabólitos e materiais utilizados para perfil fitoquímico do extrato de <i>R. mangle</i> L.....	59
Tabela 4.2- Avaliação da citotoxicidade de extratos aquosos da folha, caule e raiz da <i>R. mangle</i> em células HeLa.	61
Tabela 4.3- Perfil fitoquímico qualitativo dos extratos aquosos das folhas, caule e raiz da <i>R. mangle</i> L.	63
Tabela 5.1- Áreas das feridas (mm ²) e percentagem da contração da área da ferida segundo o grupo e o tempo de pós-operatório.....	78
Tabela 5.2- Avaliação estatística da distância entre as bordas dos epitélios através de logaritmo decimal + 1, segundo o grupo e o tempo de avaliação.	80

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

aC	antes de Cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Anti-HIV	Anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCS	Centro de Ciências da Saúde
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CO ₂	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbeco
DMSO	Dimetilsufóxido
EAF <i>R. MANGLE</i>	Extrato aquoso da folha de <i>Rhizophora mangle L.</i>
ECM	Matriz extracelular
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ETOH	Etanol
G	Gramma
H	Hora
HeLa	Células epiteliais de tumor de cérvix uterina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IGF-1	Fator de crescimento insulina-símile
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Km	Quilômetro
Km ²	Quilômetro quadrado
KOH	Hidróxido de potássio
MDCK	Células de linhagem epitelial de rim canino Madin-Darby

MT	Medicina Tradicional
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
nm	Nanômetro
μg	Micrograma
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mL	Mililitro
nº	Número
OMS	Organização Mundial De Saúde
O ₂	Oxigênio
PBS	Solução tampão de fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
°C	Grau centígrado
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
US\$	Dólar americano
Wo	Área inicial da ferida
Wi	Área final da ferida
WHO	“World Health Organization”

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1. MEDICINA TRADICIONAL.....	20
2.1.1. MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS.....	22
2.1.1.1. ESTUDOS TOXICOLÓGICOS NA FITOTERAPIA	26
2.2. MANGUEZAL	28
2.2.1. <i>Rhizophora mangle</i> L.....	29
2.3. CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA.....	31
2.4. JUSTIFICATIVA	34
2.5. OBJETIVOS	35
2.5.1. GERAL.....	35
2.5.2. ESPECÍFICOS.....	35
2.6. HIPÓTESES.....	36
3. MÉTODOS.....	37
3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	37
3.2. LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO	38
3.3. POPULAÇÕES DO ESTUDO	38
3.4. TIPOS E PROCESSOS DE AMOSTRAGEM.....	40
3.5. DEFINIÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL	40
3.6. DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS	41
3.6.1. VARIÁVEIS DEPENDENTES	41
3.6.2. VARIÁVEIS INDEPENDENTES.....	41
3.7. PORMENORIZAÇÃO DAS ETAPAS DO ESTUDO	42
3.7.1. CONFECÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA <i>R. mangle</i> L.....	42

3.7.2. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO	42
3.7.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	46
3.7.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE	48
3.7.4.1. CONFECÇÃO DO CREME DE <i>Rhizophora mangle</i> L.....	51
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
3.9. ASPECTOS BIOÉTICOS	54
4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DE <i>RHIZOPHORA MANGLE</i> L. DO MANGUE BRASILEIRO	55
5. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS ATRAVÉS DE TRATAMENTO TÓPICO COM CREME DE EXTRATO DE FOLHAS DE <i>RHIZOPHORA MANGLE</i> L.....	70
6. CONCLUSÕES.....	91
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	109
ANEXO A- Autorização da coleta da planta no mangue.	109
ANEXO B- Autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais.....	110
ANEXO C- Guia para autores do <i>Journal of Ethnopharmacology</i>	111
ANEXO D- Guia para autores do <i>The FASEB Journal</i>	129

1. APRESENTAÇÃO

A presente dissertação faz parte de um projeto sobre o Estudo das Plantas do Mangue Brasileiro do Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Durante a realização de um estudo piloto para análise de possível efeito tóxico dos extratos da *Rhizophora mangle* L. sobre larvas de *Aedes aegypti* e sobre células infectadas por *Leishmania sp.*, verificou-se, de forma contrária, estímulo à proliferação celular.

Diante de tal fato, este estudo se propôs a analisar a composição majoritária do extrato da *Rhizophora mangle* L., a citotoxicidade dos extratos, e por fim a capacidade cicatrizante em feridas cirúrgicas de animais através da formulação de um creme do extrato. Este trabalho ainda promoveu a aquisição de uma Patente para fins de pesquisa.

Os dados obtidos com este estudo resultaram em dois artigos originais intitulados: “Avaliação da citotoxicidade e caracterização do perfil fitoquímico do extrato da *Rhizophora mangle* L. do mangue brasileiro” o qual foi enviado para o Journal of Ethnopharmacology (qualis B1 para área Medicina 1 para CAPES); e “Influência do extrato aquoso da folha da *Rhizophora mangle* L. a 5% em creme na cicatrização de feridas cirúrgicas.”, o qual será enviado para o The FASEB Journal – The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology -(qualis A1 para área Medicina 1 para CAPES).

Atendendo às normas vigentes do Programa de Pós-graduação de Ciências da Saúde em *strictu sensu* para elaboração da dissertação, no presente exemplar os resultados obtidos nesta dissertação estão apresentados no formato de artigos originais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. MEDICINA TRADICIONAL

A medicina tradicional (MT) ou não-convencional, em alguns países também conhecida como medicina complementar, tem uma longa história e é a soma total do conhecimento, habilidades e práticas baseadas em teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, sendo explicáveis ou não, usadas na manutenção da saúde, bem como para prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doenças físicas e mentais. (WHO, 2013).

Seus métodos terapêuticos incluem terapias com medicação e terapias não-medicamentosas. Incluem por exemplo: Acupuntura, Fitoterapia, Medicina Antroposófica, Medicina Ayurveda e Medicina Tradicional Chinesa. (SARSINA *et al.*, 2013).

Os primeiros registros do uso da MT, escritos em tábuas de argila, em cuneiforme, são da Mesopotâmia e datam cerca de 2.600 aC. Entre as substâncias que foram utilizadas estão os óleos de *Cedrus*, *Cupressus sempervirens* (Cypress), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), a espécie *Commiphora* (mirra) e a *Papaver somniferum*, os quais ainda hoje são usados para o tratamento de tosses, resfriados, infecções, inflamações e analgesia (GURIB-FAKIM, 2006).

A MT, na África, é utilizada por até 80% da população para atender às necessidades de saúde. Na Ásia e na América Latina, as populações continuam a prática da medicina tradicional como resultado de circunstâncias históricas e crenças culturais. Já na China, é responsável por cerca de 40% dos cuidados de saúde. (WHO, 2002). Na Europa, 65% dos cidadãos utilizarão a MT em algum momento de suas vidas. Cerca de 150 milhões de europeus, incluindo 11 milhões de italianos, fazem uso de algum tipo de tratamento não convencional. (SARSINA *et al.*, 2013)

Segundo estimativa da Pesquisa Nacional de Saúde, 7,6 milhões de brasileiros utilizaram alguma prática complementar, como acupuntura, uso de plantas medicinais e fitoterapia durante o ano de 2012. Esta prática foi identificada em proporções maiores nas Regiões Norte e Sul. Os grupos de pessoas de 40 a 59 anos, e de 60 anos ou mais, apresentaram maiores proporções na utilização da

prática complementar. A proporção de pessoas que fizeram uso da MT com nível superior completo foi maior que a registrada nos demais níveis de instrução. (BRASIL, 2013)

Uma das importâncias da MT é que os produtos descobertos a partir de plantas medicinais (e seus derivados) forneceram numerosos medicamentos utilizados clinicamente. Mesmo com todos os desafios que se enfrentam a descoberta de medicamentos a partir de plantas medicinais, produtos naturais isolados a partir dessas plantas podem ser componentes essenciais na busca de novos medicamentos. (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

A produção e a utilização de medicamentos tradicionais promovem o desenvolvimento das economias locais e a sustentabilidade dos serviços de saúde de uma região. Tal política faz com que os sistemas de saúde tenham maior abrangência e preservem a diversidade cultural, contribuindo assim para o desenvolvimento humano. (SARSINA *et al.*, 2013)

As plantas medicinais desempenham um papel muito importante na medicina moderna. Primeiramente porque podem fornecer fármacos extremamente importantes, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química, como por exemplo, os alcalóides da *Papaver somniferum* (morfina) e os glicosídeos cardiotônicos da *Digitalis* spp. (digitálicos). Em segundo lugar, as fontes naturais fornecem compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos. Em terceiro lugar, os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

No Brasil, a primeira descrição sobre o uso de plantas como remédio foi feita por Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado Descritivo do Brasil, de 1587. Esse tratado descrevia os produtos medicinais utilizados pelos índios de “as árvores e ervas da virtude”. Com a vinda dos primeiros médicos portugueses ao Brasil, diante da escassez na colônia de remédios empregados na Europa, perceberam a importância das plantas utilizadas pelos indígenas como medicamento. (VEIGA; PINTO, 2002).

Os estudos clínicos mostraram que os medicamentos tradicionais são muitas vezes tão eficazes quanto os da medicina convencional (SARSINA *et al.*, 2013). Entretanto, para que os produtos à base de plantas sejam comercializados e utilizados de forma segura, é necessário provar que possuem padrões aceitáveis de qualidade, segurança e eficácia (ARGENTA *et al.*, 2011; BRASIL, 2015).

As áreas do conhecimento devem ser utilizadas em pesquisas de novas substâncias oriundas de plantas, tendo a etnobotânica a incumbência de buscar informações a partir do conhecimento de diferentes povos e etnias; a fitoquímica, o desempenho de identificação, purificação, isolamento e caracterização de princípios ativos; e a farmacologia, o estudo dos efeitos farmacológicos de extratos e dos constituintes químicos isolados (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; BESSA *et al.*, 2013).

Assim como acontece em todas as formas de automedicação, o uso de plantas representa um risco potencial para saúde humana. A premissa de que o uso tradicional de uma planta por centenas de anos estabelece a sua segurança não é verdadeira, pois as formas sutis e crônicas de toxicidade, como carcinogênese, mutagenicidade e hepatotoxicidade, podem ter passado despercebidas pelas gerações anteriores (ARGENTA *et al.*, 2011).

2.1.1. MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

A fitoterapia significa tratamento de uma doença mediante o uso de plantas. Estes medicamentos são produzidos de plantas frescas ou secas por destilação, percolação, maceração e outras operações. Uma qualidade consistente do fitoterápico pode ser alcançada se todas as etapas de processamento da matéria-prima vegetal conseguir conservar o constituinte ativo e as substâncias sinérgicas. (SCHIMIDT *et al.*, 1993).

O uso de fitoterápicos, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico, passou a ser oficialmente reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), quando recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso. (ALONSO, 1998) Considerando-se as plantas medicinais importantes instrumentos da Assistência Farmacêutica, vários comunicados e resoluções da OMS expressam a posição da organização a respeito

da necessidade de valorizar o uso desses medicamentos no âmbito sanitário (WHO, 2002; WHO, 2013).

Como estratégia global para a medicina tradicional e a medicina complementar e alternativa para os anos de 2002 a 2005, a OMS reforçou o compromisso de estimular o desenvolvimento de políticas públicas a fim de inseri-las no sistema oficial de saúde dos seus 191 Estados-membros. (WHO, 2002)

Em maio de 2005, a OMS publicou o documento Política Nacional de Medicina Tradicional e Regulamentação de Medicamentos Fitoterápicos, em que se discute a situação mundial a respeito das políticas de MT e fitoterápicos, inclusive no Brasil. A inclusão brasileira decorre do fato do país ter a maior diversidade genética vegetal do mundo, com cerca de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies e, também, por possuir ampla tradição do uso das plantas medicinais, vinculada ao conhecimento popular, transmitido oralmente por gerações. (BRASIL, 2006)

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 48, de 16 de março de 2004 emitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), classificou o medicamento fitoterápico como aquele obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Essa RDC não considera medicamento fitoterápico aquele que inclua substâncias ativas isoladas na composição, nem as associações destas com extratos vegetais. A eficácia e segurança são validadas em levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3 (BRASIL, 2014).

As propriedades farmacológicas das plantas dependem dos seus compostos secundários. Estes aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas com este fim como, por exemplo, podem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos, e também apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas. (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os compostos secundários são usualmente classificados de acordo com a sua rota biossintética. As principais famílias de moléculas geralmente consideradas

são: os compostos fenólicos, terpênicos, esteróides e os alcalóides. (HARBONE, 1999; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

A função dos compostos fenólicos está envolvida com a síntese das ligninas que são comuns a todas as plantas superiores, atrativos aos seres humanos devido ao odor, sabor e coloração agradáveis, mas também para outros animais, os quais são atraídos para polinização ou dispersão de sementes. Além disso, esse grupo de compostos é importante para proteger as plantas contra os raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias (CROTEAU *et al.*, 2000).

Os flavonóides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular e estão amplamente distribuídas no Reino Vegetal, com estruturas baseadas no esqueleto heterocíclico aromático, 2-fenilbenzopirona ou 3-fenilbenzopirona contendo 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico. Possuem múltiplos efeitos biológicos, como atividade antioxidante, antiinflamatória e antitumoral, poder de redução da fragilidade e permeabilidade capilares; inibição da destruição do colágeno e da agregação plaquetária. Assim, a ingestão de flavonóides está associada à longevidade e à redução na incidência de doenças cardiovasculares (ARAÚJO, 2008).

Os flavonóides tem utilidade em taxonomia, especialmente para distinguir as espécies estreitamente relacionadas (JUDD *et al.*, 2007). Também protegem as plantas contra os efeitos danosos da radiação ultravioleta (CHABARIBERI *et al.*, 2008). Alguns flavonóides têm ação inseticida para protegê-la de ataques de insetos (CORRÊA; SALGADO, 2011).

Os taninos são classificáveis em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os dois principais hidrolisáveis são os galotaninos e os elagitaninos. Os condensados são conhecidos como protoantocianidinas. Algumas espécies de plantas podem conter até 50% de tanino em material jovem seco; e em geral a maior concentração ocorre nos caules. (CANNAS, 2008).

Os taninos são conhecidos por suas atividades antimicrobianas, além de relatos de agirem sobre o metabolismo do ácido araquidônico em leucócitos com papéis importantes nas inflamações (OKUDA, 2005) e são utilizados em tratamentos

que promovem a cicatrização de feridas (PERERA *et al.*, 2001; OFORI-KWAKYE *et al.*, 2011).

Os terpenóides representam a segunda maior classe de metabólitos secundários com o maior número de constituintes ativos. São classificados a depender da sua fórmula molecular. Um dos terpenóides conhecidos são os triterpenos que são constituídos por 6 unidades de isoprenos. Apresentam diversas atividades biológicas, entre as quais destacam-se: cardioprotetora (SUDHAHAR, *et al.* 2007), gastroprotetora (PERTINO, *et al.* 2007), antiinflamatória (MEDEIROS, *et al.* 2007), antitumoral (BRAGA, *et al.*, 2007), anti-hiperglicêmica (SATO, *et al.* 2007). e leishmanicida (DELGADO-MENDEZ, *et al.* 2008).

De acordo com a estrutura, as saponinas podem ser classificadas em esteroidais e triterpênicas. As saponinas triterpênicas são um grupo de compostos naturais que apresentam um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas. (GLAUERT *et al.*, 1962; HARUNA *et al.*, 1995) A sua atividade mais comum é a capacidade de produzir hemólise, resultado da ação das suas moléculas com colesterol das membrana de eritrócitos. Essa atividade hemolítica faz parte do sistema de proteção do vegetal contra ataques de predadores (MANETTI *et al.*, 2010).

As saponinas triterpênicas apresentam atividades contra outros microorganismos como vírus (CHAKRABORTY *et al.*, 2002; HAMERSKI *et al.*, 2005) e protozoários como *Leishmania infantum* (GERMONPREZ *et al.*, 2005). Esses compostos têm sido testados como adjuvantes em vacinas contra o HIV-1, citomegalovírus e toxoplasma gondii (YANG *et al.*, 2005). As atividades antiinflamatórias e analgésicas que têm sido atribuídas às saponinas parecem se dar por mecanismos variados como inibição da degradação de corticóides, atividade corticomimética, o que interfere no metabolismo de mediadores inflamatórios (LACAILLE-DUBOIS; WAGNER, 1996; TESTA *et al.*, 2012).

Os alcalóides podem ser definidos como compostos farmacologicamente ativos, contendo um nitrogênio e derivados de aminoácidos (CORDELL, 1981). Entretanto os alcalóides não são distribuídos de maneira uniforme no reino vegetal e são mais específicos para alguns gêneros de plantas (ANDRADE *et al.*, 2012).

O papel dos alcalóides nas plantas ainda é uma questão difícil de ser respondida; algumas respostas estão surgindo amparadas nas funções ecoquímicas destes compostos. O papel dos alcalóides nas defesas químicas das plantas é sustentado pela grande variedade de efeitos fisiológicos que estes exercem sobre os animais e também por suas atividades antimicrobianas. Vários alcalóides são tóxicos aos insetos e atuam como repelente para herbívoros. (CROTEAU *et al.* 2000; MARTINEZ *et al.*, 2013)

As cumarinas apresentam atividade citotóxica, anti-HIV1 pela inibição da transcriptase reversa, antifúngica, inseticida, vasodilatadora coronariana e anticoagulante (SCIO, 2004). É capaz de inibir a migração de neutrófilos para o local afetado. Este efeito anti-inflamatório do fitoterápico pode ser devido à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias no local de inflamação (ALVES *et al.*, 2009).

Diante das atividades biológicas e farmacológicas supracitadas, o uso popular não é suficiente para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Faz-se necessário a realização de estudos toxicológicos para a avaliação de parâmetros de segurança, os quais não são observados apenas pela utilização popular dessas plantas. (OLIVEIRA *et al.*, 2013)

2.1.1.1. ESTUDOS TOXICOLÓGICOS NA FITOTERAPIA

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo, sob condições específicas de exposição. Portanto, investiga experimentalmente a ocorrência, a natureza, a incidência, os mecanismos e os fatores de risco dos efeitos deletérios de agentes químicos. (OGA; SIQUEIRA, 2008).

Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados nestes estudos: o potencial tóxico em órgãos específicos, a identificação da toxicocinética e a relação dose-resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas; estabelecimento das doses para estudos adicionais

de toxicidade; e informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe (OLIVEIRA, 2008).

A toxicidade aguda é definida como efeitos adversos que ocorrem em curto período após administração de uma dose única ou doses múltiplas dentro de 24 horas. De modo geral, a dose única é utilizada para determinar a potência da substância em casos de ingestão ou envenenamento acidental, e as doses múltiplas são usadas para se observar os efeitos cumulativos. A via oral é indicada, mas outras vias de administração podem ser escolhidas, considerando-se a exposição humana. (BARROS; DAVINO, 2008).

Outra avaliação é a citotoxicidade que define o potencial toxicológico de um material ou seu extrato sobre cultura de células (SZEP *et al.*, 2002; CAO *et al.*, 2005). A interação dos materiais e seus componentes com as células, em nível molecular, é responsável por grande parte das alterações imunológicas e da genotoxicidade registradas (KLEINSASSER *et al.*, 2004), além de reações teciduais como inflamação e necrose (ACCORINTE *et al.*, 2005). Portanto, os testes de citotoxicidade são um pré-requisito para a avaliação de biocompatibilidade dos materiais (DEMIRCI *et al.*, 2008).

A citotoxicidade pode ser realizada por análises quantitativas ou qualitativas. Na análise quantitativa, conta-se o número de células após proliferação ou inibição celular, o número de colônias formadas, a dosagem de seus componentes, como proteínas e mitocôndrias, ou pela proliferação ou inibição do material genético. A análise qualitativa avalia as células microscopicamente, observando as alterações morfológicas, como vacuolização citoplasmática e lise de suas membranas (ISO, 2009).

Um teste de citotoxicidade bem aceito é o que utiliza o ensaio de Metiltiazol tetrazólio (MTT) ou sal de *tetrazolium* (SZEP *et al.*, 2002; VAJRABHAYA *et al.*, 2003; CAO *et al.*, 2005; DEMIRCI *et al.*, 2008), que após a redução por desidrogenases mitocondriais de células, formam os cristais de *formazan* insolúveis em água, solúveis somente em solventes orgânicos como o Dimetilsulfóxido (DMSO). Quando o DMSO é adicionado, os sais de formazan são solubilizados permitindo a leitura por espectrofotometria em função desta solubilização (HENSTEN-PETTERSEN, 1988).

A utilização de células em cultura é preferida pela homogeneidade das amostras e a facilidade de uma padronização, uma vez que é possível o controle de fatores tais como: pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e de O₂.(WILLIAMS, 2008). Segundo o mesmo autor, os métodos de cultura celular *in vitro* têm diversas vantagens quando comparados com testes *in vivo*; eles são mais reproduzíveis, mais rápidos e mais fáceis de serem realizados. Porém, algumas desvantagens devem ser consideradas para este método de estudo, entre elas a necessidade de se trabalhar em ambiente estéril e asséptico.

2.2. MANGUEZAL

Os manguezais são ecossistemas costeiros restritos às regiões tropicais e subtropicais, ocorrem em estuários, lagunas e planícies de maré, na transição entre os ambientes terrestres e marinhos. Tais ecossistemas fornecem uma ampla variedade de benefícios e serviços ambientais, incluindo a proteção das margens do estuário, as interações ecológicas com os ecossistemas marinho e fluvial, o fornecimento de recursos vegetais e animais para populações humanas, retenção de sedimentos, substâncias químicas e matéria orgânica (EWEL *et al.*, 1998).

As plantas medicinais estão distribuídas universalmente, inclusive no manguezal. As espécies vegetais arbóreas ou arbustivas compartilham características fisiológicas e adaptações especiais, permitindo longos períodos de exposição em água, regime diário das marés, alta salinidade, baixo teor de oxigênio e substratos inconsolidados (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 2000; REVATHI *et al.*, 2013).

Provavelmente, não há outro grupo de plantas com adaptações morfológicas e fisiológicas altamente desenvolvidas em tais condições extremas. Para prosperar nestes ambientes hostis, alterações nos seus processos fisiológicos ocorreram, resultando na síntese de novos compostos químicos. (BANDARANAYAKE, 1998; REYES; EDREVA *et al.*, 2008).

Trata-se, mundialmente, de um ambiente diferente do marinho e do terrestre. O manguezal compreende plantas de ocorrência única que produzem metabólitos com características químicas particulares que ainda são pouco conhecidas, o que sugere a possibilidade de abrigarem novos compostos com atividade biológica e dar

suporte ao surgimento de novas drogas tanto de origem natural, como semissintéticas ou servirem de base para a produção de drogas sintéticas (BANDARANAYAKE, 2002).

