



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

MARLLON ALEX NASCIMENTO SANTANA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E
CICATRIZANTE DE *Conocarpus erectus* SOBRE LESÕES CUTÂNEAS EM
RATOS WISTAR**

Recife

2018

Marllon Alex Nascimento Santana

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E CICATRIZANTE DE *CONOCARPUS
ERECTUS* SOBRE LESÕES CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima

Co-orientadora: Profa. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva

Recife
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Santana, Marllon Alex Nascimento

Avaliação das atividades antioxidante, citotóxica e cicatrizante de *Conocarpus erectus* sobre lesões cutâneas em ratos wistar / Marllon Alex Nascimento Santana. – 2018.

70 f. : il.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima. Coorientadora:
Teresinha Gonçalves da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Plantas medicinais I. Lima, Maria do Carmo Alves de (orientadora)II. Silva, Teresinha Gonçalves da (coorientadora) III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 205

Marllon Alex Nascimento Santana

Avaliação das atividades antioxidante, citotóxica e cicatrizante de *conocarpus erectus* sobre lesões cutâneas em ratos wistar.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 22/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof (a). Dra. Teresinha Gonçalves da Silva Instituição: Departamento de Antibióticos/UFPE

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira: Departamento de Embriologia e Histologia/UFPE

Prof(a). Isla Vanessa Gomes Alves Bastos: Departamento de Antibióticos/UFPE

DEDICATÓRIA

A Deus por todo seu amor e todas as oportunidades. Aos meus pais por todo apoio e dedicação durante toda minha vida. A minha querida e amada esposa que me inspirou com toda a sua força e sabedoria. Aos meus familiares por todo estímulo e loucuras. Aos meus amigos pelo companheirismo, incentivo e alegrias ao longo dessa jornada. E aos meus queridos orientadores que depositaram confiança no meu potencial e contribuíram ricamente com seus conhecimentos.

RESUMO

As plantas medicinais são consideradas alternativas eficientes na procura por novas substâncias que atuem como terapia para várias doenças, devido a sua diversidade química e baixo custo. *Conocarpus erectus*, popularmente conhecida como mangue de botão, é uma espécie bastante utilizada na medicina popular para o tratamento de câncer, sífilis, hipertensão, hemorragias, infecções e no reparo de feridas cutâneas. Considerando a utilização popular desta espécie para o tratamento de feridas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades antioxidante, citotóxica e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de folhas secas e frescas de *Conocarpus erectus* sobre lesões cutâneas em ratos wistar. O material vegetal foi coletado em no município de Vila Velha (Norte/Pernambuco). O extrato hidroalcoólico foi preparado por maceração utilizando folhas frescas e secas de *C. erectus*, obtendo-se dois extratos. O perfil fitoquímico foi analisado por cromatografia em camada delgada e os teores de fenóis totais, flavonóides, taninos e cumarina foram determinados. O potencial antioxidante dos extratos foi avaliado pelo método de sequestro de radicais livres - DPPH e a citotoxicidade foi analisada frente às linhagens de células Vero e macrófagos murinos (RAW-264.7). Para a avaliação da atividade cicatrizante foram preparadas formulações dos extratos hidroalcoólicos das folhas secas (FHFCS) e frescas (FHFCF) de *C. erectus* (10%) e testadas em modelos de cicatrização excisional. O perfil fitoquímico indicou a presença de taninos, flavonóides, terpenóides e cumarinas em ambos os extratos, além disso, o extrato hidroalcoólico das folhas frescas de *C. erectus* apresentou maior teor de fenóis e taninos totais ($46,07 \pm 3,02$ e $42,18 \pm 3,23$ mg EAT/g, respectivamente) quando comparado ao extrato hidroalcoólico das folhas secas ($39,40 \pm 3,06$ e $38,61 \pm 2,75$ mg EAT/g, respectivamente). Na avaliação da atividade antioxidante os extratos das folhas fresca e seca demonstraram capacidade de sequestrar radicais livres (CE_{50} 51,89; 55,10 μ g/mL, respectivamente) e apresentaram baixa citotoxicidade frente às células Vero (15,2%; 24%, respectivamente) e RAW-264.7 (21,8%; 31,2%, respectivamente). No potencial cicatrizante em modelo de ferida excisional, o grupo tratado com FHFCF na concentração de 10% apresentou evolução cicatricial significativa até o período de 14 dias, com percentual de contração de 20,15% no 3º dia, 68,08% no 7º dia e 83,62% no 14º dia. No modelo de ferida excisional utilizando aro de contenção com objetivo de replicar a fisiologia humana, os grupos tratados com FHFCS e FHFCF apresentaram percentagem de contração de 88,83%; 92,37% na concentração de 10%, respectivamente, e 85,31%; 92,58% na concentração de 5%, respectivamente. A análise histopatológica das formulações mostrou uma reepitelização nítida e contínua, com restauração do tecido conjuntivo, presença de fibras colágenas com arranjo modelado próximo ao epitélio e intensa concentração de fibroblastos na região

cicatricial. Desta forma, podemos concluir que a administração tópica de FHFCS e FHFCF auxiliam na aceleração do processo cicatricial, promovendo significativa reepitalização do tecido e regeneração celular, sendo relevantes no reparo de lesões cutâneas.

Palavras-chave: *Conocarpus erectus*. Antioxidante. Citotoxicidade. Cicatrização.

ABSTRACT

Medicinal plants are considered an efficient alternative in the search for new substances acting in the therapy of various diseases because of their low cost and chemical diversity. *Conocarpus erectus*, popularly known as button mangrove, is a species widely used in folk medicine for the treatment of cancer, syphilis, hypertension, bleeding, infection and in the topical treatment of wounds. Considering the popular use of this species, this work aim to evaluate the healing property of hydroalcoholic extracts of *C. erectus* in skin wounds in rats. The leaves of *C. erectus* were collected in Vila Velha (North / Pernambuco). The hydroalcoholic extract was prepared by maceration using fresh and dried leaves of *C. erectus*, obtaining two extracts. The phytochemical profile was analyzed by thin layer chromatography and by determination of total phenolic content, flavonoids, tannins and coumarin. The antioxidant potential of extracts was evaluated by DPPH radical scavenging method and the cytotoxicity was analyzed in Vero cells and murine macrophages (RAW-264.7). For the evaluation of cicatrizing activity were prepared formulations of the hydroalcoholic extracts of the dried (FHFCS) and fresh (FHFCF) leaves of *C. erectus* (10%) and tested in the excision model (for 14 days). The phytochemical profile indicated the presence of tannins, flavonoids, terpenoids and coumarins in both extracts, moreover, the hydroalcoholic extract of fresh leaves of *C. erectus* showed higher phenolic content and total tannins (46.07 ± 3.02 e 42.18 ± 3.23 mg EAT/g, respectively) when compare to the hydroalcoholic extract of dry leaves (39.40 ± 3.06 e 38.61 ± 2.75 mg EAT/g, respectively). In the evaluations of the antioxidant activity of fresh and dry leaf extracts, they demonstrated a remarkable ability to sequester free radicals (CE_{50} 51.89, 55.10 μ g / mL, respectively) and were not cytotoxic to Vero cells (15.2%; 24%, respectively) and RAW-264.7 (21.8%; 31.2%, respectively). In the healing evaluation of the excisional wound model, the group treated with FHFCF 10% presented a significant cicatricial evolution up to the 14 day period, with a contraction percentage of 20.15% on the 3rd day, 68.08% on the 7 Day and 83.62% on the 14th day. The excisional wound model was used a containment ring to replicate human physiology. The groups treated with FHFCS and FHFCF (5 and 10%) presented a contraction percentage of 88.83%; 92,37% in the concentration of 10%, respectively, and 85,31%; 92.58% in the concentration of 5%. In the histopathological analysis, the formulations promoted a clear and continuous reepithelialization, with restoration of connective tissue, presence of collagen fibers with a patterned arrangement near the epithelium and intense concentration of fibroblasts in the cicatricial region. In this way, we can conclude that the topical administration of FHFCS and FHFCF contributed to the acceleration of the healing process, promoting significant tissue

reepitalization and cellular regeneration, being relevant in the repair of cutaneous lesions.