Figura 2.1 - Mapa ilustrativo das áreas de mangue no mundo



Fonte: BVMABF, 2015

Segundo o mapeamento realizado pelo Ministério do Meio Ambiente em 2009, os manguezais abrangem cerca de 1.225.444 hectares em quase todo o litoral brasileiro, desde o Oiapoque, no Amapá, até a Laguna em Santa Catarina, constituindo zonas de elevada produtividade biológica, uma vez que acolhem representantes de todos os elos da cadeia alimentar. Estão morfologicamente associados a costas de baixa energia ou a áreas estuarinas, lagunares, baías e enseadas que fornecem a proteção necessária ao seu estabelecimento (BRASIL, 2009).

O estado de Pernambuco, devido a sua posição geográfica, apresenta uma das menores faixas litorâneas da costa brasileira. Uma área de 23.973 hectares é ocupada por mangue, e a maioria encontra-se localizada nos municípios de Goiana, Igarassu, Itamaracá e Itapissuma; nas margens do Canal de Santa Cruz (7° 40' S e 7° 50' S de Latitude; 34° 50' e 34° 54' de Longitude) (BARROS *et al.*, 2000).

2.2.1. *Rhizophora mangle* L.

De acordo com o Manual Técnico de Vegetação Brasileira (2012), a vegetação no manguezal brasileiro mais frequentemente encontrada é a *Rhizophora mangle* L., também conhecida como mangue-vermelho, é amplamente distribuída ao

longo das costas tropicais e subtropicais da América Central e do Sul, Flórida, África Ocidental e nas ilhas de Fidji, Tonga e Nova Caledônia. (CHAPMAN, 1970; SILVA, *et al.*, 2005).

R. mangle L. é uma planta da família das Rhizophoraceae conhecida pelo nome popular mangue ou mangue-vermelho, abundante na paisagem dos manguezais, a qual possui estruturas que por um longo período foram confundidas com raízes-escora, os rizóforos, mas que teve constatada sua natureza caulinar. Trata-se de uma planta cuja folha, caule, raízes e frutos apresentam variados usos na medicina popular cuja preparação envolve maceração, chá ou cinzas em água (COELHO-FERREIRA, 2009).

Estudo relatou que *Rhizophora mangle* L. foi eficaz na adsorção de metais pesados como o chumbo em meio aquoso, mostrando-se uma solução tanto ecológica, como economicamente viável, para o problema da contaminação aquática por este metal (HORSFALL JR *et al.*, 2005).

Extratos das folhas e caule de *R. mangle* L. exibiram atividade inseticida contra *Cylas formicarius* desempenhada por triterpenóides que agem sinergicamente entre si e com outros compostos que potencializam este efeito apontando seu potencial como uma nova fonte de produtos inseticidas de origem natural, os quais são mais bem tolerados e de degradação mais rápida no ambiente do que aqueles de origem sintética (WILLIAMS, 1999).

Os taninos estão entre os principais compostos polifenólicos de *R. mangle* L., incluindo taninos poliméricos e hidrolisáveis (BERENGER *et al.*, 2006). O extrato aquoso do caule de *R. mangle* L. mostrou atividade antimutagênica frente ao metilmetanosulfonato em ensaios utilizando *Cepa allium*, e em células do ovário de hamster chineses avaliadas com o teste do micronúcleo, onde foram constatados uma diminuição da formação dos micronúcleos e de quebras cromossômicas tanto no pré como no pós-tratamento, possivelmente devido ao elevado conteúdo de taninos, os quais agem estabilizando radicais livres (MALINI *et al.*, 2010).

Extratos de *R. mangle* L. possuem efeitos benéficos diversos sobre órgãos do sistema digestivo avaliados em trabalhos recentes. De uso tradicional na medicina como antiulcerogênica, teve esta aplicação popular confirmada pelos estudos de De-

Faria *et al.* (2012) por meio da elevação dos níveis de prostaglandina 2 (PGE₂), *up regulation* da ciclooxygenase 2 (COX-2) e do fator de crescimento epidérmico (EGF). O resultado foi um efeito citoprotetor, antissecretório e cicatrizante sobre a mucosa gástrica, o que coloca esta planta como uma possível opção terapêutica ao tratamento da úlcera gástrica e de baixa toxicidade.

A capacidade adstringente e de precipitação de proteínas resulta em inibição do trânsito intestinal e consequente atividade antidiarréica. Em sua composição, o extrato aquoso do caule revelou uma elevada composição de ácidos graxos de cadeia longa e insaturados, representados principalmente pelo ácido palmítico e ácido oléico (PERERA *et al.*, 2010). Devido a estas e outras ações biológicas demonstradas tanto *in vitro* quanto *in vivo* torna-se necessário conhecer os efeitos toxicológicos desta planta para viabilizar suas aplicabilidades.

Na medicina tradicional, a *Rhizophora mangle* L. tem sido utilizada para tratamento contra úlceras gástricas (ROIG, 1974; BERENGUER *et al.*, 2006; PERERA *et al.*, 2010; DE-FARIA *et al.*, 2012), ação antibacteriana (MELCHOR *et al.*, 2001), atividade antioxidante (SÁNCHEZ *et al.*, 2006), anti-inflamatória (MARRERO *et al.*, 2006), efeito antidiarréico (WENDEL *et al.*, 2013), e também na cicatrização de feridas cutâneas (FERNANDEZ *et al.*, 2002).

2.3. CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico que compreende: fase inicial ou inflamatória, fase proliferativa ou de fibroplasia e por último a fase de remodelação ou maturação; caracterizadas por população celular predominante, seguindo sequência conservada de eventos que se sobrepõem no tempo e incluem inflamação, proliferação e remodelação tecidual (CLARK, 1996; MANDELBAUM *et al.*, 2003; KIRSNER, 2008).

Envolve a interação complexa de vários tipos de células, das citocinas, ou mediadores por elas produzidos e da matriz extracelular (ECM). As respostas vasculares, a atividade celular, e quimiotática, e a liberação de mediadores químicos no tecido afetado são combinadas. (CARVALHO *et al.*, 2006; KIRSNER, 2008)

Na fase inflamatória ocorre vasoconstrição, logo após há formação de um trombo rico em plaquetas, que provisoriamente tampona a lesão endotelial; este

trombo é infiltrado pela fibrina transformando-se em um trombo fibrinoso, onde há a capturação de eritrócitos, formando o trombo vermelho (MANDELBAUM *et al.*, 2003; BALBINO *et al.*, 2005).

Os mediadores liberados pelas plaquetas ativadas orientam a migração das células inflamatórias (polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos) para o local da lesão. Na fase de fibroplasia acontece a reepitelização, a angiogênese, além de aumento do número de fibroblastos ativados no local, havendo uma produção de colágeno tipo III. Inicia-se então a formação do tecido de granulação; já na fase de remodelamento, o tecido de granulação vai sendo enriquecido com fibras de colágeno I e começa a adquirir a aparência de massa fibrótica característica de cicatriz, e lentamente ocorre a maturação e remodelamento da matriz extracelular (BALBINO *et al.*, 2005, KIRSNER, 2008).

A migração dos queratinócitos ocorre inicialmente sobre uma matriz provisória que se forma no interior e preenche o leito da ferida. Eles migram por meio de rastejamento, um processo que requer protrusão da membrana plasmática na parte frontal da célula e contração do corpo da célula na parte posterior (FENTEANY, 2000).

Vários fatores de crescimento podem influenciar na migração dos queratinócitos. O fator de crescimento insulina-símile (IGF-1) estimula a protusão da membrana e facilita a propagação das células, enquanto que o fator de crescimento epidérmico (EGF) induz a contração de queratinócitos (HAASE, 2003). A proliferação e migração de queratinócitos são essenciais para reparação da epiderme após o ferimento, e diversos fatores de crescimento investigados até agora têm sido implicados em estimular estas funções (YANG, 2012).

A fibrina, fibronectina e vitronectina, juntamente com as plaquetas são componentes da ECM (REDD, 2004). Como a reparação da ferida progride, a matriz provisória é substituída por um composto de fibras de colágeno sintetizado por fibroblastos, e de proteoglicanos, tais como: ácido hialurônico, sulfato de heparan, sulfato de condroitina, sulfato de dermatan. Todos esses contribuem para a ECM (KIRSNER, 2008).

Apesar de o reparo tecidual ser uma evolução do próprio organismo para resolução da ferida, muitas necessitam de cuidados especiais para a cura adequada. Isso pode incluir tempo e diferentes alternativas medicamentosas e cirúrgicas, dependendo da etiologia e das características da ferida (ARONS *et al.*, 1992; DE MORAES *et al.*, 1998; CURRIE *et al.*, 2001; PETROIANU *et al.* 2001).

Com o objetivo de acelerar a cicatrização, uma série de tratamentos não invasivos podem ser aplicados na região afetada, visando uma maior velocidade de regeneração da lesão. Muitas vezes é necessário favorecer condições locais através de terapia tópica adequada para viabilizar o processo fisiológico (DEALEY, C., 1996).

Tendo em vista que o processo de reparação tecidual está intimamente relacionado ao tratamento aplicado, ao tipo de cicatrização e ao emprego de fármacos e meios terapêuticos associados, existe a necessidade de se pesquisar novas formas alternativas para auxiliar na cicatrização das feridas a fim de acelerar o período de reparação e minimizar as complicações relacionadas as lesões (MIRANDA, 2001; FALCÃO, *et al.*, 2008).

2.4. JUSTIFICATIVA

As plantas são utilizadas, desde os registros primitivos, para tratamento de enfermidades. São fontes inesgotáveis de substâncias que podem dar origem a medicamentos inovadores, e portanto, podem gerar novas terapias medicamentosas para Medicina Convencional.

A equipe do Laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) tem por objetivo investigar compostos de origem natural para desenvolvimento de novas terapias.

Houve um estudo piloto para análise de possível efeito tóxico dos extratos da *Rhizophora mangle* L. sobre larvas de mosquitos e sobre células infectadas por *Leishmania* sp., no entanto, verificou-se estímulo à proliferação celular.

Plantas que possuem extratos que gerem multiplicação de células são utilizadas, principalmente, em terapias de reparação tecidual assim como em estudos com células-tronco.

Na busca por artigos científicos sobre a *Rhizophora mangle* L. evidenciou-se uma carência de estudos que respaldassem o uso do extrato desta planta na medicina convencional com finalidade cicatrizante, como também ausência de estudos que caracterizassem o perfil fitoquímico da *R. mangle* no mangue brasileiro.

Portanto, de forma pioneira e com rigor científico, decidiu-se realizar um estudo para analisar o potencial de cicatrização da *R. mangle* através da confecção de um creme, assim como caracterizar o perfil fitoquímico desta planta no Brasil, com o intuito de promover estudos que respaldem o uso terapêutico na modulação da reparação tecidual.

2.5. OBJETIVOS

2.5.1. GERAL

Avaliar o potencial do extrato aquoso das folhas de *Rhizophora mangle* L. (EAF R.mangle) a 5% em creme no reparo tecidual de feridas cutâneas.

2.5.2. ESPECÍFICOS

- Identificar a presença de compostos químicos majoritários em extrato de folha, caule e raiz de *Rhizophora mangle* L.
- Avaliar a atividade citotóxica ou mitogênica do extrato aquoso de folha, caule e raiz de *Rhizophora mangle* L. pelo método colorimétrico do sal tetrazólico (MTT).
- Analisar morfometricamente a área da cicatriz e calcular o grau de contração de feridas cirúrgicas em ratos Wistar tratados com EAF R.mangle a 5% em creme.
- Analisar histomorfometricamente a reepitelização das feridas cirúrgicas em ratos Wistar tratados com EAF R.mangle a 5% em creme.
- Descrever aspectos macroscópicos das feridas cirúrgicas nos grupos de animais submetidos ao soro fisiológico, dexpanthenol em creme e EAF R.mangle a 5% em creme.

2.6. HIPÓTESES

- EAF *R.mangle* a 5% em creme possui capacidade de estimular a cicatrização e otimizá-la.
- Existem compostos majoritários nos extratos aquosos da folha, caule e raiz da *R. mangle* L. que atuam como estimulantes da cicatrização.
- Os extratos aquosos de folha, caule e raiz de *Rhizophora mangle* L. possuem efeito mitogênico em células HeLa.
- O EAF *R. mangle* a 5% em creme reduz a área da cicatriz e proporciona um maior percentual de contração de feridas cirúrgicas em ratos *Wistar*.
- O EAF *R. mangle* a 5% em creme estimula a reepitelização.
- Os aspectos macroscópicos das feridas cirúrgicas dos ratos tratados com EAF *R. mangle* a 5% em creme são uniformes e sem infecção de ferida associada.

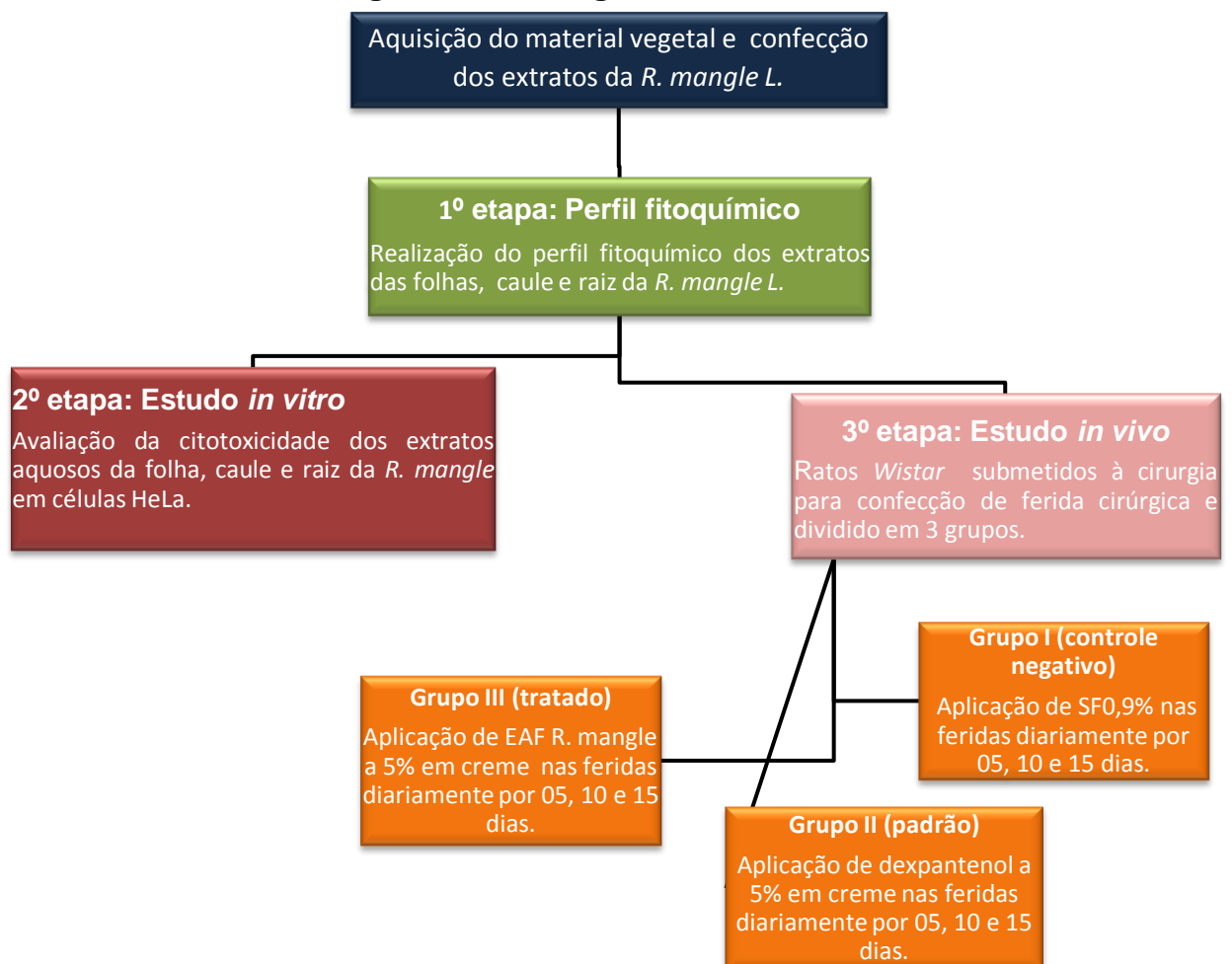
3. MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo pré-clínico, de caráter intervencional, sobre citotoxicidade ou efeito mitogênico em células (*in vitro*) e *in vivo* com efeito de cicatrização em feridas cutâneas (Figura 3.1). O estudo foi realizado em 3 etapas:

- Caracterização do perfil fitoquímico dos extratos
- Avaliação da citotoxicidade dos extratos
- Avaliação do potencial cicatrizante do creme de *R. mangle L.*

Figura 3.1- Fluxograma do estudo



Fonte: própria autora

3.2. LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

1º etapa: a caracterização do perfil fitoquímico foi realizado no laboratório do Departamento de Botânica do Centro de Ciências Biológicas da UFPE.

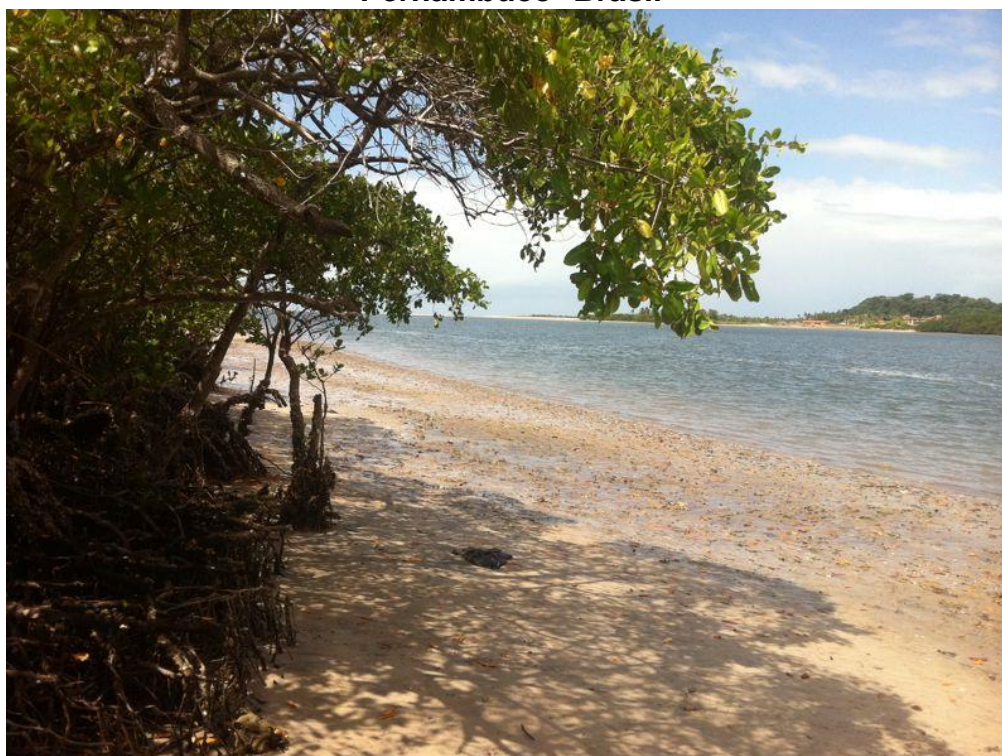
2º etapa: estudo *in vitro* (citotoxicidade dos extratos) foi realizado no laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Ciências Biológicas da UFPE.

3º etapa: estudo *in vivo* ocorreu no laboratório de Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPE.

3.3. POPULAÇÕES DO ESTUDO

1º etapa: folhas, caules e raízes da *Rhizophora mangle* L. (Figuras Figura 3.2 e Figura 3.3) foram coletadas no mangue do município de Itamaracá-PE, distrito de Vila Velha com 7° 40' de latitude sul e 34° 50' longitude oeste (Figura 3.4) Uma exsicata foi identificada pela bióloga Marlene Barbosa e encontra-se no Herbário da UFPE sob número UFP. 69.655. A coleta foi autorizada pela Companhia Pernambucana de Controle da Poluição Ambiental e de Administração de Recursos Hídricos sob número autorização CA DRFB N° 120/2014.

Figura 3.2- *Rhizophora mangle* L. no manguezal da cidade de Itamaracá - Pernambuco- Brasil



Fonte: própria autora

Figura 3.3- *Rhizophora mangle* L. com a presença dos rizóforos



Fonte: própria autora

Figura 3.4- Imagem de satélite do local de coleta da planta



Fonte: Barros *et al.*, 2000

2º etapa: células tumorais epiteliais de Henrietta Lacks (HeLa) número de série CCL-2 foram obtidas do banco de Células do Rio de Janeiro do Instituto Nacional do Câncer (INCA).

Critérios de Inclusão: células negativas para o teste de viabilidade de Azul de Tripan.

Critérios de Exclusão: placa com células contaminadas por bactérias ou fungos, e células positivas para o teste de viabilidade de Azul de Tripan.

3º etapa: ratos Wistar, fêmeas, com 8 a 12 semanas de vida, provenientes do Biotério do Laboratório de Cancerologia Experimental do CCS da UFPE.

Critérios de Inclusão:

Ratos Wistar, fêmeas, com 8 a 12 semanas de vida e provenientes da mesma linhagem reprodutiva.

Critérios de Exclusão:

Foram excluídos ratos que não cumpriram com as exigências dos critérios de inclusão, e ratos que apresentaram doenças inflamatórias, infecciosas ou oncológicas pré-existentes e no momento da seleção. Também foram excluídos os que já participavam de outros experimentos.

3.4. TIPOS E PROCESSOS DE AMOSTRAGEM

A amostra vegetal, as células HeLa e os animais foram selecionados por conveniência.

3.5. DEFINIÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL

- A partir de 500g de folhas, 500g de caule e 500g de raízes.
- Foram utilizadas 10^4 células/mL HeLa viáveis.
- 45 ratos Wistar, sendo 15 animais para cada grupo (controle negativo, padrão e tratado).

3.6. DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

3.6.1. VARIÁVEIS DEPENDENTES

Variável dependente	Definição operacional	Categorização
Número de células HeLa	Número de células viáveis detectadas através do MTT no estudo in vitro fornecida pelo ELX 800.	Quantitativa contínua
Área da ferida cirúrgica	Área macroscópica da ferida cirúrgica aferida por paquímetro	Quantitativa contínua
Comprimento entre os epitélios	Distância entre os epitélios durante processo de reepitelização após procedimento cirúrgico.	Quantitativa contínua

3.6.2. VARIÁVEIS INDEPENDENTES

Variável Independente	Definição operacional	Categorização
Partes da <i>R. mangle</i> L.	Porções da <i>R. mangle</i> L. coletadas para confecção dos extratos.	Folha, caule e raiz
Concentrações dos extratos aquosos	Extratos aquosos da <i>R. mangle</i> L. diluídos progressivamente com DMSO a 1%.	100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 e 0,00001 µg/mL
Grupos de ratos Wistar	Grupos de animais Wistar que receberam aplicação de soro fisiológico, dexpantenol creme e o EAF R, mangle a 5% em creme nos dias de pós-operatório.	Soro fisiológico a 0,9% (I), dexpantenol a 5% em creme (II) e EAF R.mangle a

		5% em creme. (III)
Tempo de pós-operatório	Data do pós-operatório de eutanásia para avaliação morfológica e histomorfométrica das feridas cirúrgicas.	5º dia 10º dia 15º dia

3.7. PORMENORIZAÇÃO DAS ETAPAS DO ESTUDO

3.7.1. CONFECÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA *R. mangle* L.

O extrato foi preparado por trituração de 500g das folhas frescas, 500g de caule e 500g de raiz e foram submetidos à infusão com água destilada (40° C por 10 minutos), sendo filtrado. Em seguida, o solvente foi removido em liofilizador L101 da marca Liobras (Figura 3.5) (MCCLOUD *et al.*, 1988; LEITE, 2003).

Após a liofilização, os resíduos secos dos três extratos foram armazenados a 5°C e utilizados para caracterização do perfil fitoquímico e para citotoxicidade, e apenas o da folha foi utilizado para a confecção do creme de *Rhizophora mangle* L.

Figura 3.5- Liofilizador utilizado na confecção dos extratos de *R. mangle*



Fonte: própria autora

3.7.2. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO

Os extratos das folhas, caule e raiz foram submetidos à técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), empregando-se sistemas de

desenvolvimento e reveladores adequados (MARKHAN, 1982; HARBONE, 1984) para a identificação dos compostos secundários a fim de se avaliar a presença ou ausência destes como cumarinas, saponinas, alcalóides, flavonóides, triterpenos e taninos. (Tabela 3.1)

Tabela 3.1- Metabólitos e materiais utilizados para perfil fitoquímico do extrato de *R. mangle* L.

METABOLITOS	PADROES	REVELADORES	FASE MÓVEL	PROPORÇÃO
Cumarinas	Ácido cumárico	KOH 10 % – ETOH	Tolueno + Éter	50:50
Flavonóides	Quercetina	NEU	Acetato de Etila + Ácido Fórmico + Ácido Acético glacial + Água	100:11:11:26
Triterpenos	Lupeol	Liberman Burchard	– Tolueno + Clorofórmio + Etanol	40:40:10
Taninos	Ácido Tânico	Cloreto férrico 1%	Clorofórmio + Metanol + Água	65:30:5
Alcalóides	Escopolamina	Dragendoff	Tolueno+ Acetato de Etila+ Dietilamina	70: 20: 10

Fonte: WAGNER *et al*, 1996; DA SILVA *et al.*, 2010.

Uma amostra de cada extrato foi aplicada com o auxílio de um tubo capilar (SILVA *et al.*, 2010), de forma arbitrária, no lado esquerdo da placa de cromatografia constituída por gel de sílica com dimensões 20 x 20 cm e 0,25 milímetros de espessura (fase estacionária CCD) (Merck - Darmstadt, Alemanha). O padrão correspondente a cada classe de metabólito foi aplicado no lado direito da placa. (Figura 3.6) Tanto o extrato quanto o padrão foram aplicados a um centímetro da base da placa e o líquido foi transferido por capilaridade sobre a superfície da fase estacionária, penetrando-o (SILVA *et al.*, 2010), como mostrado na Figura 3.7.

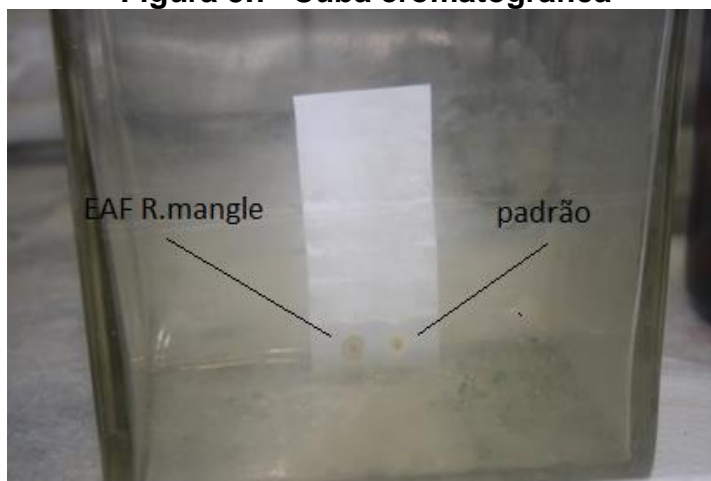
Figura 3.6- Placa cromatográfica com o extrato (à esquerda) e com o padrão (à direita)



Fonte: própria autora

Em seguida através da técnica de ascensão, na qual a placa cromatográfica foi imersa no solvente (fase móvel), a uma profundidade de aproximadamente 0,5 cm da base do prato em uma cuba cromatográfica (Figura 3.7). Deste modo, a cromatografia foi desenvolvida com uma fase móvel movendo-se através da fase estacionária por capilaridade (SILVA *et al.*, 2010).

Figura 3.7- Cuba cromatográfica



Fonte: própria autora.

Ao final do processo, as placas foram removidas da cuba cromatográfica e postas a secar em temperatura ambiente. Em seguida, os reveladores apropriados foram aplicados por borrifamento (Figura 3.8), a fim de demonstrar a presença ou ausência dos compostos secundários nos extratos da *R. mangle* L. A Tabela 3.1 mostra o padrão cromatográfico, vários sistemas de desenvolvimento e reveladores adequados para cada classe de metabólito.

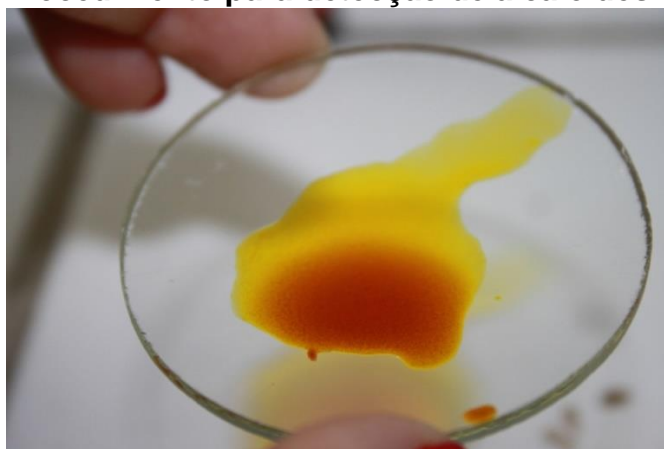
Figura 3.8- Etapa do uso de reveladores.



Legenda: A: Processo de borrifamento. B: Pós-borrifamento das placas cromatográfica.
Fonte: própria autora.

A identificação de triterpenos, flavonóides e cumarinas foi realizada em presença de luz ultravioleta. O teste de alcalóides foi realizado segundo HONDA *et al.* (2000), com modificações. Dessa forma, cinco gotas dos extratos de *R. mangle* L. foram colocadas em um vidro de relógio e acidificadas com três gotas de ácido clorídrico a 1%. Posteriormente, foram acrescentadas três gotas do reagente Dragendoff (Figura 3.9). Caso haja a formação de precipitados insolúveis irá indicar a presença de alcalóides na espécie vegetal.

Figura 3.9- Procedimento para detecção de alcalóides nos extratos



Fonte: própria autora

Finalmente, para verificar a presença de saponinas, foi utilizado 2 mL de cada extrato (folha, caule e raiz), misturado com 2 mL de clorofórmio e 5 mL de água destilada. A solução foi filtrada para um tubo de ensaio e agitou-se em uma

centrífuga por 3 minutos de forma contínua. Em seguida, observou-se existência ou não da formação de espuma na solução (Figura 3.10) Se as saponinas estão presentes nas espécies de plantas, em seguida, haverá espuma persistente e abundante, formando uma espécie de anel na solução dentro do tubo de ensaio (HONDA, 1990; SILVA *et al.*, 2010).

Figura 3.10- Realização da pesquisa de saponinas



Fonte: própria autora

3.7.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

As células de carcinoma cervical uterino (HeLa) foram utilizadas para avaliação da citotoxicidade dos extratos aquosos das folhas, caule e raiz de *R. mangle* L. através do método colorimétrico do sal tetrazólico (3-metil[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MTT) (CINGI *et al.*, 1991; MOSMANN, 1983)

As células HeLa foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1% de antibióticos (estreptomicina e penicilina), e mantidas em estufa (HF 212 UV marca Ultrasafe) de 5% de CO₂ e 95 % de umidade a 37°C (Figura 3.11).

A garrafa com as células em monocamadas foi retirada da estufa, e removido o meio de cultura, em seguida, lavada com PBS (solução tampão de fosfato). Adicionou-se 1 mL de tripsina e manteve-se a garrafa por 1 minuto na estufa para despreendimento das células. A suspensão de células numa pequena quantidade de meio foi transferida para um tubo falcon de 15 mL e levado à centrífuga (1200 rpm por 10 minutos).

Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1mL de DMEM para homogeneização do pellet, e posteriormente, uma alíquota de 10 μ L foi retirada para realização da contagem de células em placa de Neubauer.

As suspensões de células HeLa foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 10^4 células/mL e mantidas em estufa por 24 horas para aderir ao fundo das placas. Os extratos nas concentrações (100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 e 0,00001 μ g/mL) foram acrescentados aos poços com células, em quadruplicata, e re-incubados por mais 72 horas.

Após isso, foi acrescentado 20 μ L de MTT (5mg/mL) em cada poço da placa, e deixada por 3 horas na estufa. Ao ser retirado o sobrenadante (MTT e o meio de cultura), ficaram só os cristais de formazan formados no fundo do poço; adicionou-se DMSO para solubilizar os cristais e procedeu-se à leitura da densidade óptica através do espectrofotômetro de 585 nm com um leitor de ELX 800 (Figura 3.12). Como controle foi usado o Dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,1%.

Figura 3.11- Estufa do Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia-UFPE



Fonte: própria autora

Figura 3.12- Espectrofotômetro

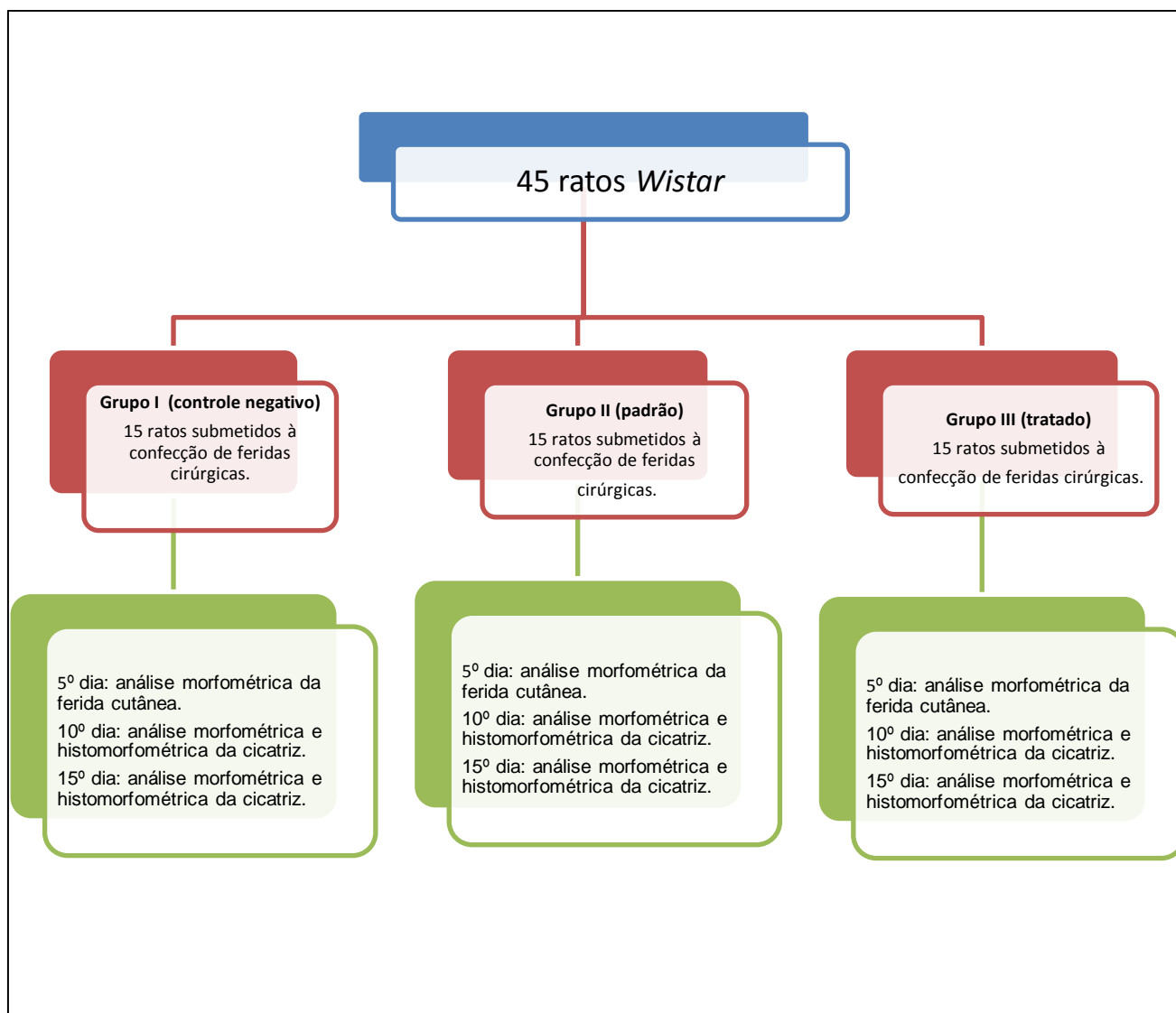


Fonte: própria autora.

3.7.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE

Para esta etapa do estudo, foram utilizados 45 ratos Wistar, fêmeas, com idades entre 8 a 12 semanas, da mesma linha reprodutiva, provenientes do Biotério do Laboratório de Cancerologia Experimental do CCS da UFPE. Os animais foram divididos ao acaso em 3 grupos de 15 animais cada: grupo controle negativo (grupo I), grupo padrão (grupo II) e grupo tratado (grupo III). Cada grupo foi subdividido em três subgrupos com 5 animais para eutanásia no 5° (subgrupo A), 10° (subgrupo B) e 15° dia (subgrupo C) (Figura 3.13)

Figura 3.13- Fluxograma do Estudo *in vivo*.



Fonte: própria autora.

Os animais foram mantidos a temperatura de 27 ± 2 °C, com umidade relativa 44 a 56%, com ciclos de luz e escuro de 10 e 14 h, em gaiolas separadas, durante 1 semana antes e durante os experimentos. Os animais receberam dieta padrão (Labina purina®, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados no período da manhã de acordo com as diretrizes atuais para o cuidado dos animais de laboratório e as diretrizes éticas para a investigação de dor experimental em animais conscientes.

Os animais foram previamente anestesiados com injeção intramuscular em região dorsal de associação de ketamina (10mg/Kg de peso corpóreo) e xilazina (1mg/Kg de peso corpóreo).

Após a anestesia, realizou-se a pesagem dos animais em balança analógica e subsequentemente a tricotomia na região dorsal em área de aproximadamente 6 cm² (Figura 3.14). Procedeu-se à antissepsia com clorexidine a 2% e confecção de ferida cirúrgica, de aproximadamente 485 mm², com a utilização de bisturi com lâmina estéril número 15 até a exposição da fáscia muscular dorsal (Figura 3.15).

Figura 3.14- Rato *Wistar* após tricotomia

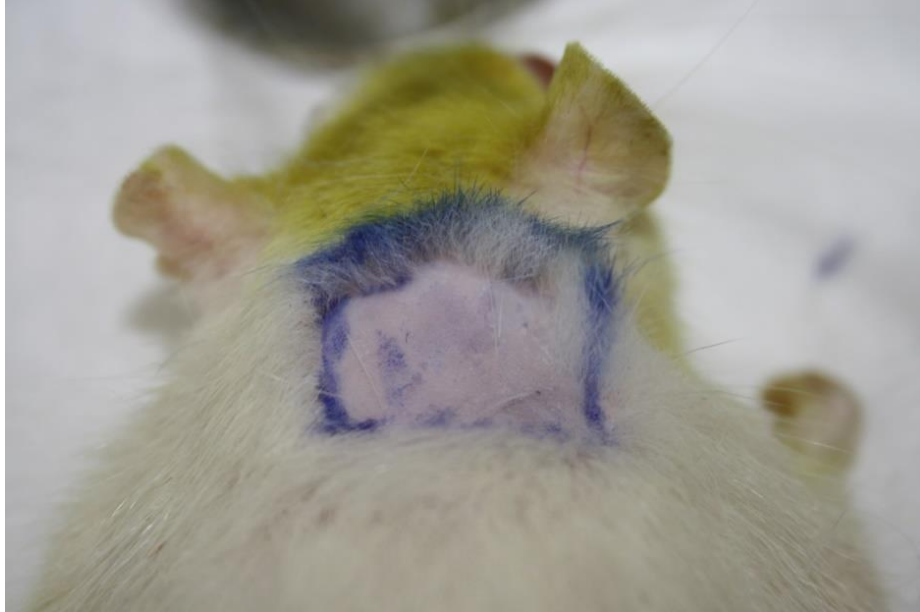


Foto: própria autora

Figura 3.15- Confecção de ferida cirúrgica em rato *Wistar*



Fonte: própria autora

Após a hemostasia por compressão local, realizou-se a medição inicial do comprimento e largura das feridas cutâneas com a utilização do paquímetro universal da marca Digimess (Figura 3.16).

Figura 3.16- Medição inicial da ferida cirúrgica com paquímetro.



Fonte: própria autora.

Em seguida, nos animais do grupo controle negativo (grupo I) foi aplicado 1mL solução salina 0,9%. No grupo padrão (grupo II), dexpanthenol a 5% em creme, e no grupo tratado (grupo III) o EAF *R.mangle* a 5% em creme (Figura 3.17), sem a confecção de curativo oclusivo (Figura 3.18).

3.7.4.1. CONFECÇÃO DO CREME DE *Rhizophora mangle* L.

O extrato aquoso da folha de *Rhizophora mangle* foi pesado em balança analítica digital (marca Shimadzu ATY 224) com a utilização de papel manteiga até atingir 3g e vertido em gral de porcelana. Em seguida foi solubilizado com água destilada e homogeneizado.

Em um vidro de relógio, pesou-se a emulsão aniônica até atingir 60g e verteu-se no gral contendo o extrato de *Rhizophora mangle* previamente solubilizado e homogeneizado até total solubilização. Aferido o pH e mantido entre 5,5 e 6,5. Por último foi envasado em pote plástico compondo o EAF *R. mangle* a 5% em creme.

Figura 3.17- EAF R.mangle a 5% em creme



Fonte: própria autora

Nos dias subsequentes de pós-operatório, perpetuou-se a aplicação das respectivas soluções ou cremes uma vez ao dia, em cada grupo, sem realização de curativo até o dia da eutanásia, além de pesagem diária dos animais.

Figura 3.18- Três grupos de animais com as substâncias analisadas



Legenda: a) grupo I (controle negativo); b) grupo II (padrão) e c) grupo III (tratado)

Fonte: própria autora

Os animais dos três subgrupos no 5º dia de pós-operatório (IA, IIA e IIIA), foram submetidos apenas à aferição final do comprimento e largura das cicatrizes cutâneas com o paquímetro, e então calculadas área inicial e área final das feridas cirúrgicas, através da fórmula:

$$A = b \times h \quad (1)$$

Onde:

“A” representa a área em cm², “b” o comprimento, e “h” a altura ou largura.

O grau de contração expresso em percentual foi mensurado pela equação proposta por Ramsey *et al.* (1995):

$$100 \times (W_o - W_i) / W_o = \% \text{ de contração.} \quad (2)$$

Onde:

“Wo” é a área inicial da ferida e “Wi” é a área final da ferida.

Ao final de cada subgrupo do 10^o e 15^o dia, realizou-se além da medição do comprimento e largura final com aplicação das fórmulas supracitadas para análise da morfometria. Uma nova intervenção cirúrgica foi realizada com anestesia já referida, e em seguida remoção da cicatriz com margem de 1 cm de pele em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do animal, e colocadas em solução tamponada de formol a 10%.

Todas as etapas foram documentadas por fotografias em câmera digital Cannon EOS 1000D. Cada subgrupo animal foi sacrificado através da câmara de CO₂ ao fim dos experimentos.

Os cortes dos blocos de parafina foram de 5µm e as preparações foram coradas em hematoxilina-eosina. Procedeu-se à realização de microfotografias do local da cicatriz com *scanner Panoramic Midi* (3DHISTECH). Em seguida, foram utilizadas as microfotografias para mensurar a distância entre os dois epitélios, traçando-se uma reta entre as duas bordas da cicatriz. Esse processo foi realizado com o *software Panoramic Viewer* versão 1.15.4 ano 2014.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através das medidas de estatística descritiva: média, erro padrão da média ou desvio padrão e mediana e inferencialmente através dos testes estatísticos: F (ANOVA) ou Kruskal-Wallis na comparação entre grupos, concentrações ou locais da planta; e t-Student pareado na comparação da avaliação inicial das áreas com as demais avaliações, e na avaliação da distância de reepitelização. No caso de diferenças significativas pelo teste F (ANOVA) foram aplicados teste de comparações múltiplas de Tukey e no caso do teste de Kruskal-Wallis foram aplicados os testes de comparações múltiplas do referido teste.

Ressalta-se que a escolha do teste de Kruskal-Wallis foi devido à variabilidade elevada e os testes F (ANOVA) e t-Student pareado devido a menor variabilidade.

A margem de erro utilizada nas decisões dos testes estatísticos foi de 5%. O programa estatístico utilizado para digitação dos dados e obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) na versão 21.

3.9. ASPECTOS BIOÉTICOS

Os métodos utilizados neste estudo, aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE com processo de número 23076.025194/2012-10, seguem a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DE *RHIZOPHORA MANGLE* L. DO MANGUE BRASILEIRO

Avaliação da citotoxicidade e caracterização do perfil fitoquímico de *Rhizophora mangle* L. do mangue brasileiro

Jéssica Guido de Araújo^a; Caroline. M. I. Lopes^a; Marllon A. N. Satana^a; Mariana Oliveira Barbosa^b; Eliete Cavalcanti da Silva^a; Eliane A. B. de Carvalho^a; Jeymesson R. C. Vieira^{a*}

^a Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – Brasil. ^b Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco- Brasil.

*Autor correspondente: endereço: Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Cidade Universitária. Recife – Pernambuco. Brasil. Cep: 50.760-420. tel: 55 081 21268515 fax: 55 081 21268516. E-mail: jeymesson@gmail.com.

RESUMO

Relevância Etnofarmacológica: *Rhizophora mangle* L., conhecida como mangue vermelho, possui vários usos na medicina popular. É uma das plantas mais frequentes nos manguezais, inclusive no mangue brasileiro.