Keywords: *Conocarpus erectus*. Antioxidant. Cytotoxicity. Healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos manguezais no Brasil.....	20
Figura 2. Classificação científica da espécie <i>Conocarpus erectus</i>	21
Figura 3. Partes aéreas da espécie <i>Conocarpus erectus</i>	23
Figura 4. Corte histológico de pele - microscopia de luz (coloração HE).....	24
Figura 5. Delineamento representativo das estruturas da pele e seus constituintes celulares.....	27
Figura 6. Fases do processo de cicatrização em lesões cutâneas.....	29
Figura 7. Efeito cicatrizante das formulações semi-sólidas contendo o extrato seco (FHFCS) extrato fresco (FHFCF) de <i>Conocarpus erectus</i> na concentração de 10% sobre lesões cutâneas ratos Wistar utilizando o modelo de excisão.....	47
Figura 8. Aspectos macroscópicos das lesões cutâneas tratadas com creme lanette®, Dexpanthenol ® (5%), FHFCS e FHFCF (10%) nos dias 1º e 14º.....	49
Figura 9. Efeito cicatrizante das formulações semi-sólidas contendo o extrato hidroalcoólico das folhas seca (FHFCS) e fresca (FHFCF) de <i>Conocarpus erectus</i> nas concentrações de 5 e 10% sobre lesões cutâneas em ratos Wistar, utilizando o modelo com aro de contenção.....	50
Figura 10. Cortes histológicos dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional com aro de contenção corado com hematoxilina e eosina (100 X).....	52
Figura 11. Cortes histológicos dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional com aro de contenção corado com tricômio de masson (100 X).....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento (%) dos extratos hidroalcoólico das folhas frescas e secas de <i>Conocarpus erectus</i>	42
Tabela 2. Prospecção fitoquímica dos extratos hidroalcoólico das folhas frescas e secas de <i>C. erectus</i>	43
Tabela 3. Determinação dos conteúdos de fenóis totais, flavonóides, taninos e cumarinas dos extratos hidroalcoólico das folhas frescas e secas de <i>C. erectus</i>	44
Tabela 4. Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólico das folhas frescas e secas de <i>Conocarpus erectus</i> utilizando o radical livre DPPH.....	45
Tabela 5. Avaliação da citotoxicidade dos extratos hidroalcoólico das folhas frescas e secas (50 µg/mL) de <i>C. erectus</i> frente às linhagens Vero e macrófagos (RAW-264.7).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al³⁺ Alumínio

CCD Cromatografia em Camada Delgada

CE₅₀ Concentração que inibe 50% da concentração inicial do radical DPPH

CEUA-UFPE Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco

COBEA Colégio Brasileiro para Experimentação Animal

CO₂ Dióxido de Carbono

DMSO Dimetilsulfóxido

DPPH 2,2-difenil-1-picrilidrazina

FAO Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

FGF Fator de crescimento de fibroblastos

FHFCS Formulação do extrato hidroalcoólico das folhas secas de *C. erectus*

FHFCE Formulação do extrato hidroalcoólico das folhas frescas de *C. erectus*

HARP Peptídeo regulador de afinidade da heparina

HEpG2 Hepatocarcinoma humano

ICLAS Conselho de Laboratório de Animais Experimentais

IL-1 β Interleucina 1- beta

KOH Hidróxido de potássio

MCF-7 Adenocarcinoma mamário humano

MTT Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NEU Solução a 1% de difenilboriletoxietilamina

OMS Organização Mundial de Saúde

PDGF Fator de crescimento derivado de plaquetas

PMN Leucócitos polimorfonucleares

PNPIC Política Nacional de Práticas Integrativas

RAW-264.7 Macrófagos murinos

SFB Soro Fetal Bovino

SRB Sulforrodamina B

SUS Sistema Único de Saúde

TGF- β Fator transformador de crescimento-beta

TGF- α Fator de crescimento transformante-alfa

TNF- α Fator de necrose tumoral alfa

UV Ultravioleta

VEGF-A Fator de crescimento vascular-endotelial-A

Vero Fibroblastos de rim de macaco verde africano

VIS Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.1.2 Uso de plantas medicinais.....	17
1.1.3 O ecossistema Manguezal.....	18
1.1.4 Descrição da espécie em estudo.....	20
1.1.5 Classificação Taxonômica.....	21
1.1.6 Família Combretaceae.....	21
1.1.7 Características gerais de <i>Conocarpus erectus</i> L.....	22
1.1.8 Propriedades químicas e biológicas.....	23
1.1.9 Aspectos morfológicos e fisiológicos da pele.....	24
1.1.10 Feridas: Definição e Classificação.....	27
1.1.11 Processo de Cicatrização Tecidual.....	28
1.2 OBJETIVOS.....	33
1.2.1 Objetivo Geral.....	33
1.2.2 Objetivos Específicos.....	33
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	34
2.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE <i>CONOCARPUS ERECTUS</i>	34
2.3 PERFIL FITOQUÍMICO – CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD).....	34
2.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS.....	35
2.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE TANINOS.....	36
2.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONÓIDES.....	36
2.7 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CUMARINAS.....	37
2.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE <i>C.</i> <i>ERECTUS</i>	37

2.9 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS SEMI-SÓLIDA (CREME) CONTENDO EXTRATOS DE <i>C. ERECTUS</i>	38
2.10 MATERIAL BIOLÓGICO.....	38
2.10.1 Células Vero e Macrófagos murinos (RAW-264.7).....	38
2. 10.2 Animais Experimentais.....	38
2.10.3 Procedimentos Éticos.....	38
2.11 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.....	39
2.11.1 Avaliação citotóxica dos extratos hidroalcoólicos de <i>C. erectus</i>.....	39
2.11.2 Modelo de ferida excisional.....	39
2.11.3 Modelo de ferida excisional utilizando Aro de Contenção.....	40
2.12 AVALIAÇÃO DO GRAU DE CONTRAÇÃO (%) E MACROSCÓPICA DOS MODELOS EXCISIONAIS.....	40
2.13 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	41
2.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS.....	42
3.2 PERFIL FITOQUÍMICO – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	42
3.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONÓIDES, TANINOS E CUMARINAS.....	43
3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH.....	45
3.5 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA FRENTE ÀS LINHAGENS DE CÉLULAS VERO E RAW 264.7.....	46
3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DAS FOLHAS DE <i>C. ERECTUS</i> SOBRE LESÕES CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR.....	47
3.6.1 Avaliação do grau de contração de lesões cutânea (%) em modelo excisional.....	47
3.6.2 Avaliação dos aspectos macroscópicos e do grau de contração (%) de lesões cutânea em modelo excisional com aro de contenção.....	47

3.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	51
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO A-PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA.....	69

1 INTRODUÇÃO

Uma ferida é caracterizada por interromper a continuidade de um tecido corpóreo, podendo ser causada por um trauma (físico, químico ou biológico) ou uma enfermidade, que estimula o sistema de defesa orgânica (CESARETTI, 1998). Após o trauma, o processo cicatrizante inicia instantaneamente, com a evolução do processo cicatricial acontecendo em quatro fases. A fase da hemostasia e inflamatória ocorrem até três ou quatro dias, com a agregação plaquetária, ativação das vias de coagulação, constrição de vasos lesionados, fagocitose e ativação de fatores de crescimento. A fase de proliferação ocorre após o quarto dia, sendo caracterizada pela renovação do endotélio, envolvendo angiogênese, intensa migração celular e a produção de colágeno pelos fibroblastos; e após quatro semanas da ocorrência da lesão, a cicatrização chega à fase de remodelação. A fase de remodelação tecidual representa a última fase da cicatrização, podendo ser caracterizada pela substituição do tecido de granulação para maturação, além da deposição, agrupamento e reorganização de fibras colágenas que irão contribuir para contração da lesão (TELLER et al., 2009; KONDO et al., 2010; GREAVES et al., 2013). A partir do conhecimento sobre o processo cicatricial é possível escolher o tratamento ideal para que a reepitelização do tecido aconteça de forma harmônica (HUPPES et al., 2013).

As plantas têm sido exploradas pelo homem desde os períodos primitivos, e durante toda sua evolução foram utilizadas para a cura de várias enfermidades (GARCIA et al., 2003). A utilização de substâncias oriundas de plantas cresce consideravelmente, como também estudos com o intuito de validar as informações populares referentes ao uso de fitoterápicos, a descoberta de novos princípios ativos e a exploração do potencial farmacêutico dessas substâncias (ARAÚJO et al., 2007). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são excelentes fontes para aquisição de novos fármacos. Estudos demonstram que dos 520 medicamentos obtidos entre 1983 e 2010, aproximadamente 39% eram derivados de produtos naturais (NEWMAN et al., 2010). Devido à falta de acesso ao medicamento, cerca de 80% da população de países em desenvolvimento utilizam a medicina tradicional, na busca de aliviar alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (ELOFF, 1998).