Objetivo do estudo: A fim de avaliar a toxicidade in vitro do extrato de *Rhizophora mangle*, foi realizada a citotoxicidade dos extratos aquosos das folhas, caule e raiz, como também a caracterização do perfil fitoquímico.

Materiais e Métodos: A citotoxicidade foi realizada através do método colorimétrico de brometo com 1×10^4 células/mL HeLa submetidas as concentrações de 100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,0001; 0,00001 µg/mL do extrato aquoso das folhas, caule e raiz da *R. mangle*, diluídos com Dimetilsulfóxido a 0,1%. O perfil fitoquímico foi realizado através da Cromatografia em Camada Delgada para pesquisa de triterpenos, taninos, flavonóides, cumarinas, alcalóides e saponinas.

Resultados: Houve proliferação de células Hela em todos os extratos aquosos de folha, caule e raiz da *R. mangle*. As concentrações dos extratos aquosos de folha de 100; 10; 1; 0,1; 0,01 e 0,001 µg/mL, do caule de 100; 10; 1; 0,1; 0,01 e 0,001 µg/mL e raiz 100 µg/mL apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas ao controle. O perfil fitoquímico revelou presença de taninos nos três extratos, flavonóides nos extratos das folhas e caule; triterpenos nos extratos do caule e raiz; e apenas saponinas no extrato do caule.

Conclusão: Os extratos aquosos da folha, caule e raiz da *R. mangle* L. apresentaram efeito proliferativo em células HeLa; e na caracterização do perfil fitoquímico, os taninos estiveram presentes nos extratos das três porções da planta do mangue brasileiro o que sugere efeito mitogênico deste composto.

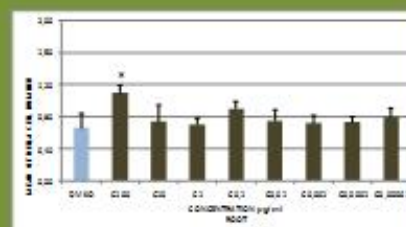
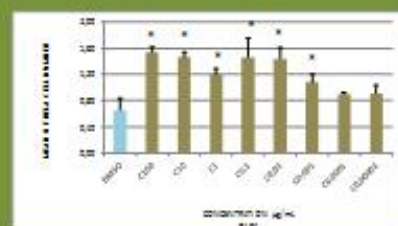
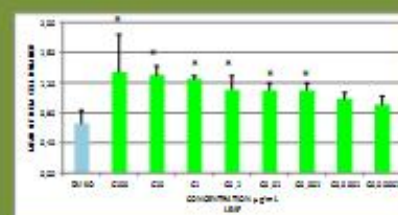
RESUMO GRÁFICO

Rhizophora mangle L.



Secondary compounds	Leaf	Bark	Root
Flavonoids	+	+	-
Tannins	+	+	+
Alkaloids	-	+	-
Triterpenes	-	+	+
Saponins	-	+	-
Coumarins	-	-	-

Cytotoxicity on HeLa cells



ABREVIATÕES

CCD: Cromatografia em Camada Delgada; CO₂: Dióxido de carbono; célula HeLa: células tumorais de origem epitelial; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMSO: Dimetilsulfóxido; MDCK: células de linhagem epitelial de rim canino Madin-Darby; MMT: Método Colorimétrico de Brometo; UFPE: Universidade Federal de Pernambuco; WHO: World Health Organization; Kg: quilograma.

Palavras-chaves: *Rhizophora mangle*, mangue vermelho, mangue, citotoxicidade, compostos secundários, taninos.

INTRODUÇÃO

A medicina tradicional tem sido utilizada há milhares de anos, apesar de ser uma parte importante e muitas vezes subestimada dos serviços de saúde.(WHO, 2013). Na Ásia e na América Latina, as populações continuam a prática da medicina tradicional como resultado de circunstâncias históricas e crenças culturais. Na África, é utilizada por até 80% da população para atender as necessidades de saúde. Já na China, é responsável por cerca de 40% dos cuidados de saúde. (WHO, 2002).

Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, houve um aumento considerável do interesse pela medicina tradicional, e particularmente, em medicamentos fitoterápicos. Tem havido um rápido crescimento do mercado internacional em relação às plantas medicinais com retornos econômicos significativos. (WHO, 2003)

As plantas medicinais estão presentes em diversos biomas, inclusive no mangue. O mangue é um ecossistema de transição, de áreas costeiras e estuários dos rios, extremamente adverso por possuir alta salinidade e baixa oferta de oxigênio nos solos lamacentos, além de estar susceptível às variações diárias da maré e do pH do solo, alta temperatura e umidade. (Revathi *et al.*, 2013). Para prosperar nestes ambientes hostis, alterações nos seus processos fisiológicos ocorreram, resultando na síntese de novos compostos químicos. (Bandaranayake, 1998, Edreva *et al.*, 2008; Reyes and Cisneros-Zevallos, 2003).

De acordo com o Manual Técnico de Vegetação Brasileira (2012), a vegetação especializada no manguezal brasileiro mais frequentemente encontrada é a *Rhizophora mangle* L., também conhecida como mangue vermelho. Ela é amplamente distribuída ao longo das costas tropicais e subtropicais da América Central e do Sul, Flórida, África Ocidental e nas ilhas de Fidji, Tonga e Nova Caledônia. (Silva, *et al.*, 2005; Chapman, 1970).

Na medicina tradicional, a *Rhizophora mangle* L. tem sido utilizada para tratamento contra úlceras gástricas (Berenguer *et al.*, 2006, De-Faria *et al.*, 2012,

Perera *et al.*, 2010, , Roig, 1974), efeito antidiarréico (Wendel *et al.*, 2013), ação antibacteriana (Melchor *et al.*, 2001), atividade antioxidante (Sánchez *et al.*, 2006) e anti-inflamatória (Marrero *et al.*, 2006), e também na cicatrização de feridas cutâneas (Fernandez *et al.*, 2002).

Diante do exposto, este estudo teve por objetivo a avaliação da citotoxicidade dos extratos aquosos das folhas, caule e raiz, além da caracterização do perfil fitoquímico de *Rhizophora mangle* L. através da determinação dos seus compostos secundários.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

A *Rhizophora mangle* L., também conhecida no Brasil como mangue vermelho, teve seu nome oficial verificado no site www.theplantist.org em 05 de fevereiro de 2015. O vegetal estava na fase adulta durante a coleta, no período da floração. Folha, caule e raiz foram coletadas no mês de outubro de 2014, no mangue do município de Itamaracá, distrito de Vila Velha, Estado de Pernambuco – Brasil com 7° 40' de latitude sul e 34° 50' longitude oeste. (Barros *et al.*, 2000).

Uma exsicata foi identificada pela bióloga Marlene Barbosa e encontra-se no Herbário da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob número UFP. 69.655. A coleta foi autorizada pela Companhia Pernambucana de Controle da Poluição Ambiental e de Administração de Recursos Hídricos sob autorização CA DRFB N° 120/2014.

PREPARAÇÃO DO EXTRATO

O extrato foi preparado por trituração de 500g das folhas frescas, 500g de caule e 500g de raiz e foram submetidos à infusão com água destilada em 2 x 200mL a 40° C por 10 minutos, e posteriormente filtrado. Em seguida, o solvente foi removido em liofilizador L101 da marca Liobras (McCloud *et al.*, 1988; Leite, 2003) e após a liofilização, os extratos aquosos das folhas, caule e raiz renderam, respectivamente, 1,76%, 2,74%, e 2,54%. Os resíduos secos foram armazenados a 5°C e utilizados para citotoxicidade e para realização do perfil fitoquímico.

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO

Os extratos da folha fresca, caule e raiz foram submetidos à técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), empregando-se sistemas de desenvolvimento e reveladores adequados (Markhan, 1982; Harbone, 1984) para a identificação dos compostos secundários a fim de se avaliar a presença ou ausência de cumarinas, flavonóides, triterpenos e taninos (Tabela 4.1).

Tabela 4.1- Metabólitos e materiais utilizados para perfil fitoquímico do extrato de *R. mangle* L

METABÓLITOS	PADRÕES	REVELADORES	FASE MÓVEL	PROPORÇÃO
Cumarinas	Ácido cumárico	KOH 10 % – ETOH	Tolueno + Éter	50:50
Flavonóides	Quercetina	NEU	Acetato de Etila + Ácido Fórmico + Ácido Acético glacial + Água	100:11:11:26
Triterpenos	Lupeol	Liberman Burchard	– Tolueno + Clorofórmio + Etanol	40:40:10
Taninos	Ácido Tânico	Cloreto férrico 1%	Clorofórmio Metanol + Água	+ 65:30:5
Alcalóides	Escopolamina	Dragendoff	Tolueno+ Acetato de Etila+ Dietilamina	70: 20: 10

Fonte: (Wagner *et al*, 1996; Da Silva *et al.*, 2010).

A identificação de triterpenos, flavonóides e cumarinas foram realizadas na presença de luz ultravioleta. O teste de identificação de alcalóides foi realizado de acordo com Honda *et al.* (2000) e saponinas por Da Silva *et al.* (2010).

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS

A avaliação da atividade citotóxica dos extratos aquosos da folha, caule e raiz ocorreu através do método colorimétrico de brometo (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MTT) (Cingi *et al.*, 1991; Mosmann, 1983). Suspensões de 1×10^4 células/mL de células tumorais de origem epitelial (HeLa) foram cultivadas em placa de 96 poços.

Decorridas 24h de incubação a 37 °C em estufa (HF 212 UV marca Ultrasafe), com atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂ e umidade de 95%; as células foram tratadas com diluições seriadas (100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 e 0,00001 µg/mL) e colocadas nos poços com as células HeLa. Cada concentração foi testada em quadruplicata. Dimetilsufóxido (DMSO) a 0,1% foi utilizado como controle. Após 72 horas, 25 µl de MTT e 5 mg/mL de solução tampão de fosfato salino (PBS) foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas durante 3 h. A densidade óptica foi medida a 585 nm com leitor ELX 800.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através de medidas de estatística descritiva: média, mediana e desvio padrão. E inferencialmente pelo teste de *Kruskal-Wallis* com $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada usando SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 21.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo, através da avaliação da citotoxicidade, evidenciou a proliferação in vitro de células HeLa em todas as diluições dos extratos aquosos das três porções da *R. mangle* L., contudo as concentrações dos extratos aquosos de folha de 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 µg/mL, do caule de 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 µg/mL e raiz 100 µg/mL apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas ao controle. (Tabela 4.2)

A Tabela 2 expressa também os resultados da comparação entre os extratos das diferentes partes da planta numa mesma concentração com relação a proliferação celular. Nas concentrações de 10 e 0,01 µg/mL, o extrato do caule apresentou maior proliferação celular estatisticamente significativa quando comparada aos extratos da folha e raiz. Na concentração de 0,0001 µg/mL, o extrato da folha apresentou maior crescimento celular com relação aos extratos do caule e da raiz. Vale ressaltar também que a raiz nas concentrações de 1 e 0,1 e 0,001 µg/mL apresentou menor proliferação celular em relação aos extratos do caule e da folha.

Tabela 4.2- Avaliação da citotoxicidade de extratos aquosos da folha, caule e raiz da *R. mangle* em células HeLa.

Grupo				
Média + DP (Mediana): n = 4				
• DMSO				
0,66 ± 0,18 (0,59) ^(a)				
Concentração µg/mL	Local			Valor de p
	Folha (n=4) Média + DP (Mediana)	Caule (n=4) Média + DP (Mediana)	Raiz (n=4) Média + DP (Mediana)	
• C100	1,34 ± 0,50 (1,51) ^(A, b)	1,54 ± 0,08 (1,56) ^(A, b)	1,10 ± 0,09 (1,09) ^(A, b)	p ⁽¹⁾ = 0,104
• C10	1,30 ± 0,12 (1,33) ^(▼, A, b)	1,47 ± 0,07 (1,50) ^(*, A, b)	0,74 ± 0,21 (0,75) ^(■, BCD, a)	p ⁽¹⁾ = 0,001*
• C1	1,25 ± 0,04 (1,25) ^(*, A, b)	1,20 ± 0,09 (1,17) ^(*, B, b)	0,71 ± 0,07 (0,74) ^(▼, BC, a)	p ⁽¹⁾ = 0,005*
• C0,1	1,11 ± 0,18 (1,19) ^(*, ▼, AB, b)	1,46 ± 0,29 (1,43) ^(*, A, b)	0,90 ± 0,09 (0,89) ^(▼, AD, a)	p ⁽¹⁾ = 0,030*
• C0,01	1,10 ± 0,09 (1,10) ^(▼, AB, b)	1,44 ± 0,17 (1,37) ^(*, A, b)	0,75 ± 0,14 (0,69) ^(■, BC, a)	p ⁽¹⁾ < 0,001*
• C0,001	1,10 ± 0,09 (1,11) ^(*, AB, b)	1,08 ± 0,12 (1,08) ^(*, B, b)	0,72 ± 0,10 (0,72) ^(▼, BC, a)	p ⁽¹⁾ = 0,0014*
• C0,0001	0,98 ± 0,09 (0,96) ^(▼, B, a)	0,90 ± 0,03 (0,89) ^(*, C, a)	0,73 ± 0,07 (0,72) ^(■, BC, a)	p ⁽¹⁾ = 0,001*
• C0,00001	0,91 ± 0,11 (0,87) ^(B, a)	0,91 ± 0,13 (0,89) ^(C, a)	0,80 ± 0,10 (0,82) ^(BCD, a)	p ⁽¹⁾ = 0,370
Valor de p	p ⁽²⁾ = 0,023*	p ⁽²⁾ = 0,001*	p ⁽²⁾ = 0,034*	

(*): Diferença significativa a 5%.

(1): Através do teste de Kruskal-Wallis para comparações entre as partes das plantas em cada concentração com comparações do referido teste.

(2): Através do teste Kruskal-Wallis com comparações entre as concentrações em cada local da planta analisada através do referido teste.

Obs. Se os símbolos entre parêntesis são distintos se comprova diferença significativa entre os locais da planta correspondentes.

Obs. Se as letras maiúsculas entre parêntesis são distintas se comprova diferença significativa entre as concentrações correspondentes em cada local analisado.

Obs. Se as letras minúsculas entre parêntesis não são iguais aos das letras do grupo DMSO se comprova diferença significativa com as concentrações respectivas.

Estudos sobre a citotoxicidade *in vitro* dos extratos da folha, caule e raiz de *Rhizophora mangle* encontrada no mangue brasileiro não foram reportados em publicações anteriores. Mena-Rejon *et al* (2009) realizaram um estudo com extrato metanólico das folha, caule e raiz de *R. mangle* da Península de Yucatan no México e revelou atividade citotóxica dos extratos em células HeLa, sugerindo que tal capacidade tenha sido causada pelos compostos secundários da planta.

Ao se analisar o estudo de Mena-Rejon *et al* (2009) não se evidenciou citotoxicidade para células de linhagem epitelial de rim canino Madin-Darby (MDCK), assim como não foi realizada a caracterização do perfil fitoquímico da planta.

Sabe-se que os compostos secundários são diretamente influenciados pelo solo, temperatura, salinidade, poluição ambiental, e que a depender dos fatores fenotípicos uma mesma planta poderá ter funções diferentes em locais diferentes. (Edreva *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010). Além disso, a utilização de solventes orgânicos ou inorgânicos extraem metabólitos com diferentes polaridades a partir de plantas medicinais, configurando diferentes atividades biológicas. (Tan *et al.*, 2011)

Perera *et al.* (2008) avaliaram a toxicidade aguda e subaguda através da ingestão do extrato aquoso do caule de *R. mangle* L. pela mucosa oral de ratos e não evidenciaram toxicidade com dose única de 2000mg/Kg de massa corpórea de extrato nem toxicidade subaguda com a oferta de 500mg/Kg/dia do mesmo extrato por 14 dias em fígado, coração e rins.

Estudos de de-Faria *et al.* (2012) avaliaram os mecanismos associados ao efeito anti-úlceras gástrica através do extrato de caule da *Rhizophora mangle* L. não identificando toxicidade aguda ao fornecer 5g/Kg de peso, por via oral, ao ratos, nem nos 14 dias seguintes.

Perera *et al.* (2010) estudaram os efeitos farmacológicos da *R. mangle* L. para atividades anti-úlceras com extrato aquoso. Neste estudo avaliaram a toxicidade medular do extrato aquoso liofilizado do caule da *R. mangle* L. e não evidenciaram toxicidade medular demonstrando segurança do extrato.

Nossos resultados *in vitro* com os extratos aquosos da *R. mangle* L. acrescentam-se aos estudos toxicológicos realizados *in vivo* encontrados na literatura contribuindo para utilização no futuro do extrato na medicina convencional. (Perera *et al*, 2008; Perera *et al*, 2010; de-Faria *et al.*, 2012)

A identificação qualitativa dos compostos secundários, nos extratos aquosos das folhas, caule e raiz da *R. mangle* L., evidenciou a presença de taninos nos três extratos. Em contra partida, os alcalóides e cumarinas foram ausentes. Na folha, houve também a presença de flavonóides, e ausência de triterpenos. E na raiz, os

triterpenos estavam presentes, porém com ausência de flavonóides e saponinas (Tabela 4.3).

Tabela 4.3- Perfil fitoquímico qualitativo dos extratos aquosos das folhas, caule e raiz da *R. mangle* L.

Compostos secundários	Folha	Caule	Raiz
Flavonóides	+	+	-
Taninos	+	+	+
Alcalóides	-	-	-
Triterpenos	-	+	+
Saponinas	-	+	-
Cumarina	-	-	-

+: presente -: ausente.

O perfil fitoquímico dos extratos do caule da *R. mangle* L. realizado em alguns estudos (Melchor *et al.*, 2001; Bandaranayake, 2002; Marrero *et al.*, 2006; Berenguer *et al.*, 2006; De- Faria *et al.*, 2012) revelam a presença de taninos.

O tanino faz parte dos compostos fenólicos que são importantes para o vegetal exercer proteção antimicrobiana, e contra herbívoros fornecendo maior resistência contra possíveis ameaças. (Harborne *et al.*, 1991). Sua presença no extrato reforça a capacidade antimicrobiana (Melchor *et al.*, 2001), além de funções antioxidante (Sánchez *et al.*, 2006) e hemostática (Roig, 1988).

Alguns grupos de taninos agem sobre o metabolismo do ácido araquidônico em leucócitos com papéis importantes contra as inflamações (Okuda, 2005) e são utilizados em tratamentos que promovem a cicatrização de feridas (Fernandez *et al.*, 2002; De-Faria *et al.*, 2012). Diante do exposto, sugerimos que a presença de tanino tenha papel importante na proliferação celular pelas suas características antioxidantes e anti-inflamatórias.

Sánchez *et al* (1998) caracterizaram a composição química de forma qualitativa da *R. mangle* L. do mangue de Cuba, e destacaram a presença de polifenóis (54,78%), representados em sua maioria por taninos poliméricos (80%) e taninos hidrolisáveis (20%), destacando-se a presença nestes últimos de

epicatequina, catequina, ácido clorogênico, ácido gálico e ácido elágico. Os outros componentes incluem carboidratos (17,5%), ácidos graxos (4%), fitoesteróides (0,0285%) e compostos voláteis ou semivoláteis (0,0205%).

Os flavonóides podem influenciar as funções de células ligadas a processos inflamatórios, agindo sobre as enzimas e vias envolvidas em processos anti-inflamatórios como, por exemplo, prostaglandina PGE₂, o TNF α (Middleton *et al.*, 2000), em proteínas inflamatórias de macrófagos, e a COX-2mRNA (Talhouk *et al.*, 2007). Os flavonóides podem agir de forma sinérgica com os taninos na regulação da regeneração tecidual (Ofori-Kwakye *et al.*, 2011).

Estudos de extratos de caule de *Rhizophora racemosa*, de raiz de *Rhizophora apiculata* e *R. mucronata* mostraram a presença de terpenóides e saponinas (Ukoima *et al.*, 2005; Ravikumar *et al.*, 2011; Mathew *et al.* 2012), e Hulchings *et al.* (1996) relataram que saponinas e terpenóides são usados em indústrias farmacêuticas como agentes antimicrobianos, antifúngicos, anti-inflamatório e antioxidante. A saponina possui atividades antifúngica e espermicida apresentada por uma variedade de plantas (Lacaille-Dubois & Wagner, 1996) já que age nos lipídios da membrana celular. A presença de saponinas no extrato do caule da *R. mangle* L. reforça a ação antibacteriana desta planta.

William (1999) isolou e caracterizou o taraxerol e cinnamoylupeol, dois triterpenóides a partir de folhas e caule de *R. mangle* L. Estes triterpenos são importantes na proteção das folhas contra herbívoros de *R. mangle* da Jamaica. A presença de triterpenos possui adjuvância com os efeitos gastroprotetor (Pertino, *et al.* 2007) e anti-inflamatório (Medeiros, *et al.* 2007).

CONCLUSÃO

A partir dos experimentos realizados no âmbito deste estudo, o extrato aquoso de folha, caule e raiz da *R. mangle* L. estimulou a proliferação de células HeLa, demonstrando efeito mitogênico. Este achado pode ser correlacionado a presença de taninos nestes extratos, e está de acordo com o uso tradicional do extrato de *R. mangle* L. para o tratamento de cicatrização de feridas.

REFERÊNCIAS

- Bandaranayake, W.M., 1998. Traditional and medicinal uses of mangroves. *Mangroves and Salt Marshes*. 2 (3): 133–48.
- Bandaranayake, W.M., 2002. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetlands Ecology and Management*, 10:421–52.
- Barros, H.M., Eskinazi-Leça, E., Macedo, S.J., Lima, T., 2000. Gerenciamento participativo de estuários e manguezais. Recife: Ed. Universitária da UFPE, p. 240.
- Berenguer, B., Sanchez, L.M., Quilez, A., Lopez-Barreiro, M., Haro, O., Galvez, J., Martín, M.J., 2006. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. *Journal of Ethnopharmacology* 103: 194–200.
- Chapman, V.J., 1970. Mangrove phytosociology. *Tropical Ecology*. 11: 1–19.
- Cingi, M. R., de Angelis, I., Fortunati, E. E., Reggiani, D., Bianchi, V., Tiozzo, R., Zucco, F., F., 1991. Toxicology in vitro. 5:119-125.
- Da Silva, N.L.A., Miranda, F.A.A., Da Conceição, G.M., 2010. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*, 6 Supl 2: 1-17.
- De-Faria, F. M., Almeida, A.C.A., Ferreira, A.L., Dunderb, R. J., Takayama, C., Silva, M.S., Silva, M. A., Vilegas, W., Rozzad, A. L., Pellizzoni, C. H., Tomae, W., Souza-Brito, A.R.M., 2012. Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 139: 234– 243.
- Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gurel, A., Aktas, L., Gesheva, E., 2008. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen Appl Plant Physiol*. 34 (1-2): 67-78.
- Fernandez, O., Capdevila, J.Z., Dalla, G., Melchor, G., 2002. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. *Fitoterapia*. 73: 564–568.
- Harborne, J.B., 1984. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall, London.
- Harborne, J.B., Polo, R.T., Robbins, C.T., 1991. *Plant defenses against mammalian herbivore*. London: CRC. Cap. 4. 61-4.

Honda NK, Garcez WS, Garcez FR, Conceição CA., 1990. Estudo químico de plantas de Mato Grosso do Sul I: triagem fitoquímica. Campo Grande (MS): EUFMS.

Hulchings, A., Scot, A.H., Lewis, G., Cunningham, A.B., 1996. Zulu Medicinal Plants. An Inventory University of Natal Press. Pietermaritzburg. 53-54.

Lacaille-Dubois, M.A.; Wagner, H., 1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, v.2, p. 363-386.

Leite, S.P. *Indigofera Suffruticosa* Mill: ensaio fitoquímico e ações biológicas biológicas. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2003.

Manual Técnico de Vegetação Brasileira, 2012. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 1 edição Brasil. 1-271.

Markhan, K.R., 1982. Techniques of flavonoid identification London:Academic Press, 52-61.

Marrero, E., Sánchez, J., Armas, E., Escobar, A., Melchor, G., Abad, M. J., Bermejo, P., Villar, A. M., Megías, J., Alcaraz, M. J, 2006. COX-2 and sPLA2 inhibitory activity of aqueous extract and polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). *Fitoterapia* 77, 313–315.

Mathew, M., Martin Xavier, K.A., Mathew, S., Asha, K.K., Anandan, R., Kumar, A., 2012. Effect of *Rhizophora* Root Extracts on Wound Healing and Yeast – Induced Pyrexia in rats. *Fishery Technology*, 49, 161-166.

McCloud, T., Neme J., Muschik, G., Sheffield, H., Quesenberry, P., Suffness, M., 1988. Extraction of Bioactive Molecules from plants . Proceedings of the International Congress on Natural Products Research, Park City, UT, 17–21.

Medeiros, R., Otuki, M. F., Avellar, M. C. W., Calixto, J. B., 2007. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene [alpha]-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology*, 559(2-3): 227-235.

Melchor, G., Armenteros, M., Fernandez, O., Linares, E., Fragas, I., 2001. Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* Bark. *Fitoterapia*. 72: 689-691.

Mena-Rejon, G., Caamal-Fuentes, E., Cantillo-Ciau, Z., Cedillo-Rivera, R., Flores-Guido, J., Moo-Puc, R., 2009. *In vitro* cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 30, 462-465.

Middleton, E.J., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Review*. 52, 673–751.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological methods*. 65, 55-63.

Ofori-Kwakye, K., Kwapong, A.A., Bayor, M.T., 2011. Wound healing potential of methanol extract of *Spathodea campanulata* stem bark formulated into a topical preparation. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 8 (3), 218-223.

Okuda, T., 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 66, 2012–2031.

Perera, L.M.S., Chávez, I.F., Dorveny, B. M., Miranda, R.L.. 2008. Toxicidad aguda y subaguda oral del extracto acuoso liofilizado de *Rhizophora mangle* L. en ratas. *Rev Cubana Plant Med*. vol.13, n.3, pp. 1-13.

Perera, L.M.S., Escobar, A., Souccar, C., Remigio, M.A., Mancebo, B., 2010. Pharmacological and toxicological evaluation of *Rhizophora mangle* L., as a potential antiulcerogenic drug: Chemical composition of active extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 2 (4): 56-63.

Pertino, M., Schmeda-Hirschmann, G., Rodriguez, J. A., Theoduloz, C., 2007. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (*Jatropha isabelli*). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3): 553-559.

Ravikumar, S., Gnanadesigan, M., 2011. Hepatoprotective and Antioxidant Properties of *Rhizophora mucronata* Mangrove Plant in CCl₄ Intoxicated Rats. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 4(1): 66-72.

Revathi, P., Senthinath, T. J., Thirumalaikolundusubramanian, P. and Prabhu, N., 2013. Medicinal Properties of Mangrove Plants – an overview. *International Journal of Bioassays*. 02 (12): 1596-1600.

Reyes, L.F., Cisneros-Zevallos, L. 2003. Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *J Agric Food Chem*. 51 (18): 5296-300.

Roig, J.T., 1974. Plantas medicinales, aromaticas y venenosas de Cuba. Editorial Revolucion y progreso, La Habana, p. 745.

Roig, J.T., 1988. Plantas medicinales, aromaticas y venenosas de Cuba. Editorial Científica y Técnica. La Havana-Cuba. 164. 606-607.

Sánchez, P.L.M., Melchor, G., Alvarez, S., Bulnes, C., 1998. Chemical and toxicological characterization of one wound healing formulation from *Rhizophora mangle* L. Rev. Salud Animal. 20: 69-72.

Sánchez, J., Melchor, G., Martínez, G., Escobar, A., Faure, R., 2006. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. Fitoterapia. 77: 141–143.

Silva, M.A.B., Bernini, E., Carmo, T.M.S., 2005. Características estruturais de bosques de mangue do estuário do rio São Mateus, ES, Brasil. Acta bot. bras. 19(3): 465-471.

Silva, J.M., Martins, M.B.G., Cavaleiro, A.J., 2010. Anatomical characterization and chemical profiles of *Avicennia schaueriana* and *Rhizophora mangle* leaves from impacted and not impacted mangroves os São Paulo. Journal of Botany. 39: 14-33.

Talhok, R.S., Karam, C., Fostok, S., El-Jouni, W., Barbour, E.K., 2007. Antiinflammatory bioactivities in plant extracts. Journal of Medicinal Food. 10, 1-10.

Tan, S.N., Yong, J.W.H., Teo, C.C., Ge, L., Chan, Y.W., Hew, C.S., 2011. Determination of metabolites in *Uncaria sinensis* by HPLC and GC–MS after green solvent microwave-assisted extraction. Talanta. 83: 891-898.

Ukoima, H.N., Ikata, M., Pepple, G.A., 2005. Control of Lasiodiplodia theobromae (PAT) on *Rhizophora racemosa* using plants extracts. American Journal Biotechnology and Molecular Sciences, 3 (1): 1-7.

Wagner, H., Bladt, S., 1996. Plant Drugs Analysis – a thin layer chromatography atlas. 2 nd ed. Berlin: Springer-Verlag.

Wendel, G. H., Teves, M.R., Paredes, J. D., Sanchez Perera, L.M., Pelzer, L. E., 2013. Evaluation of the Antidiarrheal Activity of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae). Latin American Journal of Pharmacy. 32 (1): 128-31.

Williams, L.A.D., 1999. *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) Triterpenoids with Insecticidal Activity. Naturwissenschaften, 86, 450–452.

WHO, 2002. World Health Organization. Traditional Medicine Strategy 2002-2005. 1-59. Geneva, Switzerland.

WHO, 2003. World Health Organization. WHO Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. 1-80. Geneva, Switzerland.

WHO, 2013. World Health Organization (Ed.), WHO Traditional Medicine Strategy 2014–2023, WHO Press, Geneva, Switzerland.

5. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS ATRAVÉS DE TRATAMENTO TÓPICO COM CREME DE EXTRATO DE FOLHAS DE *RHIZOPHORA MANGLE* L.

Cicatrização de feridas através de tratamento tópico com creme de extrato de folhas de *Rhizophora mangle* L.

Wound healing by topical treatment with herbal cream containing the leaf extract of *Rhizophora mangle* L.

Jéssica G. de Araújo^a; Caroline. M.I.Lopes^a; Marllon A.N. Santana^a; Ivone A. Souza^b, Jefferson de Lima^b, Pedro P. M. Neto^a, Jeymesson. R.C. Vieira^{a*}

^a Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – Brasil. ^b Laboratório de Cancerologia Experimental no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – Brasil.

*Correspondência: Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Cidade Universitária. Recife – Pernambuco. Brasil. Cep: 50.760-420. tel: 55 081 21268515 fax: 55 081 21268516. E-mail: jeymesson@gmail.com.

RESUMO

Introdução: Apesar de o reparo tecidual ser uma evolução do próprio organismo para resolução da ferida, muitas necessitam de cuidados especiais para a cura adequada. Plantas medicinais, como a *Rhizophora mangle* L., apresentam uso tradicional para cicatrização de feridas. Objetivos: avaliar o potencial cicatrizante de creme do extrato aquoso de folha de *R. mangle* L. em feridas cirúrgicas de ratos através de estudo morfométrico, histomorfométrico das feridas, e a evolução macroscópica em relação aos controles. Métodos: 45 ratos *Wistar* foram submetidos à cirurgia de confecção de ferida cirúrgica e divididos em 3 grupos (controle

negativo, padrão e tratado), os quais receberam de forma tópica, respectiva e diariamente, soro fisiológico a 0,9%, dexpanthenol a 5% em creme e creme de extrato de folha de *R. mangle* L. a 5%. As cicatrizes foram retiradas, para análise histomorfométrica, nos 5º, 10º e 15º dia de pós-operatório. Resultados: O grupo tratado apresentou feridas uniformes e sem infecção, porém a análise morfométrica não evidenciou no 15º dia diferença entre os três grupos devido ao formato retangular da ferida inicial. O estudo histomorfométrico demonstrou que todos os animais tratados com o creme de *R. mangle* L. apresentaram reepitelização completa no 15º dia de pós-operatório ($p = 0,033$) em relação ao grupo padrão (582,21µm) e controle negativo (968,89 µm). Conclusão: O uso tópico do EAF. *R. mangle* a 5% em creme apresentou efeito significativo na reepitelização de feridas cirúrgicas em ratos, evidenciada através da histomorfometria na correlação com os achados morfométricos.

ABREVIACÕES

CO₂: Dióxido de carbono; EAF. *R. mangle*: extrato aquoso da folha de *Rhizophora mangle* L.; °C: graus Celsius; g: gramas; µm: micrômetro; min: minutos; cm: centímetros; mm²: milímetros quadrado; Kg: quilograma; UFPE: Universidade Federal de Pernambuco; WHO: World Health Organization.

Palavras-chaves: *Rhizophora mangle*, mangue vermelho, reepitelização, cicatrização de feridas, histomorfometria.

INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico que compreende: fase inicial ou inflamatória, fase proliferativa ou de fibroplasia e fase de remodelação ou maturação (Mandelbaum *et al*, 2003), caracterizadas por população celular predominante, seguindo sequência conservada de eventos que se sobrepõem no tempo e incluem inflamação, proliferação e remodelamento tecidual (Clark, 1996; Kirsner, 2008).

Na fase de fibroplasia acontece a reepitelização, angiogênese, além de aumento do número de fibroblastos ativados no local, havendo uma produção de

colágeno tipo III. Inicia-se então a formação do tecido de granulação; já na fase de remodelamento, o tecido de granulação vai sendo enriquecido com fibras de colágeno I e começa a adquirir a aparência de massa fibrótica característica de cicatriz. E lentamente ocorre a maturação e remodelamento da matriz extracelular (Balbino *et al.*, 2005; Kirsner, 2008).

Apesar de o reparo tecidual ser uma evolução do próprio organismo para resolução da ferida, muitas necessitam de cuidados especiais para a cura adequada. Isso pode incluir tempo e diferentes alternativas medicamentosas e cirúrgicas, dependendo da etiologia e das características da ferida. Quanto maior o tempo para completar a cicatrizações, maior o risco de complicações. (Arons *et al.*, 1992; de Moraes *et al.*, 1998; Currie *et al.*, 2001; Petroianu *et al.* 2001).

Com o objetivo de acelerar a cicatrização, uma série de tratamentos podem ser aplicados na região afetada, visando uma maior velocidade de regeneração da lesão. Muitas vezes é necessário favorecer condições locais através de terapia tópica adequada para viabilizar o processo fisiológico (Dealey, 1996). Tendo em vista que o processo de reparação tecidual está intimamente relacionado ao tratamento aplicado, ao tipo de cicatrização e ao emprego de fármacos e meios terapêuticos associados, existe a necessidade de se pesquisar novas formas alternativas para auxiliar na cicatrização das feridas a fim de acelerar o período de reparação e minimizar as complicações relacionadas as lesões (Miranda, L.T.G.S., 2001; Falcão, *et al.*, 2008).

As plantas medicinais estão presentes em diversos biomas, inclusive no mangue. (Revathi *et al.*, 2013). A *Rhizophora mangle* L., mangue vermelho, tem sido utilizada na medicina tradicional como adstringente, anti-diarreica, anti-hemorragica, anti-séptico, hemostático, com propriedades antifúngicas e antiulcerogênicas (Roig, 1988). Nos últimos anos, vários autores têm descrito algumas atividades desta planta como antioxidante (Sánchez *et al.*, 2006; de-Faria *et al.*, 2009), anti-úlceras (Perera *et al.*, 2001; Berenger *et al.*, 2006; de-Faria *et al.*, 2009) e como cicatrizante de feridas (Fernandez *et al.*, 2002; de Armas *et al.*, 2005).

Portanto, este estudo teve por objetivo analisar o potencial cicatrizante de um creme de extrato aquoso da *R.mangle* L. a 5% através da análise morfométrica e histomorfométrica de feridas cirúrgicas em animais.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Ratos *Wistar*, fêmeas, da mesma linha reprodutiva, com idades entre 8 a 12 semanas, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pernambuco – Brasil, foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: I (controle negativo), II (padrão) e III (tratado) de 15 animais cada. Foi aprovado no Comitê de Bioética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Brasil sob número 23076.025194/2012-10.

Os animais foram mantidos a 27 ± 2 ° C, com umidade relativa 44 a 56% e ciclos de luz e escuro de 10 e 14 h, respectivamente, durante 1 semana antes e durante os experimentos. Os animais receberam dieta padrão (Labina purina®, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados no período da manhã de acordo com as diretrizes atuais para o cuidado dos animais de laboratório e as diretrizes éticas para a investigação de dor experimental em animais conscientes.

MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO

As folhas de *Rhizophora mangle* L. foram colhidas, no período de floração, em outubro de 2014 no mangue da cidade de Itamaracá-PE, distrito de Vila Velha 7° 40' de latitude sul e 34° 50' longitude oeste, Brasil. Uma exsicata foi identificada pela bióloga Marlene Barbosa e encontra-se no Herbário da UFPE sob número UFP. 69.655. A coleta foi autorizada pelo Companhia Pernambucana de Controle da Poluição Ambiental e de Administração de Recursos com autorização CA DRFB N° 120/2014.

O extrato foi preparado por trituração de 500g das folhas frescas, e submetido à infusão com água destilada (40° C por 10 minutos), sendo posteriormente filtrado. Em seguida, o solvente foi removido em liofilizador L101 da marca Liobras (McCloud *et al.*, 1988; Leite, 2003), e o resíduo seco foi armazenado a 5°C e utilizado para a confecção do creme de *Rhizophora mangle* L.

CONFECÇÃO DO CREME DE *Rhizophora mangle* L.

O extrato aquoso da folha de *Rhizophora mangle* liofilizado foi pesado em balança analítica digital (marca Shimadzu ATY 224) com a utilização de papel manteiga até atingir 3g e vertido em gral de porcelana. Em seguida foi solubilizado com água destilada e homogeneizado.

Em um vidro de relógio, pesou-se a emulsão aniônica até atingir 60g e verteu-se no gral contendo o extrato de *Rhizophora mangle* previamente solubilizado e homogeneizado até total solubilização. Aferido o pH e mantido entre 5,5 e 6,5. Por último foi envasado em pote plástico compondo o EAF R.mangle a 5% em creme.

DROGAS E PRODUTOS UTILIZADOS

Utilizou-se soro fisiológico a 0,9% nas feridas dos animais do grupo I (controle negativo). No grupo II (padrão), o creme comercial de dexpanthenol a 5%. E o creme com a concentração de 5% do extrato aquoso da folha de *Rhizophora mangle* L. (EAF R.mangle a 5% em creme) foi usado nos animais do grupo III (tratado).

MODELO DE EXCISÃO DA FERIDA

Os animais dos grupos I, II e III foram subdivididos em três subgrupos com 5 animais cada para eutanásia no 5°(subgrupo A), 10°(subgrupo B) e 15° (subgrupo C) dia de pós-operatório. Os animais foram previamente anestesiados com injeção intramuscular em região dorsal de associação de ketamina (10mg/Kg de peso corpóreo) e xilazina (1mg/Kg de peso corpóreo). Após a anestesia, realizou-se a pesagem dos animais em balança analógica e procedeu-se à tricotomia na região dorsal de aproximadamente 6cm² de área.

Em seguida, foi feita a antissepsia com clorexidine a 2%, e confecção de ferida cirúrgica, de aproximadamente 485 mm², com a utilização de bisturi com lâmina estéril número 15 até a exposição da fáscia muscular dorsal. Após a hemostasia, por compressão local, nos animais do grupo I foi aplicado 1 mL de soro fisiológico a 0,9%. No grupo II, aplicado creme de dexpanthenol a 5%, e no grupo III aplicado creme de EAF R.mangle a 5% (Figura 5.1).



Figura 5.1- Animais dos grupos I, II e III com as substâncias analisadas.

Legenda: a) animal do grupo I com soro fisiológico a 0,9%; b) animal do grupo II com creme de dexpanterol a 5% e c) animal do grupo III com EAF R.mangle a 5% em creme.

Nos dias subsequentes de pós-operatório, realizou-se a pesagem diária, registro das características macroscópicas das feridas, e em seguida a aplicação das respectivas soluções ou cremes uma vez ao dia, em cada grupo, sem realização de curativo até o dia da eutanásia.

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS FERIDAS CIRÚRGICAS

A atividade cicatrizante foi avaliada através da mensuração, por paquímetro universal da marca Digimess, dos tamanhos da ferida cirúrgica antes da utilização das substâncias – valores iniciais de comprimento e largura; e a avaliação final da cicatriz no 5º, 10º e 15º dia de pós-operatório.

Para obtenção das áreas da ferida foi utilizada equação $A = b \times h$. Onde: A representa a área em cm^2 , b o comprimento, e h a altura ou largura. O grau de contração expresso em percentual foi mensurado pela equação proposta por Ramsey *et al.* (1995): $100 \times (W_o - W_i) / W_o = \% \text{ de contração}$. Onde: W_o é a área inicial da ferida e W_i é a área final da ferida.

REMOÇÃO DA CICATRIZ E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Ao final de cada subgrupo no 10º (IB, IIB, IIIB) e 15º (IC, IIC, IIIC) dia, realizou-se nova intervenção cirúrgica com remoção da cicatriz com margem de 1 cm de pele em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do animal, e colocadas em solução tamponada de formol a 10%. Após fixação as amostras foram processadas em técnica histológica convencional. Os cortes dos blocos de parafina foram de $5\mu\text{m}$ e as preparações foram coradas em hematoxilina-eosina. Cada animal foi sacrificado através da câmara de CO_2 ao fim dos experimentos.

Procedeu-se à realização de microfotografias do local da cicatriz com *scanner Panoramic Midi* (3DHISTECH). Em seguida, foram utilizadas as microfotografias para mensurar a distância entre os dois epitélios, traçando-se uma reta entre as duas bordas da cicatriz. Esse processo foi realizado com o *software Panoramic Viewer* versão 1.15.4 ano 2014.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através das medidas de estatística descritiva: média, erro padrão da média ou desvio padrão e mediana e inferencialmente através dos testes estatísticos: F (ANOVA) na comparação entre grupos, e t-Student pareado na comparação da avaliação inicial com as demais avaliações. No caso de diferenças significativas pelo teste F (ANOVA) foram aplicados teste de comparações múltiplas de Tukey.

A margem de erro utilizada nas decisões dos testes estatísticos foi de 5%. O programa estatístico utilizado para digitação dos dados e obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) na versão 21.

RESULTADOS

No exame clínico das feridas cirúrgicas, evidenciou-se características diferentes entre os 3 grupos. No subgrupo IA, houve secreção purulenta em dois animais com resolução espontânea durante o processo cicatricial. No subgrupo IB a formação de tecido de granulação e crosta ocorreu em todos os animais. No IC, ao final do 15º dia, pequena crosta estava presente na maioria dos ratos.

As feridas dos subgrupos IIA e IIB apresentaram crostas; e no subgrupo IIC, houve um animal com secreção purulenta discreta, e tecido de granulação nos demais animais.

O grupo III revelou uma uniformidade do aspecto das feridas, com ausência de secreções purulentas em feridas operatórias, e de forma regular, o subgrupo IIIC apresentou cicatriz de bom aspecto macroscópico (Figura 5.2).



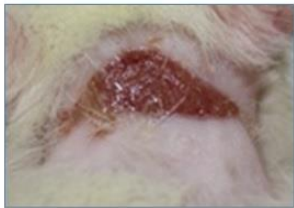









Soro Fisiológico				
Dexpantenol				
<i>Rhizophora mangle</i> L.				
	0 dia	5º dia	10º dia	15º dia

Figura 5.2 - Aspectos macroscópicos das feridas cirúrgicas nos três grupos no 0, 5º, 10º e 15º dia de pós-operatório.

Neste estudo, a análise morfométrica das feridas cirúrgicas através das áreas das lesões no 5º, 10º e 15º pós-operatório está representada na Tabela 5.1.

No 5º dia, os três grupos tiveram redução da área da ferida, porém sem diferença estatística significativa. No 10º dia de pós-operatório, os grupos II e III foram semelhantes quando comparados ao grupo I. No 15º dia de pós-operatório, a medição da área final no grupo II foi maior que os demais grupos.

Tabela 5.1- Áreas das feridas (mm²) e percentagem da contração da área da ferida segundo o grupo e o tempo de pós-operatório

Tempo de avaliação após cirurgia	Soro fisiológico (n = 5) Média + EPM (Mediana)	Dexpantenol (n = 5) Média + EPM (Mediana)	<i>Rhizophora mangle</i> (n = 5) Média + EPM (Mediana)	Valor de p
Inicial	485,53 ± 0,00 (485,53)	485,53 ± 0,00 (485,53)	485,53 ± 0,00 (485,53)	
5 dias	223,00 ± 19,12 (230,00)	238,04 ± 39,05 (260,00)	226,20 ± 20,67 (228,00)	p ⁽¹⁾ = 0,922
10 dias	93,60 ± 17,22 ^(B) (88,00)	30,30 ± 4,29 ^(A) (34,00)	45,40 ± 2,82 ^(A) (44,00)	p ⁽¹⁾ = 0,003*
15 dias	17,71 ± 3,81 ^(A) (16,00)	25,70 ± 3,47 ^(B) (24,00)	18,40 ± 4,92 ^(A) (18,00)	p ⁽¹⁾ = 0,346
Valor de p	p ⁽²⁾ < 0,001*	p ⁽²⁾ = 0,003*	p ⁽²⁾ < 0,001*	
	p ⁽³⁾ < 0,001*	p ⁽³⁾ < 0,001*	p ⁽³⁾ < 0,001*	
	p ⁽⁴⁾ < 0,001*	p ⁽⁴⁾ < 0,001*	p ⁽⁴⁾ < 0,001*	
% contração com 5 dias	54,07 ± 3,94 (52,63)	50,97 ± 8,04 (46,45)	53,41 ± 4,26 (53,04)	p ⁽¹⁾ = 0,922
% contração com 10 dias	80,72 ± 3,55 ^(B) (81,88)	93,76 ± 0,88 ^(A) (93,00)	90,65 ± 0,58 ^(A) (90,94)	p ⁽¹⁾ = 0,003*
% contração com 15 dias	96,35 ± 0,78 (93,41)	94,71 ± 0,71 (95,06)	96,21 ± 1,01 (96,29)	p ⁽¹⁾ = 0,346

(*): Diferença significativa a 5%.