Dessa forma, uma variedade de espécies vegetais está sendo utilizadas por apresentar propriedades farmacológicas em virtude da presença de metabolitos secundários, como os compostos fenólicos, tais como os taninos e flavonóides (SAXENA et al., 1994; MÁRQUEZ et al., 2003). No processo de cura de feridas os taninos produzem uma camada protetora sobre o tecido lesado, através de um complexo tanino/proteína (HASLAM, 1996). Os flavonóides apresentam capacidade de modular atividades enzimáticas interferindo no funcionamento de muitos sistemas celulares determinando ações anti-inflamatórias e cicatrizantes (MISHRA et al., 2003).

A espécie *Conocarpus erectus*, pertencente à família Combretaceae, conhecida popularmente como mangue de botão devido à ocorrência próxima de manguezais (TOMLINSON, 1986; HOWARD, 1989; GILMAN et al., 1999), tem sido relatada por apresentar diversas atividades biológicas, tais como: antioxidantes, hepatoprotetora, anticancerígena e antimicrobiana (ABDEL-HAMEED et al., 2012). Espécies dessa família são bastante utilizadas por comunidades tradicionais como recurso terapêutico para tratar vários tipos de dores, resfriado, diarreia, conjuntivites, pneumonia, caxumba, sífilis, febre, infecções e na restauração de lesões teciduais (WATT et al., 1962; HUTCHINGS et al., 1996; MCGAW et al., 2001; FYHRQUIST, 2007; MASOKO et al., 2010; BARKU et al., 2013).

A fim de ampliar as possibilidades de recursos terapêuticos para o tratamento de feridas cutâneas a partir da pesquisa com plantas medicinais, a proposta deste estudo foi avaliar a atividade cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Conocarpus erectus* por via tópica.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.2 Uso de plantas medicinais

Desde a antiguidade as plantas medicinais são utilizadas como recurso terapêutico, contribuindo para o tratamento e prevenção de várias doenças. Evidências arqueológicas mostraram que ao longo dos anos diversos povos, entre eles os chineses, árabes, romanos, indianos, gregos e egípcios utilizaram as plantas medicinais para fins terapêuticos (GARCIA et al., 2003; SAKLANI et al., 2008; ARGENTA et al., 2011).

De acordo com David et al. (2002), o primeiro estudo sistemático usando plantas medicinais foi realizado aproximadamente em 2.700 a.C., no qual foi produzido um inventário com 365 drogas. As espécies mencionadas neste inventário foram: *Ephedra sinica*, *Ricinus communis* e *Papaver somniferum*, espécies que são conhecidas por fornecer efedrina, óleo de rícino e morfina, respectivamente, princípios ativos extremamente conhecidos e utilizados até os dias de hoje.

No Brasil, Gabriel Soares de Souza, em 1587, foi o primeiro a relatar sobre o hábito de usar plantas como medicamento, descrevendo em seu Tratado os produtos medicinais utilizados pelos índios durante a vinda dos primeiros médicos portugueses, na tentativa de reverter à escassez de remédios na colônia (VEIGA et al., 2002).

Mas só depois de várias décadas, o termo planta medicinal foi validado, durante a 31ª Assembléia da Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo definido como “aquela que administrada ao homem ou animais, por qualquer via ou sob qualquer forma, exerce alguma espécie de ação farmacológica” (DAVID et al., 2002).

Em 1978, a OMS incentivou maiores investimentos para a área de plantas medicinais, tornando a fitoterapia mais popular e confiável diante dos profissionais de saúde, sendo considerado algum tempo depois como uma das formas de tratamento mais utilizada no mundo (ELOFF, 1998).

Existem diversas razões para que a fitoterapia seja realmente difundida entre a população, porém a dificuldade econômica é considerada a principal, não permitindo o acesso aos medicamentos industrializados, consequentemente levando o aumento da prática da medicina popular e do uso de plantas medicinais como o único recurso à saúde (GOLENIOWSKI et al., 2006; PHILLIPSON et al., 2007). No entanto, uma parcela da população demonstrou maior interesse pelo tratamento à base de plantas medicinais devido à facilidade de acesso, baixo custo e compatibilidade cultural. Países como Argentina, México e Brasil desempenham um papel altamente lucrativo no comércio de plantas medicinais (SAHOO et al., 2010).

Em 2006, a medicina popular teve um grande avanço com a aprovação da Portaria de número 971 do Ministério da Saúde que trata da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006a). Essa portaria traz entre suas normas, a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e fitoterápicas, assim como o aproveitamento do acesso aos usuários do SUS. Após alguns meses, em 22 de junho de 2006 foi decretada a lei federal de número 5.813, que incentiva pesquisas e apoia a implantação de serviços em caráter nacional pelas Secretarias de Saúde dos municípios, estados e do Distrito Federal (BRASIL, 2006b).

No entanto, mesmo mostrando todos esses avanços e excelentes evidências da utilização na parte clínica, poucas plantas dispõem de estudos científicos para a elucidação de sua qualidade, eficácia e segurança (CALIXTO, 2005), e apenas cerca 3% das plantas que são mencionadas nas farmacopeias ocidentais são destinadas para o uso tópico, provando que ainda são necessários estudos mais aprofundados sobre o processo de cicatrização de lesões cutâneas e sua patogênese (KUMAR et al., 2007).

1.1.3 O Ecossistema Manguezal

O termo mangue é empregado para designar uma série de espécies vegetais arbóreas ou arbustivas que pertencem às famílias co-relacionadas que partilham características fisiológicas e algumas adaptações especiais, permitindo a essas espécies uma maior resistência a grandes períodos de exposição a água, baixo teor de oxigênio e alta salinidade (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000).

O Manguezal é conceituado como um ecossistema costeiro que possui uma intensa transição entre o ambiente aquático e terrestre, exclusivo de regiões subtropicais e tropicais, onde populações de espécies vegetais interagem entre si, com microrganismos e animais ocupando o mesmo ambiente físico (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000; BARROS, et al., 2000). A magnitude desse ecossistema tem sido citada por vários autores, como Pool et al. (1975), Lindén et al. (1980) e Cintrón-Molero et al. (1983), pois consideram os manguezais como ecossistemas extremamente ricos, em virtude da enorme quantidade de matéria orgânica que é produzida neste ambiente e liberada para as águas em forma de detritos, produzindo assim alimento para várias espécies de peixes e crustáceos. Além da exportação de detritos, os manguezais possuem outras importantes funções, tais como: berçário para incontáveis espécies de peixes, crustáceos e moluscos, manutenção da qualidade da água, além da proteção da linha de costa marítima (DIEGUES et al., 1990).

Outras particularidades também podem ser frisadas como características dos manguezais. As espécies vegetais presentes no mangue, por exemplo, são halófitas, ou seja, possuem tolerância à salinidade (HOGARTH, 1999); também exibem algumas adaptações importantes, tais como: morfológicas (raízes aéreas, raízes adventícias e pneumatóforos) (SNEDAKER et al., 1981; CHAPMAN et al., 1984; SCHWAMBORN et al., 1996); e fisiológicas (viviparidade e glândulas excretoras de sal (PANNIER, 1962; JOSHI et al., 1972; PANNIER, 1984), concedendo uma maior competitividade em relação às outras plantas.

Estima-se que cerca de 70% das zonas costeiras subtropicais e tropicais são ocupadas por manguezais (LACERDA et al., 1999). No Brasil, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a área florestal dos manguezais totaliza uma parcela de 13.000 km² (LACERDA et al., 2006), sendo considerada a segunda pátria com a maior extensão de áreas de manguezal do mundo, estando atrás dos arquipélagos da indonésia, com 42.550 km². (SPALDING et al., 1997). Os manguezais situados no Brasil (figura 1) são encontrados em quase todo o litoral, estendendo-se desde o Cabo Orange, litoral do estado do Amapá, até Laguna em Santa Catarina (CINTRÓN-MOLERO et al., 1992; LACERDA, et al., 1993).

Figura 1. Distribuição dos manguezais no Brasil.

Monteiro et al. (2004) demonstraram que os manguezais do nordeste do Brasil representam cerca de 10% da extensão total dos manguezais brasileiros. Os manguezais estão predominantemente situados na foz dos principais rios do País, como o delta do Parnaíba-PI, rio Timonha-CE, rio Piranhas Açu-RN, rio Mamanguape-PB e o sistema estuarino de Cabedelo-PB, além do sistema estuarino da Ilha de Itamaraca-PE.

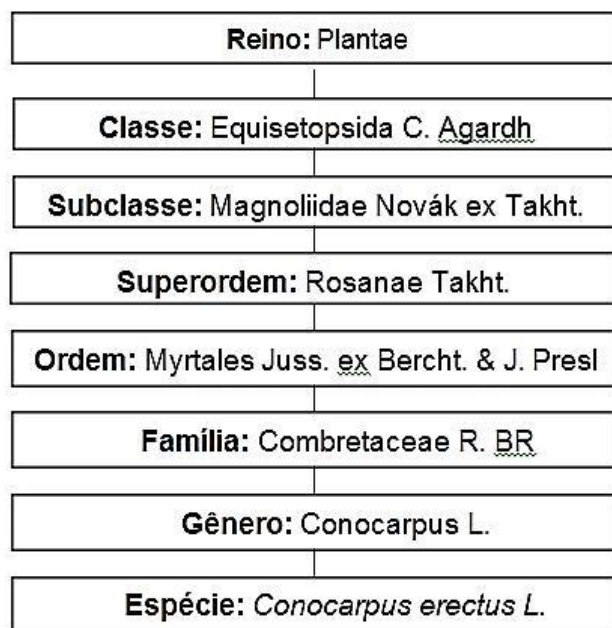
O estado Pernambucano, por conta da sua localização geográfica, exibe uma das menores faixas litorâneas da costa brasileira, com uma área de 23.973 hectares ocupada por manguezais, e a maioria está localizada nos municípios de Igarassu, Goiana, Itapissuma e Ilha de Itamaracá, nas margens do Canal de Santa Cruz (BARROS et al., 2000). Quanto à formação vegetal, Vasconcelos Sobrinho (1937) relata que nas florestas de mangue de Pernambuco há ocorrência de cinco espécies pertencentes a três famílias: Rhizophoraceae (*Rhizophora mangle*), Avicenniaceae (*Avicennia nitida* e *A. schaueriana*) e Combretaceae (*Conocarpus erectus* e *Laguncularia racemosa*).

Com o desenvolvimento dos centros urbanos nas áreas litorâneas, foi possível verificar uma intensa redução nas florestas dos manguezais, resultando na destruição das espécies em decorrência dos desmatamentos e aterramentos realizados para instalação de indústrias, Hotéis, Portuários e complexos imobiliários. Um dos grandes problemas envolvendo a questão do desmatamento refere-se também à perda do conhecimento sobre o potencial medicinal dessas plantas e a preocupante taxa de extinção dessas espécies vegetais mostra a real necessidade de considerar algumas ações e propostas de preservação da herança genética desses vegetais (BORRIS, 1996).

1.1.4 Descrição da espécie em estudo

1.1.5 Classificação Taxonômica

Figura 2. Classificação científica da espécie *Conocarpus erectus*.



(BASHIR et al., 2014)

1.1.6 Família Combretaceae

A Família Combretaceae contém 18 gêneros, onde o gênero Combretum é considerado o maior distribuído em todo continente africano e possui cerca de 370 espécies que são abundantemente utilizadas na medicina popular (MCGAW et al., 2001).

De acordo com Exell et al. (1966), a família Combretaceae subdivide-se em duas subfamílias: *Strephonematoideae*, que não possui representantes na flora brasileira; e *Combretoideae*, que divide-se em duas tribos *Combreteae* e *Laguncularieae* as quais apresentam incontáveis grupos na flora neotropical.

No Brasil, ocorrem cinco gêneros nativos (*Buchenavia*, *Crombretum*, *Conocarpus*, *Terminalia* e *Thiloa*), com cerca de 60 espécies, e dois gêneros exóticos (*Quisqualis* e *Bucida*) que podem ser encontradas na maioria das formações florestas brasileiras (SOUZA et al., 2008).

Essa família pode ser caracterizada como árvores ou arbustos, com folhas alternas simples ou opostas, inteiras, cobertas por tricomas compartimentados. Possuem flores pequenas, zigomorfas ou actinomorfas, pentâmeras ou tetrâmeras, receptáculo dividido em duas partes, a inferior envolve o ovário e a superior que termina nos lobos do cálice, pétalas 4 ou 5 ou ausentes, lobos do cálice 4 ou 5, ovário ínfero, unilocular, 2-6 rudimentos seminais pêdulos e ovoides. Os frutos são secos indeiscente, drupáceos ou betulídios, endocarpo esponjoso ou lúneo, 1 semente, cotilédones plicados ou convolutos e não possui endosperma (LINSINGEN et al., 2009).

As espécies dessa família são bastante utilizadas como recurso terapêutico de vários tipos de dores, tosse, resfriado, esquistossomose, diarreia, conjuntivite, parasitose intestinais, pneumonia, caxumba, sífilis, câncer, úlceras gástricas, hipertensão, hemorragias, febre, bem como em infecções e no tratamento tópico de feridas (WATT et al., 1962; HUTCHINGS et al., 1996; MCGAW et al., 2001; FYHRQUIST et al., 2007; VAN WYK et al., 2009). Essas plantas são geralmente preparadas por infusão ou decocção a partir das folhas secas ou frescas. As partes geralmente mais utilizadas são as raízes e folhas, sendo que seus frutos devem ser evitados em virtude da sua aparente toxicidade (MCGAW et al., 2001; FYHRQUIST et al., 2007).

Trabalhos fitoquímicos realizados com diferentes espécies da família Combretaceae, identificou inúmeros compostos bioativos, tais como: flavanóides, triterpenos, dibenzil aromáticos, fenantrenos, lignanas, cicloartano e aminoácidos (MASIKA et al., 2002; CHOWDHURY et al., 2004).

Alguns estudos sobre a atividade antimicrobiana evidenciaram que os extratos das partes aéreas e três compostos inéditos isolados das folhas de *Combretum zeyheri* possuem uma intensa ação contra os microrganismos (MCGAW et al., 2001; BREYTENBACH et al., 1989).

Além disso, foi relatada também uma intensa atividade antifúngica de sete espécies da família Combretaceae e sugere-se que esse tipo de atividade ocorreu devido à presença de taninos e saponinas (BABA-MOUSSA et al., 1999).

Estudos com a finalidade de investigar possíveis atividades biológicas do glicosídeo ácido móllico isolado de *Combretum molle*, mostrou que esses compostos foram capazes de provocar hipotensão, bradicardia e vasodilatação, mas também revelou ser um potente anti-inflamatório, no teste de edema de pata e analgésico em modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste de placa quente (OJEWOLE, 2008a; OJEWOLE, 2008b).

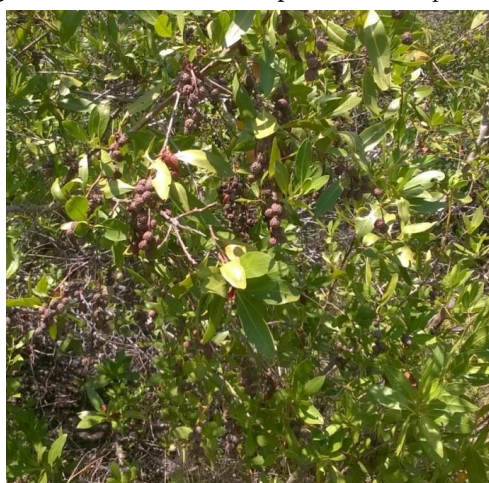
1.1.7 Características gerais de *Conocarpus erectus* L.

Conocarpus erectus é uma das duas espécies do gênero *Conocarpus*, pertencente a família Combretaceae e é conhecida popularmente como mangue de botão, mangue negro ou amora do mar (GILMAN et al., 1999). Possui tolerância a alta salinidade e a terras secas, mas também podem se desenvolver em regiões alagadas (TOMLINSON et al., 1986). Essa espécie geralmente é mencionada como mangue “não verdadeiro”, justamente por não apresentar algumas características biológicas e morfológicas específicas das plantas de mangues, como: viviparidade, raízes aéreas e também por serem localizadas nas bordas das florestas (BARROS et al., 2000; KATHIRESAN et al., 2001).

Segundo Linsingen e colaboradores (2009), *C. erectus* é considerada uma árvore que pode atingir de 2 - 5 metros de altura e seus ramos são irregulares, superiores, glabros e angulosos no ápice. Suas folhas alternas, com base cuneada, ápice agudo, biglandulosa na base do limbo e levemente carnosas. Apresenta pecíolo curto, de aproximadamente 1 - 2 mm e inflorescência em capítulos globosos pedunculados, axilares ou terminais. As flores se desenvolvem em cachos, apresentando aproximadamente 2 – 2,7 mm de comprimento e é possível encontrarmos na mesma árvore flores masculinas e femininas. Já seus frutos são pequenos, organizados em capítulos globosos, suberoso-coriáceos, imbricados, apiculado e escamiformes. Eles são chamados de infrutescência e são utilizados para a dispersão da espécie, apresentando uma cor marrom escuro.