(1): Através do teste F (ANOVA) para comparação entre os grupos em cada avaliação e para os percentuais de contração com 5 dias, 10 dias e 15 dias com comparações de Tukey.

(2): Através do teste de t-Student pareado para comparações entre as avaliações do tempo inicial e 5 dias em cada grupo.

(3): Através do teste de t-Student pareado para comparações entre as avaliações do tempo inicial e 10 dias em cada grupo.

(4): Através do teste de t-Student pareado para comparações entre as avaliações do tempo inicial e 15 dias em cada grupo.

Obs. Se as letras entre parêntesis são distintas se comprova diferença significativa entre os grupos correspondentes.

A Figura 5.3 também expõe a percentagem de contração das áreas da ferida, o que corrobora com os valores absolutos. Interessante notar que a área final e o grau de contração da cicatriz do grupo I foram semelhantes ao grupo III.

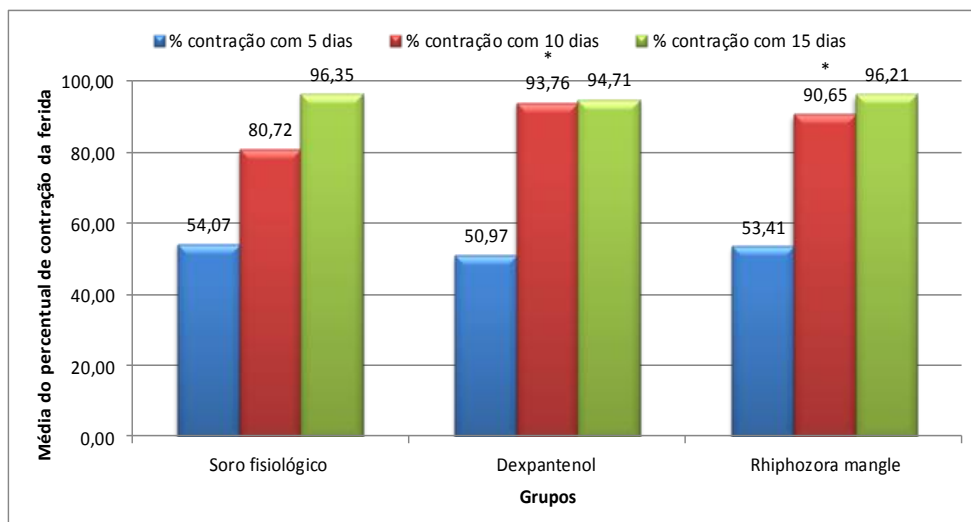


Figura 5.3- Médias do percentual de contração das feridas em relação aos grupos.

Na avaliação histomorfométrica foi evidenciada reepitelização parcial nos grupos IB, IIB e IIIB no 10^o dia com valores de média + erro padrão de 3.498,49 ± 232,40, 706,28 ± 233,73, e 1.759,66 ± 613,94 respectivamente. Em análise estatística, verificou-se que os grupos II e III não eram diferentes estatisticamente entre si, porém diferentes do grupo I com $p = 0,013$ (Figura 5.4).

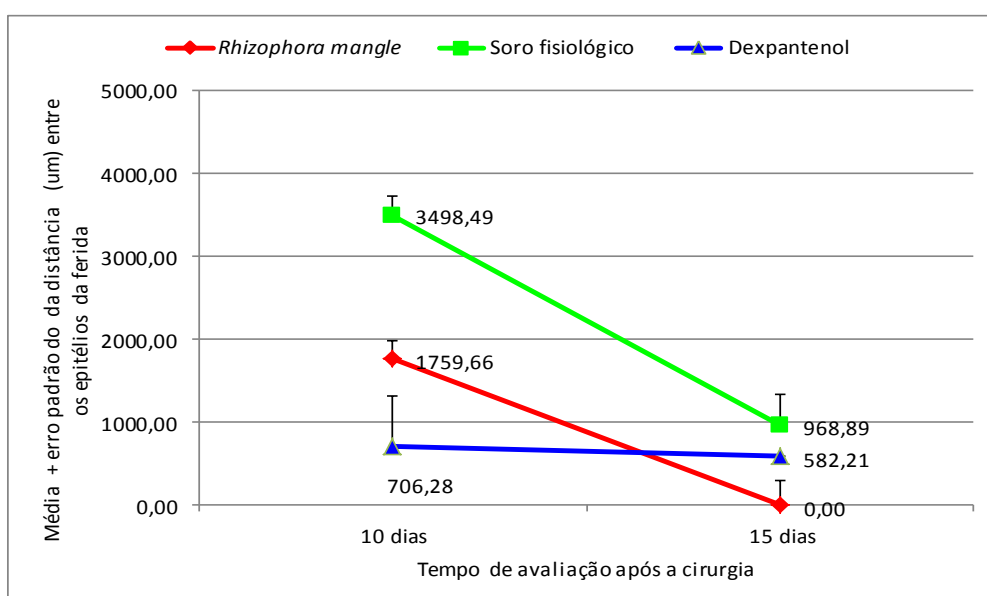


Figura 5.4- Média da diferença da distância entre os epitélios em relação ao tempo.

A Tabela 5.2 mostra uma redução das médias logarítmicas das distâncias dos epitélios em 10 dias e 15 dias nos três grupos, entretanto a única diferença significativa ($p < 0,05$) foi registrada no grupo com *Rhizophora mangle* L. com $p = 0,016$. Na comparação entre grupos, no 15º dia, o grupo III (tratado) apresentou melhores resultados com $p = 0,033$ em relação aos grupos I e II.

Tabela 5.2- Avaliação estatística da distância entre as bordas dos epitélios através de logaritmo decimal + 1, segundo o grupo e o tempo de avaliação.

Tempo de avaliação após cirurgia	Soro fisiológico (n=10) Média + EPM (Mediana)	Dexpantenol (n=10) Média + EPM (Mediana)	<i>Rhizophora mangle</i> (n=10) Média + EPM (Mediana)	Valor de p
10 dias	3,54 ± 0,03 (3,55)	2,33 ± 0,59 (2,85)	2,65 ± 0,67 (3,22)	$p^{(1)} = 0,264$
15 dias	2,45 ± 0,62 ^(B) (2,96)	1,26 ± 0,77 ^(AB) (0,00)	0,00 ± 0,00 ^(A) (0,00)	$p^{(1)} = 0,033^*$
Valor de p	$p^{(2)} = 0,150$	$p^{(2)} = 0,301$	$p^{(2)} = 0,016^*$	

(*): Diferença significativa a 5%.

(1): Através do teste F (ANOVA) para comparações entre os grupos na avaliação de 10 e 15 dias com comparações do teste de Tamhane.

(2): Através do teste t-Student para comparações entre os tempos de avaliação em cada grupo. Obs. Se as letras entre parêntesis são distintas se comprova diferença significativa entre os grupos correspondentes.

No 15º dia de pós-operatório, o grupo III não apresentou distância entre os epitélios com 100% das cicatrizes reepitelizadas. O grupo II apresentou valor inesperado com pouca redução da distância entre os epitélios (Figura 5.5).

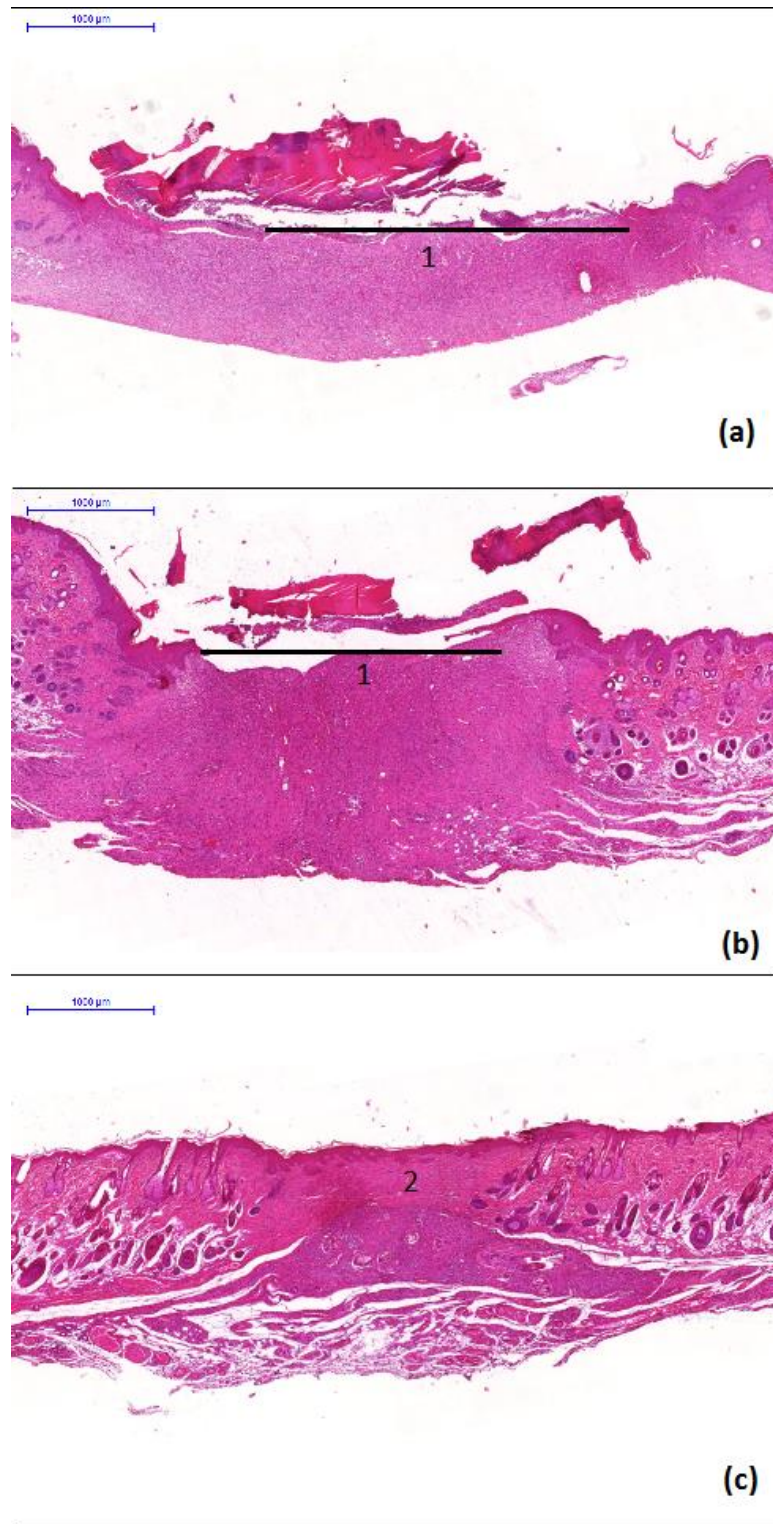


Figura 5.5- Fotografias das lâminas no 15^o dia de pós-operatório dos animais do grupo I, II e III. Legenda: (a) animal do grupo I (controle negativo), (b) animal do grupo II (padrão) e (c) animal do grupo III (tratado). 1: distância entre os epitélios 2: reepitelização completa.

DISCUSSÃO

A inspeção das feridas operatórias revelou que o grupo I e II apresentaram crostas e tecido de granulação com processos infecciosos das feridas durante o período do estudo. Entretanto, o grupo III, apresentou crostas e cicatriz sem infecção de ferida cirúrgica. Estes resultados podem ser explicados por diferentes mecanismos de ação dos compostos secundários presentes na planta. O gênero *Rhizophora* possui determinadas substâncias presentes no extrato, como por exemplo, os taninos e polifenóis (Bandaranayake, 2002), que são capazes de interagir com estruturas peptídicas formando grandes aglomerados, o que mais uma vez explicaria a formação da película protetora (Fernandez *et al.*, 2002; Perera *et al.*, 2010).

Chen *et al.* (1994) utilizaram preparação a base de taninos em feridas cutâneas. Esta película deve estar relacionada ao complexo formado por taninos não hidrolizáveis com proteínas, o qual pode exercer uma ação protetora isolando a ferida do ambiente. Resultados semelhantes foram encontrados por Fernandez *et al.* (2002) que observaram uma película vermelha escura cobrindo as feridas de cisto pilonidal nos pacientes tratados com o extrato de caule de *R. mangle* L. Não houve infecções secundárias no local, as feridas estavam secas durante todo o processo de avaliação clínica.

Perera *et al* (2010) avaliando a atividade anti-ulcerogênica de extrato de *R. mangle* L. mostraram a presença de uma espessa camada aderente à mucosa gástrica sugerindo uma barreira física com propriedades gastroprotetoras semelhantes as observadas em feridas cutâneas.

Outra hipótese é que a ação antibacteriana dos taninos diminua o risco de infecção de ferida, evitando o retardo da cicatrização. Melchor *et al.* (2001) estudaram o extrato aquoso do caule da *R. mangle* L. demonstrando propriedades antibacterianas, atribuindo a ação aos constituintes polifenólicos presentes no extrato.

Estudos fitoquímicos de extratos do caule da *R. mangle* L. evidenciaram a presença de taninos. (Melchor *et al.*, 2001; Bandaranayake, 2002; Marrero *et al.*, 2006; Berenguer *et al.*, 2006; De- Faria *et al.*, 2012). Bueno *et al* (2014) reforçarem

que os taninos influenciam na fisiologia das células da pele através das suas propriedades farmacológicas, aumentando a proliferação celular.

Os resultados da avaliação das áreas das feridas cirúrgicas no 10º dia de pós-operatório mostraram uma redução superior dos grupos II e III quando comparados ao grupo I. Estes resultados corroboram com os estudos pré-clínicos de Sánchez *et al* (2009), que estudaram a ação cicatricial de extratos de *R. mangle L.* em feridas cutâneas abertas de ratos com redução das áreas no 7º dia de pós-operatório.

Em todos os grupos no 15º dia de pós-operatório, houve redução das áreas das feridas, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Sabe-se que o processo cicatricial depende do tempo da injúria inicial, e que a terceira fase das etapas de cicatrização inclui o remodelamento da cicatriz com contração das feridas ou até mesmo a sua hipertrofia (Kirsner *et al.*, 2008).

Contudo, as feridas abertas apresentam problemas clínicos diferentes das feridas incisais e suturadas. Embora os processos morfológicos e químicos básicos, que atuam na ferida fechada, sejam os mesmos nas feridas abertas em cicatrização, a contração torna-se um aspecto importante nas feridas abertas, e a epitelização assume um papel proeminente (Coelho *et al*, 1999). Os dois processos parecem ser independentes (Madden & Arem, 1991). A contração da ferida é favorecida nos locais onde a pele é mais frouxa e móvel, como a pele do tronco (Ramsey *et al.*, 1995). A mobilidade cutânea depende da direção das “linhas de Langer”, que é determinada pela disposição do sistema fibrilar da pele, sobretudo das fibras elásticas. A distensão máxima acontece em direção transversal às linhas de Langer, motivo pelo qual a contração da ferida ocorre nesta direção (Algower, 1977).

Portanto, sugerimos que o resultado das áreas finais ocorreram pelo formato da ferida cirúrgica com aumento da força de tensão na terceira fase da cicatrização. Para a produção das feridas de forma quadrada ou retangular, a pele foi incidida no sentido longitudinal e transversal, determinando aumento da área, devido à distensão provocada pela incisão transversal às linhas de Langer, conforme ressaltou Algower (1977).

Apesar do vasto uso popular da *R. mangle L.*, os estudos correlacionando com poder cicatrizante sempre utilizaram os extratos provenientes do caule, porém a

população geral usa infusões das folhas pela facilidade de coleta. (Medeiros *et al*, 2004; Pinto *et al.*, 2006; Giraldi e Hanazaki, 2010). Nosso estudo, utilizou o extrato da folha com veículo creme a fim de avaliar seu potencial e corroborar com uso popular.

Este estudo, ao mensurar a distância entre os epitélios, demonstrou que no 10º dia de pós-operatório o EAF *R.mangle* a 5% em creme foi semelhante ao dexpanthenol a 5% em creme, e ambos diferentes do grupo em que foi usado o soro fisiológico a 0,9%. Este dado sugere que o EAF *R.mangle* a 5% em creme contribui para acelerar a reepitelização. O dexpanthenol já é comercializado e tem um amplo uso na medicina convencional com bons benefícios: cicatrizante, hidratante e mantenedor do trofismo mucocutâneo (Stozkowska e Piekos, 2004; Heise *et al*, 2012 e Biro *et al*, 2003).

No 15º dia de pós-operatório, todos os animais tratados com EAF *R.mangle* a 5% em creme apresentaram reepitelização completa, com significância estatística quando comparado aos grupos I e II, corroborando com os estudos científicos que sugerem que o extrato desta planta possui efeitos cicatrizantes. (Perera *et al.*, 2001 e Fernandez *et al*, 2002).

Perera *et al.* (2001) avaliaram o efeito gastroprotetor do extrato do caule da *R. mangle* L., o qual foi ofertado antes da ingesta de solução com ácido clorídrico e etanol em ratos *Wistar*, evidenciando menores lesões ulcerosas além de menor quantidade das lesões no grupo que recebeu as maiores concentrações do extrato de *R. mangle* L. em detrimento dos grupos que receberam cimetidina e água destilada. Os autores sugeriram que o efeito citoprotetor deve ser proveniente de compostos secundários como o tanino. Acrescentaram também alterações na composição do muco como proteção da mucosa gástrica ao se utilizar o extrato em altas doses.

Estudos de avaliação da reepitelização de feridas com extratos de *R. mangle* L. não foram encontrados na literatura, o que dificulta a comparação com outros trabalhos. Porém, estudos com compostos secundários presentes na planta sugerem que o efeito cicatrizante seja devido aos compostos fenólicos.

Estudo com extratos de caule de *Staphodea campanulata* atribuiu à presença de fitoquímicos como flavonóides e taninos a capacidade de cicatrização de feridas. Estes constituintes são conhecidos por possuírem propriedades antimicrobianas e antioxidantes. (Ofori-Kwakye *et al.*, 2011) O efeito antimicrobiano exibido pelo extrato impede a formação de toxinas microbianas, que tendem a inibir a regeneração de células, enquanto que a sua ação antioxidante remove o excesso de proteases e espécies reativas de oxigênio das feridas e protege os inibidores da protease do dano oxidativo (Houghton *et al.*, 2005).

Os flavonóides presentes no extrato de *S. campanulata* são conhecidos por reduzir a peroxidação, impedindo ou retardando o aparecimento de necrose celular, bem como melhorando a vascularização. Flavonóides e taninos também promovem a cicatrização de feridas, principalmente devido às suas propriedades adstringentes e antimicrobianas, que parecem ser responsáveis pela contração da ferida e um aumento da taxa de epitelização (Tsuchiya *et al.*, 1996).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que o uso tópico do EAF. *R. mangle* a 5% em creme apresenta efeito significativo na reepitelização de feridas cirúrgicas em ratos. Partindo do princípio que a cicatrização é um processo dinâmico e multifatorial, este estudo evidencia a importância da realização da histomorfometria na correlação com os achados morfométricos. Contudo, o isolamento de componente (s) da planta responsável(is) pela influência positiva no processo de reparação de tecidos deve ser realizado.

REFERÊNCIAS

- Algower, M. (1977) Manual de Cirurgia, Barcelona: Científicomédica, 3-14.
- Arons, J.A., Wainwright, D.J., Jordon, R.E. (1992) The surgical applications and implications of cultured human epidermis: a comprehensive review. *Surgery*. **111**(1), 4-11
- Balbino, C.A., Pereira, L.M., Curi, R. (2005) Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol **41**, n. 1, jan./mar., 27-51
- Bandaranayake, W.M. (2002) Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetlands Ecology and Management*, **10**, 421–52
- Berenguer, B., Sanchez, L.M., Quilez, A., Lopez-Barreiro, M., Haro, O., Galvez, J., Martín, M.J. (2006) Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. *Journal of Ethnopharmacology*. **103**, 194–200
- Biro, K., Thaci, D., Ochsendorf, F.R, Kaufmann, R., Boehcke, W.H. (2003) Efficacy of dexpanthenol in skin protection against irritation: a double-blind, placebo-controlled study. *Contact Dermatitis*, **49**, 80–84
- Bueno, F.G., Panizzon, G.P., Mello, E.V.S.L., Lechtenberg, M., Petereit, F., Mello, J.C.P., Hensel, A. (2014) Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Fitoterapia* **99**, 252–260
- Chen, Z.P, Cai, Y., Phillipson, J.D., (1994). Studies on the Anti-Tumour, Anti-Bacterial, and Wound-Healing Properties of Dragon's Blood. *Planta Med*, **60**, 541-545.
- Clark, R.A.F. (1996) Wound repair: overview and general considerations. In: Clark, R.A.F. (Ed.). *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum Press, 3-50

- Currie, L.J., Sharpe, JR., Martin, R. (2001) The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast Reconstr Surg.* **108**(6):1713-1726
- Coelho, M.C.O., Rezende, C.M.F., Tenorio, A.P.M. (1999) Contraction of wound after cover with temporary skin substitutes. *Ciência Rural*, **29** (2), 297-303
- de Moraes, A.,M., Annichino-Bizachi J.M., Rossi, A.B.R. (1998) Use of autologous fibrin glue in dermatologic surgery. *Rev Paul Med* **116**, 1747-1752.
- Dealey, C. (1996) Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras. Coordenação e revisão de Rúbia Aparecida Lacerda; tradução Eliane Kanner. São Paulo: Atheneu, p. 1 – 25.
- De-Faria, F. M., Almeida, A.C. A., Ferreira, A.L., Dunderb, R. J.,Takayamab, C., Silva., M.S., Silva, M. A., Vilegasc, W., Rozzad, A. L., Pellizzond, C. H., Tomae, W.,Souza-Brito, A.R.M. (2012) Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. *Journal of Ethnopharmacology.* **139**, 234– 243.
- de Armas, E., Sarracent, Y., Marrero, E., Fernández, O., Branford-White, C., (2005) Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract (RMABE) in the treatment of aphthous ulcers: a pilot study. *Current Medical Research and Opinion* **21**,1711–1715
- de-Faria, F.M., Luiz-Ferreira, A., Almeida, A.C.A., Barbastefano, V., Silva, M.A., Vilegas, W., Rozza, A.L., Pellizzon, C.H., Souza-Brito, A.R.M. (2009) Role of SOD in the protection of *Rhizophora mangle* on gastric injury induced by ethanol, ischaemia–reperfusion and acetic acid in rats. *Planta Medica.* **75**, 1071
- Falcão, S.C., Evêncio Neto, J., Coelho, A.R.B. (2008) Incorporation by host tissue of two biomaterials used as repair of defects produced in abdominal wall of rats. *Acta. cir. bras.* **23** (1), 78-83
- Fernandez, O., Capdevila, J.Z., Dalla, G., Melchor, G. (2002) Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. *Fitoterapia.* **73**, 564–568
- Giraldi, M., Hanazaki, N. (2010) Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. *Acta bot. bras.* **24** (2), 395-406

Heise, R., Skazik, C., Marquardt, Y., Czaja, K., Sebastian, K., Kurschat, P., Gan, L., Denecke, B., Ekanayake-Bohlig, S., Wilhelm, K.-P., Merk, H.F., Baron, J.M. (2012) Dexpanthenol Modulates Gene Expression in Skin Wound Healing in vivo. *Skin Pharmacol Physiol*, **25**, 241–248

Houghton, P.J., Hylandas, P.J., Mensah, A.Y., Hensel, A., Deters, A.M. (2005) In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology*, **22**, 100-107

Kirsner, R.S. (2008) Cicatrização de feridas. In: Bologna, J.L., Jorizzo, J.L., Rapini, R.P.(Ed), *Dermatologia*. Rio de Janeiro: Elsevier., **141**, 2147-2158

Leite, S.P. (2003) *Indigofera Suffruticosa* Mill: ensaio fitoquímico e ações biológicas biológicas. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Madden, J., Arem, A. (1991) A cicatrização das feridas. Aspectos biológicos e clínicos. In: SABISTON, D. *Tratado de Cirurgia*. 14 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 156-168

Mandelbaum, S.H., Di Santis, E.P., Mandelbaum, M.H.S. (2003) Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares: parte I. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. **78** (5), 525-542

Marrero, E., Sánchez, J., Armas, E., Escobar, A., Melchor, G., Abad, M. J., Bermejo, P., Villar, A. M., Megías, J., Alcaraz, M. J. (2006) COX-2 and sPLA2 inhibitory activity of aqueous extract and polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). *Fitoterapia*. **77**, 313–315

McCloud, T., Neme J., Muschik, G., Sheffield, H., Quesenberry, P., Suffness, M. (1988) Extraction of Bioactive Molecules from plants . *Proceedings of the International Congress on Natural Products Research*, Park City, UT, 17–21.