Quanto a sua distribuição geográfica Mundial, o mangue de botão pode ser encontrado no centro e no sul da Flórida, México, América Central, Bahamas, a maior parte das índias Ocidentais, Ilhas das Bermudas, África Ocidental e na América do Sul, podendo se desenvolver do Equador até o Brasil (NETTEL et al., 2008; HOWARD, 1989; LITTLE et al., 1964).

Figura 3. Partes aéreas da espécie *Conocarpus erectus*.



Fonte: Autor Próprio (2015).

1.1.8 Propriedades Químicas e Biológicas

Abdel-Hameed et al., (2012) realizaram estudos fitoquímicos da espécie *C. erectus* por cromatografia de camada delgada (CCD) e observaram a presença de compostos fenólicos, especialmente taninos e flavonóides em todas as frações. No mesmo estudo ainda avaliaram a citotoxicidade das frações acetato de etila e n-butanol de *C. erectus* frente as linhagens HepG2 (hepatocarcinoma humano) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano), utilizando o método de sulforrodamina B (SRB). A fração de n-butanol das folhas apresentou uma maior citotoxicidade frente à linhagem HepG2 com $IC_{50} = 4,89 \mu\text{g/mL}$.

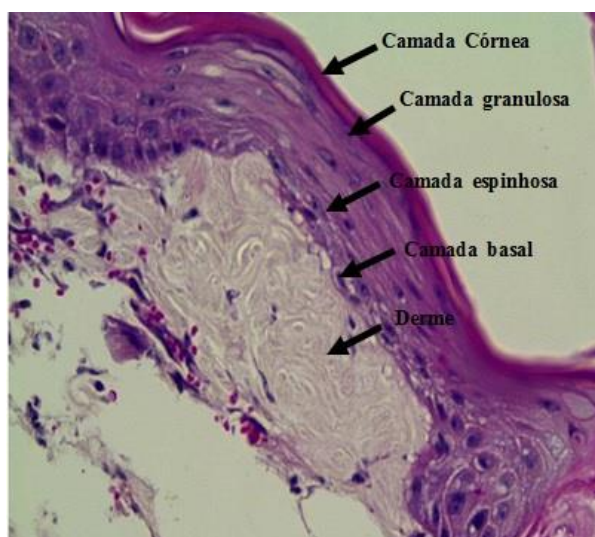
Em estudos posteriores, Abdel-Hameed e colaboradores (2012; 2013) realizaram a avaliação da atividade antioxidante através do método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e fosfomolibdênio, onde as frações de acetato de etila e n-butanol demonstraram uma maior capacidade em sequestrar radicais livres. Na atividade hepatoprotetora foi realizado o tratamento com diferentes partes da planta em uma dose de 500 mg/kg durante 14 dias e verificou-se que os níveis de alanina aminotransferase (ALT) reduziram significativamente. Já nos testes de proteínas totais, albuminas e globulina não houve diferença em relação ao controle.

O extrato acetato de etila de *C. erectus* apresentou atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonia* e *Pseudomonas aeruginosa*), que indicou uma maior sensibilidade frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, e *Mycobacterium pheli* (ABDEL-HAMEED et al., 2012; SHOHAYEB et al., 2013).

1.1.9 Aspectos morfológicos e fisiológicos da pele

A pele é conhecida como o maior órgão, pelo fato de revestir toda a superfície externa do corpo. Ela desempenha várias funções no organismo, tais como: proteção, percepção de sensações, termorregulação, síntese e secreção de substâncias. Esta estrutura é constituída por dois tipos de camadas, a epiderme (camada epitelial originária do ectoderma) e a derme (camada conjuntiva originária do mesoderma). A hipoderme que é localizada bem abaixo da derme, também é originada pelo mesoderma, mas não é considerada uma das camadas da pele e têm a importante função de unir os órgãos subjacentes (JUNQUEIRA et al., 2004; GARTNER et al., 2007) (Figura 4).

Figura 4. Corte histológico da pele - microscopia de luz (100x) (coloração HE).



Fonte: Autor Próprio (2015).

A epiderme pode atingir de 0,07 a 0,12 mm de espessura e forma a camada mais externa da pele (SILVER et al., 2001). É formada pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, possuindo quatro tipos celulares: melanócitos, queratinócitos, células de Merkel e células de Langerhans. Os queratinócitos são as células mais numerosas e constituem o epitélio cutâneo, podendo haver modificações em sua morfologia e são responsáveis pela produção de citocinas e sinalização celular. Os melanócitos estão presentes na camada basal da epiderme e são responsáveis pela síntese de melanina, que tem a função de proteção contra os raios ultravioletas, além de pigmentar a pele, pelos e cabelos (SCHIAFFINO et al., 2010; MCLAFFERTY et al., 2012; KENDALL et al., 2013). As células de Langerhans são células dendríticas, que estão localizadas na mucosa e na pele, com função de processar, captar e apresentar os antígenos aos linfócitos, que quando estão ativados multiplicam-se, gerando citocinas e outros importantes mediadores que têm a função de defender o organismo (CUNNINGHAM et al., 2010). Com uma menor abundância na epiderme, também podemos citar as células de Merkel, que sintetizam catecolaminas e formam terminações nervosas que estão associadas com a sensibilidade tátil (RABE et al., 2006; DANGELO et al., 2007).

O estrato basal ou camada basal também denominado como germinativo é a primeira camada da epiderme, possuindo células cubóides ou cilíndricas situadas na membrana basal. Essa camada, juntamente com a camada espinhosa, está associada com a renovação da epiderme, porque ambas possuem queratinócitos com uma excessiva atividade mitótica. A camada espinhosa é composta por células poliédricas ou pavimentosas (células de Malpighi), as quais dispõem de um maior número de queratina quando comparada com a camada basal. Nesta mesma camada ainda podemos encontrar desmossomos e tonofilamentos, contribuindo para que as células da epiderme fiquem unidas proporcionando uma maior resistência a atritos (JUNQUEIRA et al., 2004).

A terceira camada, nomeada camada granulosa, é composta por células achatadas com grânulos queratinizados e como substância extracelular, proteínas e lipídeos. O conteúdo presente nesses grânulos é transportado por exocitose, criando uma base lipídica sobre a membrana plasmática, impossibilitando a nutrição celular da próxima camada (lúcida) e impermeabilizando a região epidérmica (GARTNER et al., 2007; JUNQUEIRA et al., 2004). Por último, a camada córnea que está localizada na área mais externa da epiderme, onde os queratinócitos são pavimentosos e queratinizados. Essa queratinização é que permite que a epiderme seja regenerada continuamente com inúmeras células decorrentes das divisões consumadas na camada basal (RADOSTITS et al., 2002; GARTNER et al., 2007).

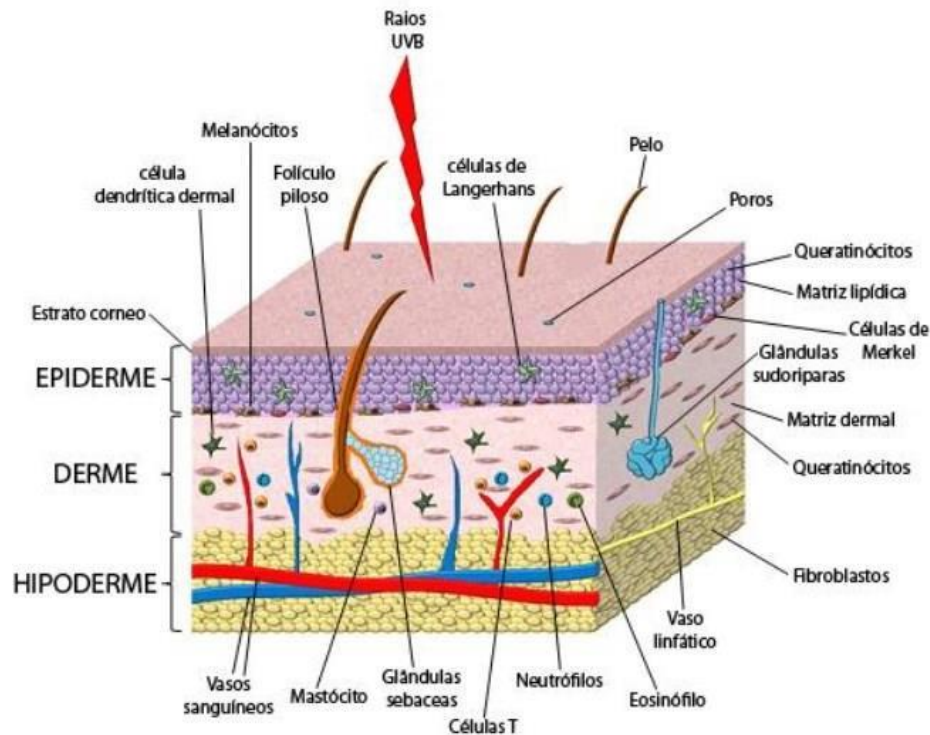
A região dérmica está posicionada abaixo da epiderme, cuja sua espessura pode variar de 1 a 4 mm, formada por tecido conjuntivo repleto de vasos, folículos pilosos, corpúsculos tácteis, glândulas sebáceas e sudoríparas (SILVER et al., 2001; ARNOLD et al., 1994). Essa região pode ser fragmentada em duas camadas: a camada papilar, onde encontramos as papilas dérmicas, fibras conjuntivas frouxas e as fibras elásticas; e a reticular que é considerada mais profunda, na qual podem ser encontradas as fibras elásticas e as conjuntivas não remodeladas. Vários tipos celulares compõem a região dérmica, especificamente: fibroblastos, fibrócitos, células imunológicas (macrófagos, mastócitos e leucócitos), além dos neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos (ARNOLD et al., 1994).

Os fibroblastos são células delgadas com formato cilíndrico, extremidades alongadas e núcleo oval. Esse tipo de célula é responsável por sintetizar componentes da matriz extracelular que irá auxiliar na formação do tecido de granulação, reepitelizando e assegurando a conservação da integridade do tecido (PAGNANO et al., 2008). Além disso, os fibroblastos são capazes de sintetizar elastina, fibronectina, proteases e fibras colágenas, tornando-se também encarregados pela remoção do tecido desvitalizado presente nas feridas (debridamento) e remodelando fisiologicamente a célula (HILDEBRAND et al., 2005).

O segundo tipo celular considerado como um dos mais importantes no processo cicatricial são os fibrócitos, por auxiliar no mecanismo responsável pela formação do granuloma, na produção de colágeno e da matriz extracelular. Os fibrócitos também participam do processo de remodelação da pele e em processos inflamatórios, por meio da produção de fatores de crescimento e angiogênicos (ABE et al., 2001; QUAN et al., 2004).

Por fim, a hipoderme ou tecido subcutâneo, que é a camada mais interna do tecido epitelial. Ela é formada principalmente por tecido adiposo e vasos sanguíneos. A hipoderme dispõe de importantes funções, como: depósito de gordura, isolante térmico e proteção para o organismo (PROKSCH et al., 2008; DI MEGLIO et al., 2011) (Figura 5).

Figura 5. Delineamento representativo das estruturas da pele e seus constituintes celulares.



Adaptado de Kendall et al., 2013.

1.1.10 Feridas: Definição e Classificação

A ferida poder ser definida como qualquer lesão na pele provocada por fatores químicos, físicos ou biológicos que leve a descontinuidade cutânea (STRODTBECK et al., 2001; BORGES et al., 2008). Fundamentado pelo processo de reparação, a evolução das feridas podem ser mencionadas como agudas e crônicas. Feridas agudas são lesões ocasionadas por cortes, incisões ou excisões cirúrgicas que finalizam o processo cicatrizante dentro do tempo determinado, respondem ao tratamento e cicatrizam sem nenhuma complicação. Em contraposição, as feridas crônicas são mencionadas como lesões onde a cicatrização progride lentamente em virtude das repetidas injúrias ao tecido e também a prováveis processos patológicos que prejudicam a continuidade do processo cicatricial (STRODTBECK et al., 2001).

Quanto ao comprometimento tecidual, existem três tipos principais de lesões da pele (WEISSMAN et al., 1992):

1º - lesão superficial: quando apenas a epiderme é lesada e a reepitelização do tecido é realizada por deslocamento das células sem resultar em cicatriz;

2º - lesão profunda: constituída por feridas que apresentam perdas inestimáveis de tecidos, pouca hemorragia, escassez de infecção e bordas com bastante proximidade;

3º - lesão aberta: ferida apresentando perda de substância, na maioria das vezes com

infecção e suas bordas geralmente são irregulares.

Outro tipo de classificação é referente ao agente causador da lesão, podendo ser cirúrgicas ou incisais, que são lesões provocadas por instrumentos cortantes, lacerantes ou perfurantes (TAZIMA et al., 2009).

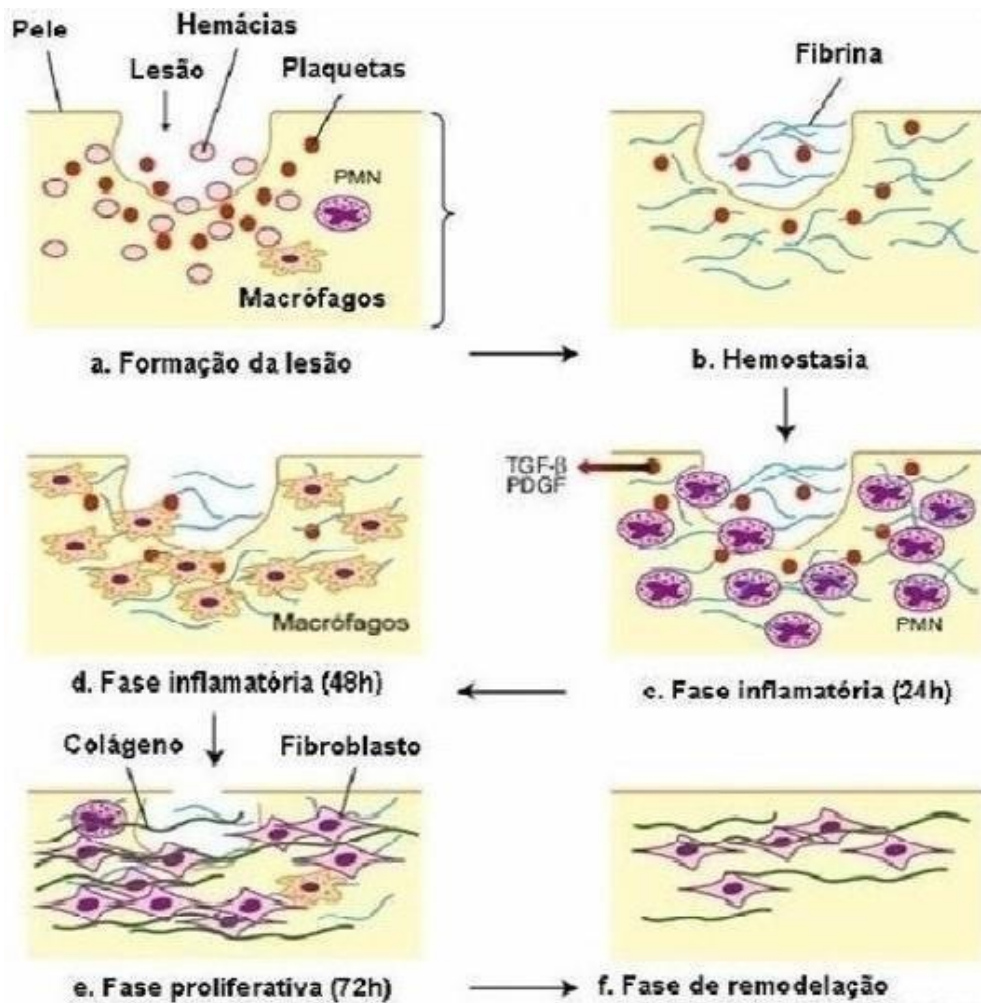
Também podemos classificar as feridas como: limpas, limpas-contaminadas, contaminadas e infectadas. As feridas limpas são lesões causadas por procedimentos cirúrgicos, sem a presença de nenhuma contaminação por microrganismos. O processo de transformação da ferida limpa para limpa-contaminada pode levar de zero a seis horas e apresenta indícios de contaminação. A contaminação por total ocorre quando a mesma encontra-se exposta a agentes bacterianos por maior quantidade de tempo (seis a doze horas), evidenciando presença de debris celulares. No entanto, as feridas infectadas são facilmente identificadas pela presença de processos infecciosos, exsudação e tecido bastante debilitado (RUND et al., 1996; DAVIDSON et al., 1998).