Medeiros, M.F.T., Fonseca, V.S., Andreato, R.H.P. (2004) Plantas medicinais e seus usos pelos sitiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. *Acta bot. bras.* **18** (2), 391-399

Melchor, G., Armenteros, M., Fernandez, O., Linares, E., Fragas, I. (2001) Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* Bark. *Fitoterapia*. **72**, 689-691.

Miranda, L.T.G.S. Uso da tintura de arnica em feridas cutâneas abertas em ratos. (2001) [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo.

Ofori-Kwakye, K., Kwapong, A.A., Bayor, M.T. (2011) Wound healing potential of methanol extract of *Spathodea campanulata* stem bark formulated into a topical preparation. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, **8** (3), 218-223

Perera, L.M.S, Escobar, A., Souccar, C., Remigio, M.A., Mancebo, B. (2010) Pharmacological and toxicological evaluation of *Rhizophora mangle* L., as a potential antiulcerogenic drug: Chemical composition of active extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. **2** (4), 56-63

Perera. L.M.S., Ruedas, D., Gómez, B.C. (2001) Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. *Journal of Ethnopharmacology*, **77**, 1–3

Petroianu, A., Silva, A.A., Melo, M.A.B. (2001) Comparação entre cola biológica e sutura em cicatrização de pele. *Rev Col Bras Cir* **28**:249-253

Pinto, E.P.P., Amorozo, M.C.M., Furlan, A. (2006) Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil. *Acta bot. bras.* **20** (4), 751-762

Revathi, P., Senthinath, T. J., Thirumalaikolundusubramanian, P. and Prabhu, N. (2013) Medicinal Properties of Mangrove Plants – an overview. *International Journal of Bioassays*. 02 (**12**): 1596-1600

Roig, J.T. (1988) Plantas medicinales, aromaticas y venenosas de Cuba. Editorial Científica y Técnica. La Havana-Cuba. **164**, 606-607

Ramsey, D.T., Pope, E.R., Wagner- Mann, C., Berg, J.N., Swain, S.F. (1995) Effects of three occlusive dressing materials on healing of full thickness skin wounds in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.**56**, n.7, 941-949

Sánchez, J., Melchor, G., Martinez, G., Escobar, A., Faure, R. (2006) Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. *Fitoterapia* **77**, 141–143

Sánchez, J., Faure, R., Martínez, G., Vega, E., Fernández, O. (2009) Propiedades antioxidantes de *Rhizophora mangle* (L.) y su relación con el proceso de curación de heridas en ratas. *Rev. Salud Anim*, **31** (3), 170-175

Stozkowska, W., Piekos, R. (2004) Investigation of some topical formulations containing dexpanthenol. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **61** (6), 433-437

Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T. and Iinuma, M. (1996) Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. **50**, 27-34

6. CONCLUSÕES

Diante dos experimentos realizados no âmbito deste estudo, a presença de taninos nos extratos aquosos das folhas, caule e raiz de *Rhizophora mangle* L. está de acordo com o uso tradicional desta planta para tratamento de feridas.

A realização da citotoxicidade revelou efeito proliferativo dos extratos das partes da planta em relação ao controle, podendo contribuir sinergicamente na cicatrização de feridas.

Para finalizar, a avaliação histomorfométrica do uso tópico do EAF. *R. mangle* a 5% em creme apresentou efeito significativo na reepitelização de feridas cirúrgicas em ratos com fechamento completo entre os epitélios e ausência macroscópica de infecções. Já a avaliação morfométrica no 15º dia do experimento não mostrou diferenças estatísticas entre a cicatriz dos animais tratados com EAF. *R. mangle* a 5% em creme, soro fisiológico e dexpanthenol.

Diante da certeza que a cicatrização é um processo dinâmico, multifatorial e histológico, este estudo reforça a importância da realização da histomorfometria na correlação com os achados morfométricos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos que produzam inovações terapêuticas tem importância científica, e social. A execução de um estudo translacional gera perspectivas futuras e desenvolve linhas de pesquisas com aprimoramento de técnicas, além de publicações científicas.

A equipe está desenvolvendo o terceiro artigo científico original derivado deste mesmo trabalho. E, junto com o Departamento de Química Fundamental, estão sendo isolados os compostos presentes nos extratos de *Rhizophora mangle* L. para definição das estruturas moleculares.

A pesquisa clínica está em processo de definição metodológica mas desde já será multicêntrica e duplo cega com estudos histológicos para avaliação no processo cicatricial.

REFERÊNCIAS

- ACCORINTE, M.L.R.; LOQUERCIO, A.D.; REIS, A. MUENCH, ARAUJO, V.C. **Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with the different components from a total-etch, three-step adhesive system.** Dent Mater, v.21, p, 599-607, 2005.
- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. **As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16, p.678-689, 2006.
- ALVES, C.F.; ALVES, V.B.F; ASSIS, I.P.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; UBER-BUCEK, E., DAL-SECCO, D., CUNHA, F.Q.; REHDER, V.L.G; NAPIMOGA, M.H. **Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.61, n.8, p.1097-104, 2009.
- ALOGOWER, M. **Manual de Cirurgia.** Científicomédica, Barcelona, p.3-14, 1977.
- ALONSO, J.R.. **Tratado de Fitomedicina - bases clínicas y farmacológicas.** ISIS Ediciones S. R. L., Buenos Aires, Argentina. p. 350-354, 1998.
- ANDRADE, J.P.A.; PIGNI, N.B.; TORRAS-CLAVERIA, L.; GUO, Y.;BERKOV, S.; REYES-CHILPA, R.; AMRANI, A.E.; ZUANAZZI, J.A.S.; CODINA, C.; VOLADOMAT, F.; BASTIDA, J. **Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity.** Rev. latinoam. Quím, v.40, n.2, ago, 2012.
- ARAÚJO, J. M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática.** 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, p.477, 2008.
- ARGENTA, S.C.; ARGENTA, L.C.; GIACOMELLI, S.R.; CEZAROTTO, V.S. **Plantas medicinais: cultura popular versus ciência.** Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI, v.7, n.12, p.51-60, 2011.
- ARONS, J.A.; WAINWRIGHT, D.J.; JORDON, R.E. **The surgical applications and implications of cultured human epidermis: a comprehensive review.** Surgery, v. 111, n.1, p. 4-11, 1992.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. **Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 41, n. 1, jan./mar., p. 27-51, 2005.

BALUNAS, M.J., KINGHORN, A.D. **Drug discovery from medicinal plants. Natureceuticals (natural products), nutraceuticals, herbal botanicals, and psychoactives: drugs discovery and drug-drug interactions.** *Life Sciences*, Baltimore, v.78, cap.5, p. 429-548, 2005.

BANDARANAYAKE, W.M. **Traditional and medicinal uses of mangroves.** *Mangroves and Salt Marshes*, v. 2, n.3, p. 133–148, 1998.

BANDARANAYAKE, W.M. **Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants.** *Wetlands Ecology and Management*, v. 10, p. 421–452, 2002.

BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. **Avaliação da Toxicidade.** In: OGA, S.; CAMARGO, M.M..A.; BATISTUZZO, J.A.O. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. p.69-79.

BARROS, H.M.; ESKINNAZI-LEÇA, E.; MACEDO, S.J.; LIMA, T. **Gerenciamento participativo de estuários e manguezais.** Recife: Ed. Universitária da UFPE, p. 240, 2000.

BERENGUER, B.; SANCHEZ, L.M.; QUILEZ, A., LOPEZ- BARREIRO, M.; HARO, O.; GALVEZ, J.; MARTIN, M.J. **Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 103, p. 194–200, 2006.

BESSA, N.G.F.; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U.; QUIRINO, M.S.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; ALVES, A. **Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins.** *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.15, n.4, supl.I, p.692-707, 2013.

BIRO, K.; THACI, D., OCHSENDORF, F.R; KAUFMANN, R.; BOECHCKE, W.H. Efficacy of dexpanthenol in skin protection against irritation: a double-blind, placebo-controlled study. *Contact Dermatitis*, v.49, p.80–84, 2003.

BUENO, F.G.; PANIZZON, G.P.; MELLO, E.V.S.L.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F., MELLO, J.C.P.; HENSEL, A. **Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from Poincianella pluviosa stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts.** *Fitoterapia*, v.99, p.252–260, 2014.

BVMABF. **Biblioteca Virtual do Meio Ambiente da Baixada Fluminense.** < <http://www.bvambientebf.uerj.br/>> Acesso em 07 fev de 2015.

BRAGA, F.; AYRES-SARAIVA, D.; GATTAS, C.R.; CAPELLA, M. A. M. **Oleanolic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (P-glycoprotein): Possible use in cancer chemotherapy.** *Cancer Letters*, v. 248, n.1, p. 147-152, 2007.

BRASIL. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013: acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências.** Disponível em < <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94074.pdf>> Acesso em 30 de junho de 2014.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medicamentos fitoterápicos.** Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+fitoterapicos>> . Acesso em 20.fev.2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos,** Brasília, p. 148, 2009.

CANNAS, A. **Tannins: fascinating but sometimes dangerous molecules.** Cornell University. Department of Animal Science. Disponível em <

<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin.html>> Acesso em: 20.abr.2015, 2008.

CAO, T.; SAW, T.Y.; HENG, B.C.; LIU, H.; YAP, A.U.J.; NG, M.L. **Comparison of different test models for assessment of cytotoxicity of composites resins.** Appl Toxicol J, v. 25, p. 101-108, 2005.

CARVALHO, P.T.C.; MAZZER, N.; REIS, F.A.; BELCHIOR, A.C.G.; SILVA, I.S. **Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats.** Acta Cir. Bras, v. 21, p. 177-183, 2006.

CHAPMAN, V.J. **Mangrove phytosociology.** Tropical Ecology, v. 11, p. 1–19, 1970.

CHABARIBERI, R.A.O.; POZZI, A.C.S.; ZERAIK, M.L.; YARIWAKE, J.H. **Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV.** Brazilian Journal of Pharmacognosy. v.19, n.4, p.860-864, Out./Dez, 2009.

CHARKRABORTY, A.; BRANTNER, A.; MUKAINAKA, T.; NOBUKUNI, Y.; KUCHIDE, M.; KONOSHIMA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. **Cancer chemopreventive activity of *Achyranthes aspera* leaves on Epstein–Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis.** Cancer Letters, v.177, p.1-5, 2002.

CHEN, Z.P.; CAI, Y.; PHILLIPSON, J.D. **Studies on the Anti-Tumour, Anti-Bacterial, and Wound-Healing Properties of Dragon's Blood.** Planta Med, v.60, p.541-545, 1994.

CINGI, M. R.; DE ANGELIS, I.; FORTUNATI, E. E.; REGGIANI, D.; BIANCHI, V.; TIOZZO, R.; ZUCCO, F. **Toxicology in vitro.** v.5, p.119-125, 1991.

CLARK, R.A.F. **Wound repair: overview and general considerations.** In: Clark, R.A.F. (Ed.). The molecular and cellular biology of wound repair. New York: Plenum Press, p. 3-50, 1996.

COELHO, M.C.O.; REZENDE, C.M.F.; TENORIO, A.P.M. **Contraction of wound after cover with temporary skin substitutes**. *Ciência Rural*, v.29, n.2, p.297-303, 1999.

COELHO-FERREIRA, M. **Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil)**. *Journal of Ethnopharmacology*, v.126, p.159-175, 2009.

CORDELL, G.A. **Introduction to alkaloids: A Biogenetic approach**. Nova York: John-Wiley & Sons, p. 208, 1981.

CORRÊA, J.C.R., SALGADO, H.R.N. **Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão**. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.13, n.4, p.500-506, 2011.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. In: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1318, 2000.

CURRIE, L. J.; SHARPE, J.R.; MARTIN, R. **The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review**. *Plast Reconstr Surg*, v. 108, n. 6, p. 1713-1726, 2001.

DA SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; DA CONCEIÇÃO, G. M. **Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão**. *Scientia Plena*, v. 6 Suppl 2, p.1-17, 2010.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras**. Coordenação e revisão de Rúbia Aparecida Lacerda; tradução Eliane Kanner. São Paulo: Atheneu, p. 1 – 25, 1996.

DELGADO-MENDEZ, P.; HERRERA, N.; CHAVEZ, H.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; CORTES, F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. **New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania***. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16, n.3, p. 1425-1430, 2008.

DEMIRCI, M; HILLER, K.A.; BOLS, C.; GALLER, K.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H. **The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives.** Dent Mater, v. 24, p, 362-371, 2008.

DE ARMAS, E.; SARRACENT, Y.; MARRERO, E.; FERNANDÉZ, O., BRANDDORD-WHITE, C. **Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract (RMABE) in the treatment of aphthous ulcers: a pilot study.** Current Medical Research and Opinion, v.21, p.1711–1715, 2005.

DE MORAES, A.,M.; ANNICHINO-BIZACHI, J.M.; ROSSI, A.B.R. **Use of autologous fibrin glue in dermatologic surgery.** Rev Paul Med, v.116, p. 1747-1752, 1998.

DE-FARIA, F.M.; LUIZ-FERREIRA, A.; ALMEIDA, A.C.A.; BARBASTEFANO, V.; SILVA, M.A.; VILEGAS, W.; ROZZA, A.L.; PELLIZZON, C.H.; SOUZA-BRITO, A.R.M. **Role of SOD in the protection of *Rhizophora mangle* on gastric injury induced by ethanol, ischaemia–reperfusion and acetic acid in rats.** Planta Medica, v.75, p.1071, 2009.

DE-FARIA, F. M.; ALMEIDA, A.C.A.; FERREIRA, A.L.; DUNDERB, R. J.; TAKAYAMAB, C.; SILVA, M.S.; SILVA, M. A.; VILEGASC, W., ROZZAD, A. L.; PELLIZZOND, C. H.; TOMAE, W.; SOUZA-BRITO, A.R.M. **Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L.** Journal of Ethnopharmacology, v. 139, p. 234– 243, 2012.

EDREVA, A.; VELIKOVA, V.; TSONEY, T.; DAGNON, S.; GUREL, A.; AKTAS, L.; GESHEVAL, E. **Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms.** Gen Appl Plant Physiol, v. 34, n. 1-2, p. 67-78, 2008.

EWEL, K. C.; TWILLEY, R. R.; ONG, J. E. **Different kinds of mangrove forests provide different goods and services.** Global Ecology and Biogeography Letter, v. 7, n.1, p. 83-94, 1998.

FENTEANY, G.; JANMEY, P.A., STOSSEL, T.P. **Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets.** Curr Biol, v. 10, n.14, p. 831–838, 2000.

FERNANDEZ, O.; CAPDEVILA, J.Z.; DALLA, G.; MELCHOR, G. **Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds.** Fitoterapia, v. 73, p. 564–568, 2002.

FALCÃO, S.C.; EVÊNCIO NETO, J.; COELHO, A.R.B. **Incorporation by host tissue of two biomaterials used as repair of defects produced in abdominal wall of rats.** Acta. cir. bras., 23, N. 1, p. 78-83, 2008.

GERMONPREZ, N.; MAES, L.; PUYVELDE, L.V.; TRI, M.V.; TUAN, D.A.; DE KIMPE, N. **In Vitro and in Vivo Anti-Leishmanial Activity of Triterpenoid Saponins Isolated from *Maesa balansae* and Some Chemical Derivatives.** J. Med. Chem, v.48, p.32-37, 2005.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. **Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil.** Acta bot. bras., v.24, n.2, p.395-406, 2010.

GLAUERT, A.M.; DINGLE, J.T.; LUCY, J.A. **Action of saponin on biological cell membranes.** Nature, v.196, p.952-955, 1962.

GURIB-FAKIM, A. **Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow.** Molecular Aspects of Medicine, v. 27, p.1–93, 2006.

HARBORNE, J. B. **Classes and functions of secondary products.** In: WALTON, N.J.; BROWN, D. E. (Ed.). Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products. London: Imperial College, p.1-25, 1999.

HARBORNE, J. B.; PALO, R. T.; ROBBINS, C. T. **Plant defenses against mammalian herbivore.** London: CRC. cap. 4, p.61-4, 1991.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.** London: Chapman and Hall, 1984.

HARUNA, M.; TANAKA, M.; SUGIMOTO, T.; KOJIMA, R.; SUZUKI, Y.; KONOSHIMA, T.; KOZUKA, M.; ITO, K. **Alteration of Na⁺ permeability in human erythrocytes as studied by ²³Na-NMR and inhibition of the kidney Na⁺,K⁺-ATPase activities with saponins: Interaction of *Gleditsia* saponins with human**

erythrocyte membranes. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v.5, p.827-830, 1995.

HAASE, I.; EVANS, R.; POFAHL, R., WATT, F.M. **Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signaling pathways.** J Cell Sci, v. 116, n.15, p. 3227–3238, 2003.

HAMERSKI, L.; CARBONEZI, C.A.; CARVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M. **Triterpenoid saponins from *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae).** Quím. Nova, v.28, n.4, July/Aug, 2005.

HEISE, R.; SKAZIK, C.; MARQUARDT, Y.; CZAJA, K.; SEBASTIAN, K.; KIRSCHAT, P.; GAN, L.; DENECKE, B.; EKANAYAKE-BOHLIG, S.; WILHELM, K.P.; MERK, H.F.; BARON, J.M. **Dexpanthenol Modulates Gene Expression in Skin Wound Healing in vivo.** Skin Pharmacol Physiol, v.25, p.241–248, 2012.

HENSTEN-PETTERSEN, A. **Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity.** Int Endod J, v.21, p. 89-99, 1988.

HONDA, N. K.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; CONCEICAO, C. A. **Estudo químico de plantas de Mato Grosso do Sul I: triagem fitoquímica.** Campo Grande (MS): EUFMS, 1990.

HORSFALL JR, M.; OGBAN, F.; AKPORHONOR, E. **Biosorption of Pb²⁺ from aqueous solution by waste biomass of aerial roots of *Rhizophora mangle* (Red Mangrove).** Chemistry & Biodiversity, v.2, p.1246-1255, 2005.

HOUGHTON, P.J.; HYLANDAS, P.J.; MENSAH, A.Y.; HENSEL, A.; DETERS, A.M. **In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example.** Journal of Ethnopharmacology, v.22, p.100-107, 2005.

HULCHINGS, A.; SCOT, A. H.; LEWIS, G.; CUNNINGHAM, A. B. **Zulu Medicinal Plants.** An Inventory University of Natal Press. Pietermaritzburg, p. 53-54, 1996.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 10993-5, **Biological Evaluation of Medical Devices.** Part 5: Tests for Cytotoxicity: in Vitro Methods, 2009.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J.. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**, 3rd ed. Sinauer Association, Sunderland, MA, 2007.

KIRSNER, R.S. **Cicatrização de feridas**. In: BOLOGNIA, J.L.; JORIZZO, J.L.; RAPINI, R.P. (Ed), Dermatologia. Rio de Janeiro: Elsevier., v. 141, p. 2147-2158, 2008.

KLEINSASSER, N.H.; WALLNER, B.C.; HARREUS, U.A.; KLEINJUNG, T.; FOLWACZNY, M.; HICKEL, R.; KEHE, K.; REICHL, F.X. **Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assays**. Dent J, v. 32, p. 229-234, 2004.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; WAGNER, H. **A review of the biological and pharmacological activities of saponins**. Phytomedicine, v.2, p. 363-386, 1996.

LEITE, S. P. **Indigofera Suffruticosa Mill: ensaio fitoquímico e ações biológicas biológicas**. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2003.

MADDEN, J.; AREM, A. **A cicatrização das feridas. Aspectos biológicos e clínicos**. In: SABISTON, D. Tratado de Cirurgia. 14 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.156-168, 1991.

MANUAL TÉCNICO DE VEGETAÇÃO BRASILEIRA. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE**. 1 edição Brasil, p.1-271, 2012.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. **Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares: parte I**. Anais Brasileiro de Dermatologia, v. 78, n.5, p. 525-542, 2003.

MANETTI, L. M.; TURRA, A. F.; TAKEMURA, O. S.; LAVERDE JR, A. **Avaliação da atividade hemolítica de Bromelia antiacantha Bertol. (Bromeliaceae)**. Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR, v. 14, n. 1, p. 43-47, jan./abr, 2010.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M.A.; MANTOVANI, M.S.; JAMAL, S.M.; NATI, N.; PASSOS, T.S.; MATSUMOTO, S.T. **Determination of the antimutagenicity of an**

aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. Genetics and Molecular Biology, v.33, p.1-6, 2010.