1.1.11 Processo de Cicatrização Tecidual

A cicatrização é um processo biológico dinâmico, dependente da combinação de vários fatores e que abrange uma série de acontecimentos envolvendo elementos da matriz extracelular, células residentes (fibroblastos, queratinócitos, células nervosas, células endoteliais), leucócitos (macrófagos, linfócitos, neutrófilos), mediadores protéicos (citocinas e fatores de crescimento) e lipídicos (prostaglandinas, fator de agregação plaquetária e leucotrienos), objetivando a restauração da continuidade funcional e anatômica do tecido (BARBUL, 1990; BROUGHTON et al., 2006; EMING et al., 2007).

Segundo Gurtner et al. (2008), o processo cicatricial ocorre em quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferativa e remodelação (Figura 6).

Figura 6. Fases do Processo de cicatrização em lesões cutâneas.



Fonte: Experts Reviews in Molecular Medicine.

A fase da hemostasia tem início no momento da indução da lesão tecidual e o rompimento dos vasos sanguíneos, acarretando o preenchimento de sangue rico em plasma e elementos celulares para as áreas lesadas (WERNER et al., 2003; BALBINO et al., 2005; EMING et al., 2007;). As plaquetas presentes no sangue aderem-se às fibras colágenas presente no endotélio lesado através de receptores específicos (Glicoproteínas – GPIb/IX/V), que logo em seguida são ativados, permitindo a liberação do conteúdo granular e em consequência estimulando a ativação dos fatores responsáveis pela coagulação plasmática (DIEGELMANN et al., 2004; STRONCEK et al., 2009). O desenvolvimento desse coágulo contribuirá para a junção das bordas das feridas, no cruzamento da fibronectina, além de promover uma matriz provisória em que células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos possam ingressar na lesão para ajudar na reestruturação e prevenir a entrada de microrganismos (MANDELBAUM et al., 2003; PARK et al., 2004).

A indução das plaquetas não liberam apenas os fatores da coagulação que são essenciais para a contenção do sangramento e perda de eletrólitos e fluidos, mas também secretam moléculas sinalizadoras (citocinas e fatores de crescimento) no local da ferida, iniciando a resposta cicatricial. Dentre eles os dois fatores considerados como de maior importância são os fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que inicia o processo de quimiotaxia de neutrófilos, fibroblastos e macrófagos, e o fator transformador de crescimento-beta ($TGF-\beta$), que é encarregado de agregar outro importante sinal durante o início da cascata da cicatrização, atraindo os macrófagos e estimulando a secreção de citocinas como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), interleucina 1- beta ($IL-1\beta$), fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$) e PDGF (DIEGELMANN et al., 2004; STRONCEK et al., 2009; KONDO et al., 2010).

A fase inflamatória inicia-se logo após a injúria do tecido, com duração entre duas ou mais semanas e na maioria das ocasiões podem ser identificadas por sintomas característicos, como edema (inchaço), hiperemia (vermelhidão) e dor em torno do local lesionado (BUSTI et al., 2005).

Durante a inflamação percebe-se a presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos, linfócitos e incontáveis mediadores químicos. No momento que ocorre a injúria do tecido, os PMN são estimulados e permanecem por um período de três a cinco dias, sendo eles primordiais para a realização da fagocitose das bactérias no início do processo inflamatório (MANDELBAUM et al., 2003; TELLER et al., 2009; REINKE et al., 2012).

Os macrófagos quando ativados são considerados as principais células durante o processo de reparo do tecido, deteriorando e removendo constituintes existentes no tecido conjuntivo danificado, como a elastina, colágeno e proteoglicanas. Além desse papel, os macrófagos têm a função de secretar fatores quimiotáticos que contribui para a atração de outras células inflamatórias para a região da ferida; e produz prostaglandinas, que agem como poderosos vasodilatadores causando a permeabilidade dos microvasos (SINGER et al., 1999; EMING et al., 2007).

Outros dois tipos de células de suma importância durante a fase inflamatória são os neutrófilos, que durante as primeiras horas após a lesão infiltram o local em grande quantidade, predominando a área lesada até o segundo dia. Suas funções primordiais são atribuídas ao bioprocessos de fagocitose durante a hidrólise enzimática da matriz extracelular, no direcionamento dos grânulos para a rede de fibrina, digestão de bactérias e tecidos desvigorado de forma a favorecer a limpeza da área lesionada e viabilizar o início da próxima fase (BROUGHTON et al., 2006).

O segundo tipo celular são os monócitos, que se agregam nos capilares e vênulas, migram ao longo do endotélio e com sua chegada ao local amadurecem e dão forma aos macrófagos. Estas células prevalecem no decorrer de três a cinco dias após a injúria tecidual. Elas possuem atribuições fundamentais na produção e liberação de fatores que contribui na maturação do tecido de granulação, auxiliando os neutrófilos no processo de fagocitose de bactérias e restos celulares, propiciando a multiplicação de células mesenquimais e fibroblastos, atuando na angiogênese e contribuindo para a retirada dos neutrófilos, dando início a proliferação celular (CLARK, 1996; KOOPMANN, 1991; MENDONÇA et al., 2009).

Assim que as células inflamatórias passam a ter uma quantidade reduzida na lesão, as células endoteliais, os fibroblastos e queratinócitos permanecem a produzir os fatores de crescimento PDGH, FGF- β e o fator de crescimento para queratinócitos alfa, cuja sua atividade crucial é estimular a mitose dos fibroblastos e células epiteliais (BROUGHTON et al., 2006).

A proliferação é a fase encarregada pelo fechamento da lesão, tendo início em três ou quatro dias e pode permanecer até a quarta semana. Esta fase envolve angiogênese, intensa migração celular e a produção de colágeno pelos fibroblastos, estimulando a reepitelização tecidual (GREAVES et al., 2013; SINNO et al., 2013; BEANES et al., 2003; LI et al., 2007). Inicialmente, ocorre a ativação e migração de fibroblastos que passam a ser intensificados devido à liberação de mediadores específicos, destacando-se fatores de crescimento como o VEGF-A e o TGF- α que são liberados por macrófagos. Com o aumento da quantidade de fibroblastos ativados no tecido, os colágenos começam a ser sintetizados e em consequência a matriz extracelular é substituída por um tecido conjuntivo mais resistente que irá contribuir para a formação do tecido de granulação. Este processo é nomeado de fibroplasia e sua competência depende rigorosamente da neovascularização da região (HARTLAPP et al., 2001; TAZIMA et al., 2009; ONO et al., 2014).

A Neovascularização (angiogênese) acontece na matriz extracelular do tecido danificado, onde ocorre a migração e estimulação mitogênica das células endoteliais, que são elementos fundamentais para o desenvolvimento desse processo (ARNOLD et al., 1991). Capilares e vasos quando deteriorados passam a fornecer células endoteliais capazes de invadir a matriz provisória que irá propiciar a formação de um broto e se expandirá para acoplar-se a outro capilar permitindo a circulação do sangue (BARANOSKI et al., 2004). Inúmeras citocinas e fatores de crescimento parecem contribuir para o processo da angiogênese, como o VEGF, peptídeo regulador de afinidade da heparina (HARP), TGF- α , TGF- β e PDGF (ARNOLD et al., 1991; JANIS et al., 2014).

Após o processo de angiogênese e fibroplasia, inicia-se a organização do tecido de granulação que é composto por fibroblastos, macrófagos e vasos neoformados que estão sustentados por uma matriz de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno dos tipos I e II. Sob estímulo de alguns mediadores e fatores de crescimento, as células endoteliais encontradas nas extremidades da lesão começam secretar collagenase e plasminogênio na tentativa de restabelecer a barreira protetora (WERNER et al., 2003). Já no fim dessa fase, a epiderme começa a restaurar-se, envolvendo múltiplos processos, tais como, proliferação e migração de queratinócitos, diferenciação em epiderme estratificada e o restabelecimento da membrana basal que interliga a epiderme com a derme e viabiliza a migração celular (MONACO et al., 2003; LI et al., 2007; STOJADINOVIC et al., 2008).

A fase de remodelação tecidual representa a última fase da cicatrização, podendo ser caracterizada pela substituição do tecido de granulação para maturação, além da deposição, agrupamento e reorganização de fibras colágenas (KONDO et al., 2010). Por consequência, as células inflamatórias gradativamente começam a desabitatar a área lesionada e há o aumento da síntese de colágeno tipo I, devido ao aumento da quantidade de fibroblastos e a necessidade da deposição de fibras colágenas para substituir a matriz deteriorada (DIEGELMAN et al., 2004).