MARKHAN, K. R. **Techniques of flavonoid identification.** London:Academic Press, p.52-61, 1982.

MARRERO, E.; SÁNCHEZ, J.; ARMAS, E.; ESCOBAR, A.; MELCHOR, G.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A. M.; MEGÍAS, J.; ALCARAZ, M. J. **COX-2 and sPLA2 inhibitory activity of aqueous extract and polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove).** Fitoterapia, v. 77, p. 313–315, 2006.

MARTINEZ, S. T.; DOS SANTOS, A. P.; PINTO, A. C. **A Determinação Estrutural do Alcaloide Pirrolizidínico Monocrotalina: Exemplo dos Desafios da Química de Produtos Naturais Até os Anos Sessenta do Século XX.** Rev. Virtual Quim., v. 5, n.2, p. 300-311, 2013.

MATHEW, M.; MARTIN XAVIER, K. A.; MATHEW, S.; ASHA, K. K. Anandan, R.; KUMAR, A. **Effect of *Rhizophora* Root Extracts on Wound Healing and Yeast – Induced Pyrexia in rats.** Fishery Technology, v.49, p.161-166, 2012.

MCCLOUD, T.; NEMEE, J.; MUSCHIK, G.; SHEFFIELD, H.; QUESENBERRT, P.; SUFFNESS, M. **Extraction of Bioactive Molecules from plants . Proceedings of the International Congress on Natural Products Research.** Park City, UT, p.17–21, 1988.

MEDEIROS, M.F.T.; FONSECA, V.S.; ANDREATA, R.H.P. **Plantas medicinais e seus usos pelos sitiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil.** Acta bot. bras, v.18, n.2, p.391-399, 2004.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C. W.; Calixto, J. B. **Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene [alpha]-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.** European Journal of Pharmacology, v. 559, n.2-3, p. 227-235, 2007.

MENA-REJON, G.; CAAMAL-FUENTES, E.; CANTILLO-CIAU, Z.; CEDILLO-RIVERA, R.; FLORES-GUIDO, J.; MOO-PUC, R. **In vitro cytotoxic activity of nine**

plants used in Mayan traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology, v.30, p.462-465, 2009.

MELCHOR, G.; ARMENTEROS, M.; FERNANDEZ, O.; LINARES, E.; FRAGAS, I. **Antibacterial activity of Rhizophora mangle Bark.** Fitoterapia, v. 72, p. 689-691, 2001.

MIDDLETON, E. J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. **The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer.** Pharmacological Review, v.52, p.673–751, 2000.

MIRANDA, L.T.G.S. **Uso da tintura de arnica em feridas cutâneas abertas em ratos.** [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2001.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of Immunological methods, v.65, p.55-63, 1983.

OFORI-KWAKYE, K.; KWAPONG, A.A.; BAYOR, M.T. **Wound healing potential of methanol extract of Spathodea campanulata stem bark formulated into a topical preparation.** Afr J Tradit Complement Altern Med, v.8: 3, p.218-223, 2011.

OGA, S.; SIQUEIRA, M.E.P.B. **Introdução à Toxicologia.** In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu Editora, p.1-8, 2008.

OKUDA, T. **Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants.** Phytochemistry, v. 66, 2012–2031, 2005.

OLIVEIRA, C.C. **Estudo toxicológico pré-clínico do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *Alpinia Zerumbt* (Pers.) Burt & Smith.** (Dissertação – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 91f, 2008.

OLIVEIRA, A. C. B.; OLIVEIRA, A.P.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, R.A.; SILVA, F.S.; REIS, S.A.G.B.; RIBEIRO, L.A.A.; ALMEIDA, J.R.G.S. **Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae).** Rev. bras. plantas med. v.15, n.2, p.244-249, 2013.

PERERA, L. M. S.; RUEDAS, D.; GÓMEZ, B.C. **Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L.** Journal of Ethnopharmacology, v. 77, p. 1–3, 2001.

PERERA, L. M. S.; CHAVÉZ, I. F.; DORVENY, B. M.; MIRANDA, R. L. **Toxicidad aguda y subaguda oral del extracto acuoso liofilizado de *Rhizophora mangle* L. en ratas.** Rev Cubana Plant Med, v.13, n.3, pp. 1-13, 2008.

PERERA, L.M.S.; ESCOBAR, A.; SOUCAR, C.; REMIGIO, M.A.; MANCEBO, B. **Pharmacological and toxicological evaluation of *Rhizophora mangle* L., as a potential antiulcerogenic drug: Chemical composition of active extract.** Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, v. 2, n.4, p. 56-63, 2010.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. **Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits.** Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 3, n.4, p.146-152, 2012.

PETROIANU, A.; SILVA, A.A.; MELO, M.A.B. **Comparação entre cola biológica e sutura em cicatrização de pele.** Rev Col Bras Cir, v. 28, p. 249-253, 2001.

PERTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C. **Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova”(Jatropha isabelli).** Journal of Ethnopharmacology, v. 111, n.3, p.553-559, 2007.

PINTO, E.P.P.; AMOROZO, M.C.M.; FURLAN, A. **Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil.** Acta bot. Bras, v.20, n.4, p.751-762, 2006.

RAMSEY, D.T.; POPE, E.R.; WAGNER-MANN, C.; BERG, J.N.; SWAIN, S.F. **Effects of three occlusive dressing materials on healing of full thickness skin wounds in dogs.** American Journal of Veterinary Research, v.56, n.7, 941-949, 1995.

RAVIKUMAR, S.; GNANADESIGAN, M. **Hepatoprotective and Antioxidant Properties of *Rhizophora mucronata* Mangrove Plant in CCl₄ Intoxicated Rats.** Journal of Experimental and Clinical Medicine, v.4, n.1, p.66-72, 2011.

REDD, M.J.; COOPER, L.; WOOD, W., STRAMER, B.; MARTIN, P. **Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair.** Philos Trans Roy Soc Lond B: Biol Sci, v. 359, n.1445, p. 777-784, 2004.

REVATHI, P., SENTHINATH, T. J., THIRUMALAIKOLUNDUSUBRAMANIAN, P.; PRABHU, N. **Medicinal Properties of Mangrove Plants – an overview.** International Journal of Bioassays, v. 2, n.12, p. 1596-1600, 2013.

REYES, L.F.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. **Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.).** J Agric Food Chem, v.51, n.18, p. 5296-5300, 2003.

ROIG, J.T. **Plantas medicinales, aromaticas y venenosas de Cuba.** Editorial Revolucion y progreso, La Habana, p. 745, 1974.

ROIG, J.T. **Plantas medicinales, aromaticas y venenosas de Cuba.** Editorial Cientifica y Tecnica. La Havana-Cuba, v.164, p.606-607, 1988.

SÁNCHEZ, P. L. M.; MELCHOR, G.; ALVAREZ, S.; BULNES, C. **Chemical and toxicological characterization of one wound healing formulation form *Rhizophora mangle* L.** Rev. Salud Animal, v.20, p.69-72, 1998.

SÁNCHEZ, J.; MELCHOR, G.; MARTÍNEZ, G.; ESCOBAR, A.; FAURE, R. **Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark.** Fitoterapia, v. 77, p. 141–143, 2006.

SÁNCHEZ, J.; FAURE, R.; MARTÍNEZ, G.; VEGA, E.; FERNÁNDEZ, O. **Propiedades antioxidantes de *Rhizophora mangle* (L.) y su relación con el proceso de curación de heridas en ratas.** Rev. Salud Anim, v.31, n.3, p.170-175, 2009.

SARSINA, P. R. D.; ALIVIA, M.; GUADAGNI, P. **Widening the Paradigm in Medicine and Health: The Memorandum of Understanding between the European Association for Predictive, Preventive and Personalised Medicine EPMA and the Italian Charity “Association for Person Centred Medicine”.** Altern Integ Med, 1 : 101, p. 1-8, 2013.

SATO, H.; GENET, C.; STREHLE, A.; THOMAS, C.; LOBSTEIN, A.; WAGNER, A.; MIOSKOWSKI, C.; AUWERX, J.; SALADIN, R. **Antihyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea***. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 362, n.4, p. 793-798, 2007.

SCHAEFFER-NOVELI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M. L. G. *et al.* Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health and Management**. v 3, p 561-570, 2000.

SCIO, E. **Cumarinas encontradas no gênero *Kielmeyera* - Família Clusiaceae**. Revista Brasileira de Farmácia, v.85, n.1, p.27-31, 2004.

SCHIMIDT, P.C.; ORTEGA, G.G. **Passionsblumenkraut: Bestimmung des Gesamtflavoidgehaltes von *Passiflorae herba***. Deutscher Apotheker Zeitung., v. 47, p. 17-26, 1993.

SILVA, M.A.B.; BERNINI, E.; CARMO, T.M.S. **Características estruturais de bosques de mangue do estuário do rio São Mateus, ES, Brasil**. Acta bot. Bras, v.19, n.3, p. 465-471, 2005.

SILVA, J. M.; MARTINS, M.B.G., CAVALHEIRO, A.J. **Anatomical characterization and chemical profiles of *Avicennia schaueriana* and *Rhizophora mangle* leaves from impacted and not impacted mangroves of São Paulo**. Journal of Botany, v.39, p.14-33, 2010.

STOZKOWSKA, W.; PIEKOS, R. **Investigation of some topical formulations containing dexpanthenol**. Acta Poloniae Pharmaceutica, v.61, n.6, p.433-437, 2004.

SUDHAHAR, V.; KUMAR, S. A.; SUDHARSAN, P. T.; VARALAKSHMI, P.. **Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia**. Vascular Pharmacology, v. 46, n.6, p. 412-418, 2007.

SZEP, S.; KUNKEL, A.; RONGE, K.; HEIDEMANN, D. **Cytotoxicity of modern dentin adhesives - intro testing on gingival fibroblasts**. Biomed Mater Res, v.63, p, 53-60, 2002.

TALHOUK, R.S.; KARAM, C.; FOSTOK, S.; EL-JOUNI, W.; BARBOUR, E.K. **Antiinflammatory bioactivities in plant extracts.** Journal of Medicinal Food, v.10, p.1-10, 2007.

TAN, S.N.; YONG, J.W.H.; TEO, C.C.; GE, L.; CHAN, Y.W.; HEW, C.S. **Determination of metabolites in *Uncaria sinensis* by HPLC and GC–MS after green solvent microwave-assisted extraction.** Talanta, v.83, p.891-898, 2011.

TESTA, G.; OLIVEIRA, P.R.N.; SILVA, C.C.; SCHUQUEL, I.T.A.; SANTIN, S.M.O. **Constituintes químicos das folhas e avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos das raízes e folhas de *Guettarda pohliana* (RUBIACEAE).** Quim. Nova, v. 35, n. 3, p. 527-529, 2012.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; LINUMA, M. **Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*.** Journal of Ethnopharmacology, v.50, p.27-34, 1996.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO E.S. **Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 42, n. 2, p. 289-304, abr./jun., 2006.

UKOIMA, H.N.; IKATA, M.; PEPPLER, G.A. **Control of *Lasiodiplodia theobromae* (PAT) on *Rhizophora racemosa* using plants extracts.** American Journal Biotechnology and Molecular Sciences, v.3, n.1, p.1-7, 2005.

VAJRABHAYA, L.; PASASUK, A.; HARNIRATTISAI, C. **Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents.** Oper Dent., v.28, p. 440-444, 2003.

VEIGA, J.V.F.; PINTO, A.C. **O Gênero *Copaifera* L.** Química Nova, v. 25, n.2, p. 273-286, 2002.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drugs Analysis – a thin layer chromatography atlas.** 2 nd ed. Berlin: Springer-Verlag , 1996.

WENDEL, G. H.; TEVES, M.R.; PAREDES, J. D.; SANCHEZ PERERA, L.M., PELZER, L. E. **Evaluation of the Antidiarrheal Activity of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae).** Latin American Journal of Pharmacy, v. 32, n. 1, 128-131, 2013.

WHO. World Health Organization. **Traditional Medicine Strategy 2002-2005..** Geneva, Switzerland., p.1-59, 2002.

WHO. World Health Organization. WHO **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants.** Geneva, Switzerland, p.1-80, 2003.

WHO. World Health Organization. **WHO traditional medicine strategy: 2014-2023.** Geneva, Switzerland, p. 1-78, 2013.

WILLIAMS, L.A.D. ***Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) triterpenoids with insecticidal activity.** Naturwissenschaften, v.86, p.450-452, 1999.

WILLIAMS, D.F. **On the mechanisms of biocompatibility.** Biomaterials, v. 29, p. 2941–2953, 2008.

YANG, Z.G.; SUN, H.X.; FANG, W.H. **Haemolytic activities and adjuvant effect of *Astragalus membranaceus* saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice.** Vaccine, v.23, p.5196-5203, 2005.

YANG, Y.; XIA, T.; CHEN, F; WEI, W.; LIU, C.; HE, S., et al. **Electrospun fibers with plasmid bFGF polyplex loadings promote skin wound healing in diabetic rats.** Mol Pharm, v. 9, n.1, p. 48–58, 2012.

ANEXOS

ANEXO A- Autorização da coleta da planta no mangue.

CPRH Agência Estadual de Meio Ambiente GOVERNO DE PERNAMBUCO

CA DRFB Nº 120/2014 24 de outubro de 2014.

Ao Senhor
JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

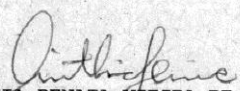
Prezado Senhor,

Cumprimentando Vossa Senhoria, nos reportamos ao Processo CPRH nº 013520/2014, referente ao requerimento para realização de atividades de pesquisa na APA de Santa Cruz e na APA Estuarina de Santa Cruz, sendo o local de coleta às margens do Canal de Santa Cruz e Rio Paripe, próximo a Vila Velha, Ilha de Itamaracá - PE.

Após análise da documentação apresentada vimos informar que o projeto **"Tecnologia Morfológica Aplicada à Inovação Terapêutica: Uma Perspectiva de Investigação de Produtos Naturais da Região de Mangue"** foi aprovado, estando autorizada a realização da citada pesquisa. No entanto, em caso de realização de atividades em áreas particulares, estas somente poderão ocorrer mediante a anuência do proprietário das terras. Salientamos ainda, que esta autorização permite as atividades de campo e coleta de material para estudo, entretanto, o acesso ao patrimônio genético deverá ser autorizado pelos órgãos competentes.

Informamos que a Unidade de Conservação APA de Santa Cruz possui sede e administração local, desta forma, caso haja necessidade de apoio para a realização das atividades de campo, faz-se necessário contato prévio com a equipe de gestão da Unidade.

Atenciosamente,


CINTHIA RENATA VIEIRA DE LIMA
Diretoria de Recursos Florestais e Biodiversidade

ANEXO B- Autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais.

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 499/12

Recife, 29 de outubro de 2012

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira**
Departamento de Histologia e Embriologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.025194/2012-10

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "*Atividades Biológicas de plantas do mangue Brasileiro*".

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.


Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério Depto. Fisiologia e Farmacologia da UFPE; Animais: Ratos; Sexo: macho e fêmea; Idade: 8 a 12 semanas; Peso: 225 a 275g; Número de animais previsto no protocolo: 60 animais.

Atenciosamente,


Prof. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

RECEBIDO EM: 06/11/2012
NOME: JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA
ASSINATURA: 

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO C- Guia para autores do *Journal of Ethnopharmacology*.

AUTHOR INFORMATION

JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

INTRODUCTION

The Journal of Ethnopharmacology is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on materia medica. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals. Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Classification of your paper

Please note that upon submitting your article you will have to select at least one classification and at least three of the given keywords. You can preview the list of classifications and keywords ([here](#)). This information is needed by the Editors to more quickly process your article. In addition to this, you can submit free keywords as described below under "Keywords".

The "rules of 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here](#). For more details on how to write a world class paper,

please visit our Pharmacology Author Resources page. Authors are encouraged to submit video material or animation sequences to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

Types of paper

The Journal of Ethnopharmacology will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.

2. Short Communications - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.

3. Letters to the Editors.

4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome. Outlines for potential reviews need to include: A detailed abstract using the structure provided in the guidelines An annotated table of contents A short CV of the lead author

5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.

6. Commentaries - invited, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be

used in papers in the Journal of Ethnopharmacology. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk with an outline.

7. Conference announcements and news.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Policy and ethics

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies – Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

Author contributions For each author the contribution to the publication should be mentioned.

Conflict of interest All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In

the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access • Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse • An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription • Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>). • No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY) Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is USD 3000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and begins from the publication date of the issue your article appears in.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Additional information

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

In addition, you are recommended to adhere to the research standards described in the following articles: Cos P., Vlietinck A.J., Berghe D.V., et al. (2006) Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 290-302. Matteucci, E., Giampietro, O. (2008) Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 163-172.

Froede, T.S.A. and Y.S. Medeiros, Y.S. (2008) Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 173-183.

Gertsch J. (2009) How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 177-183. Chan K., et al. (2012) Good practice in reviewing and publishing studies on herbal medicine, with special emphasis on traditional Chinese medicine and Chinese Materia Medica. *Journal of Ethnopharmacology* 140: 469-475.

Heinrich, M., Edwards. S., Moerman. D.E.. and Leonti. M. (2009), Ethnopharmacological field studies: a critical assessment of their conceptual basis and methods. *J. Ethnopharmacol*, 124: 1-17.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor

Article structure Subdivision - numbered sections Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any

subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results Results should be clear and concise.

Discussion This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or

'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The author should divide the abstract with the headings Ethnopharmacological relevance, Aim of the study, Materials and Methods, Results, and Conclusions. Click here to see an example.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Keywords After having selected a classification in the submission system, authors must in the same step select 5 keywords. These keywords will help the Editors to categorize your article accurately and process it more quickly. A list of the classifications and set keywords can be found here. In addition, you can provide a maximum of 6 specific keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with

abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below: Chemical compounds studied in this article Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865) More information is available at: <http://www.elsevier.com/PubChem>. Plant names In the Materials and Methods section there must be a separate heading for describing the material used. That includes official name, local name, English name (if known), GPS position in case of collection in the wild or cultivation, a voucher specimen must be deposited in an official herbarium for possible future comparison. In the text it should be stated that the plant name has been checked with www.theplantlist.org mentioning the data of accessing that website. In case of commercially procured material should mention the source, batch number, quality control data. Data on chemical characterization (metabolomics, chromatographic methods) should also be presented, in case of known active compounds their quantitative analysis should be presented.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and

line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with "Unpublished results". "Personal communication" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-ethnopharmacology> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to: 1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication; 2. Two authors: both authors' names and the year of publication; 3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at

<http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details: • E-mail address • Full postal address All necessary files have been uploaded, and contain: • Keywords • All figure captions • All tables (including title, description, footnotes) Further considerations • Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' • References are in the correct format for this journal • All references mentioned in the

ANEXO D- Guia para autores do *The FASEB Journal*.

Technical requirements for Initial Query preparation

Authors interested in submitting an article to *The FASEB Journal* must start with an Initial Query (IQ). At this early stage of submission, the editors will not accept or consider any figures or illustrations. Any request made to staff to forward these types of materials to editors outside of the peer-review submission system will be declined. After the initial review, you will receive an e-mail indicating whether you should submit the entire manuscript for formal review. The system will not allow you to submit a manuscript without an accepted IQ.

There are four types of articles that *The FASEB Journal* publishes: Research Communications, Reviews, Hypotheses, and Life Sciences Forum. In the online submission system, you'll need to designate which kind of article you are submitting.

Research Communications

The FASEB Journal seeks to publish Research Communications that integrate one or more disciplines--preferably those that apply molecular biological methods, along with functional studies, to the study of biological questions that bear on developmental biology, pathophysiology, or molecular medicine.

To complete the IQ, you will need:

1. A cover letter describe the findings in your proposed paper.
2. An abstract of no more than 200 words stating the **PURPOSE(S)** of the study or investigation; the basic **PROCEDURES**, including the kingdom, phylum, and species, etc selected; the tissues, cells, organelles, cell-free systems, or molecules studied; and the observational and analytic methods used. Then give quantitative statements as to the main **FINDINGS**, i.e. if you are describing the effects of an agent (drug, hormone, xenobiotic, etc. on a selected target you must include the EC₅₀ or IC₅₀ as well as the kinetics of the effect. Then provide the rationale for the **CONTROLS** you have chosen. Finish with a one-sentence summary of the principal **CONCLUSIONS**. Do not omit the controls, as cautioned in *The FASEB Journal's* August 2008 editorial, "Writing Science: The Abstract is Poetry, the Paper is Prose."

Finally, in the abstract, please describe each abbreviation before its first appearance, either in the title or the abstract (e.g. complement component C5a, myeloid cell line HL-60, transcription factor NFkappa B, eicosanoid LTB₄).

3. A title and a complete list of authors and their affiliations
4. A list of key words that does not repeat terms already in the title
5. Answers to the following questions: What was the original aim of the study? What

are the most significant, novel findings? How do these findings relate to the state of the field? Why are these findings appropriate for *The FASEB Journal*?

Reviews

The FASEB Journal seeks to publish Review articles that collect, collate, and compare observations on a topic of broad interest to the readership of the Journal. The ideal Review should be accurate scientifically; describe the most relevant and recent contributions; be fair in its appraisal of the significance of the studies cited; and be generous in the choice of citations, giving equal notice to contributions from both collaborators and competitors, and consider the work published throughout the international community.

To complete the IQ, you will need:

- A cover letter describing the focus of your proposed paper
- An abstract of no more than 200 words that arouses the readers' interest, be written for a general readership, and be free from jargon
- A title and a complete list of authors and their affiliations
- A list of key words
- Answers to the following questions:
 1. What was the original aim of the study?
 2. What are the most significant, novel findings?
 3. How do these findings relate to the state of the field?
 4. Why are these findings appropriate for *The FASEB Journal*?
 5. Please list the major contributions by your laboratory(ies) in this field of research. Please use full bibliographic citations.

Hypotheses

The FASEB Journal seeks to publish Hypotheses that are accessible and interesting to the readership of the Journal and provide an interpretative overview of the most significant new findings of the subject under consideration. The ideal Hypothesis should be accurate scientifically, describe a hypothesis which is both novel and relevant in the context of the most recent scholarship, and be experimentally verifiable.

To complete the IQ, you will need:

- A cover letter describing the focus of your proposed paper
- An abstract of no more than 200 words that should state biological questions being addressed and include a brief summary of the proposed hypothesis
- A title and a complete list of authors and their affiliations
- A list of key words

Life Science Forum

Space in *The FASEB Journal* has been reserved for the publication of original commentaries that deal with a broad range of issues that impact on the life sciences. These might include but are not limited to discussions of governmental policies related to research funding and regulation, the impact of scientific research on higher education, economic or social implications of scientific advances, and the mechanisms now in place for the allocation of research support and peer-reviewed publication of research findings.

To complete the IQ, you will need:

- A cover letter describing the focus of your proposed paper
- An abstract of no more than 200 words
- A title and a complete list of authors and their affiliations
- A list of key words