Posteriormente, o tecido de granulação sofre uma redução que contribuirá para a formação de uma cicatriz preliminar, constituída por fibroblastos, colágeno e fragmentos de tecido elástico. Com o tempo esses fibroblastos desaparecem lentamente contribuindo para o crescimento de uma cicatriz acelular que ocupa toda região da lesão, revestida por uma epiderme íntegra e desenvolvida (KRAFTS et al., 2010).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades antioxidante, citotóxica e cicatrizante dos extratos hidroalcoólico de folhas secas e frescas de *Conocarpus erectus*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Preparar os extratos hidroalcoólicos das folhas frescas e secas de *C. erectus* e realizar o perfil fitoquímico destes extratos;
- Determinar os teores de fenóis totais, taninos totais, flavonóides e cumarinas dos extratos obtidos;
- Analisar a atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. erectus*;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. erectus* frente às células Vero e macrófagos (RAW-264.7);
- Obter a formulação fitoterápica semi-sólida contendo os extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. erectus*;
- Investigar o potencial cicatrizante das formulações dos extratos hidroalcoólico das folhas frescas e secas de *C. erectus* sobre lesões cutâneas em ratos Wistar;
- Analisar a histopatologia tecidual dos animais tratados com as formulações dos extratos hidroalcoólico de *C. erectus*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas da espécie *C. erectus* foram coletadas no mangue da Ilha de Itamaracá, situado no litoral norte do Estado de Pernambuco, Brasil (Latitude sul 7° 48' 69"/Longitude Oeste 34° 51' 34") em 20 de março de 2015. Uma exsicata do material botânico foi depositada no acervo do Herbário Geraldo Mariz, do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) devidamente enumerada e catalogada (nº 77.368).

2.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *CONOCARPUS ERECTUS*

Após a coleta, dividimos as folhas em duas porções, onde a primeira foi mantida fresca e a segunda porção foi submetida à secagem em estufa de ar circulante a 45°C. Em seguida, todo o material vegetal foi triturado com o auxílio de um moinho de facas. Para obtenção dos extratos hidroalcoólico foram utilizados 200 g do material vegetal para 500 mL de solução etanol/água 70% (v/v), que foram macerados em temperatura ambiente durante 48 horas, mantidos em vidros âmbar, sob o abrigo da luz e com agitações ocasionais. Em seguida, esses materiais extrativos foram filtrados, concentrados em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a temperatura de 40-50 °C e logo depois liofilizados para obtenção dos extratos hidroalcoólico fresco e seco das folhas de *C. erectus*. Com base na metodologia utilizada por Rodrigues et al. (2011), calculou-se o rendimento total dos extratos, de acordo com a fórmula:

$$Re = (P_{extrato} / P_{folhas}) \times 100.$$

Sendo:

Re = Rendimento total do extrato (%);

P_{ext} = Peso do extrato liofilizado (g);

P_{folhas} = Peso do pó utilizado na preparação do extrato (g)

2.3 PERFIL FITOQUÍMICO – CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

A análise do perfil fitoquímico foi realizada segundo a metodologia descrita por Wagner e Bladt (2009); Waksmundzka-Hajnos et al. (2008). Os extratos foram testados na concentração de 5 mg/mL em Cromatografia de Camada Delgada (CCD) utilizando como fase fixa sílica gel F₂₅₄ (MERCK®) e fases móveis específicas de acordo com o metabólito analisado. Foram usados reveladores e padrões cromatográficos adequados conforme os tipos de metabólitos.

A presença de alcaloides na espécie vegetal foi avaliada borrifando-se a placa cromatográfica com o reagente Dragendorff. A identificação dessa classe de metabólitos é realizada quando na placa aparecem manchas laranja ou ainda marrom-alaranjada.

Para verificar a presença de esteroides/triterpenoides, a placa cromatográfica foi borrifada com o reagente de Liebermann-Buchard e em seguida foi aquecida a 100 °C até o surgimento de uma mancha azul-esverdeada que caracteriza a presença de esteroides ou ainda roxa/rosa característica da presença de triterpenos.

Quanto à presença dos taninos, a placa cromatográfica foi borrifada com a solução de cloreto férrico. O resultado deste teste é considerado positivo para os taninos hidrolisáveis quando ocorrer a presença de manchas azuis, enquanto que os taninos condensados é confirmada pelo surgimento de manchas verdes.

Os derivados cumarínicos também foram avaliados, borrifando-se a placa cromatográfica uma solução de hidróxido de potássio (KOH 5%). A identificação desta classe de metabólitos é considerado positivo quando ocorre o aparecimento de manchas verdes e verde-azuladas indicando a presença de cumarinas e manchas amarelo-esverdeadas indicando a presença de cumarinas não substituídas.

Na análise de flavonóides, as amostras foram aplicadas em placa cromatográfica e reveladas com reagente de NEU (solução a 1% de difenilboriletoxietilamina). A presença de flavonóides foi observada em câmara de UV (365 nm), no qual manchas de fluorescência alaranjada (às vezes vermelha), amarela ou verde representam esta classe.

2.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS

Para determinação do conteúdo de fenóis totais foi utilizado a metodologia descrita por Amorim et al. (2008). Os extratos da planta foram diluídos em metanol P.A numa concentração de 1 mg/mL em balão volumétrico de 50 mL, em triplicata.

Foi adicionada uma alíquota de 0,2 mL (200 µL) do extrato diluído a um tubo de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu (solução aquosa 10%), 1 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%) e completamos o volume com H₂O destilada para 10 mL. Após a preparação desta solução, agitou-se e posteriormente permaneceu em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. Passado esse período, a absorbância da mistura foi medida a 760 nm contra um branco preparado com água destilada.

A curva de calibração foi realizada em tubos de ensaio com alíquotas de 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mL da solução padrão de ácido tânico a 1 mg/mL, em água destilada. Posteriormente, foram adicionados 500 µL da solução de Folin-Ciocalteu e 1 mL da solução de carbonato de sódio em cada tubo de ensaio. O volume final foi completado para 10

mL com água destilada. As concentrações finais obtidas do ácido tânico foram 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 µg/mL, respectivamente. A cor azul produzida pela reação apresenta absorção máxima a 760 nm e é proporcional à taxa de compostos fenólicos. O teor de fenóis totais foi expresso como miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de amostra (mg EAT/g).

2.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE TANINOS

A determinação do teor de taninos foi realizada segundo protocolo desenvolvido por Amorim et al. (2008) e adaptado para as espécies. Os extratos foram diluídos em metanol P.A numa concentração de 1 mg/mL em balão volumétrico de 50 mL, em triplicata.

Posteriormente, 1 g de caseína foi transferido para erlenmeyer de 50 mL, acrescentando 6 mL da amostra diluída e 12 mL de água destilada, em triplicata. Após 3 (três) horas de reação sob agitação, a solução foi filtrada em balão volumétrico e o volume foi completado para 25 mL com água destilada. Foi retirada uma alíquota de 1 mL e quantificados os fenóis residuais pelo método de Folin-Ciocalteu. O teor de taninos foi calculado pela diferença entre o conteúdo de fenóis totais e fenóis residuais. Como padrão foi utilizado o ácido tânico, a curva de calibração foi preparada como descrito no item 4.3.

2.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONÓIDES

A quantificação dos teores de flavonóides foi baseada na metodologia descrita por Peixoto Sobrinho et al. (2008). Esta reação promove um deslocamento batocrômico e uma intensificação de suas absorções, podendo ser quantificado sem sofrer influência de outros compostos fenólicos presentes na amostra.

Os extratos foram pesados e diluídos em metanol P.A numa concentração de 1 mg/mL em balão volumétrico de 50 mL, em triplicata. Para quantificar os flavonóides, uma alíquota de 200 µL do extrato diluído foi transferida para tubos de ensaio. Em seguida, foram adicionados 0,120 mL (120 µL) de ácido acético glacial, 2 mL da solução de piridina (20%, v/v em metanol P.A), 0,5 mL (500 µL) do reagente cloreto de alumínio (5%, p/v em água destilada) e completado o volume para 10 mL com água destilada em cada tubo. Após a preparação desta solução, agitou-se e em seguida permaneceu em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. Após esse período, a absorbância foi determinada a 420 nm contra um branco preparado com água destilada.

A curva de calibração foi preparada com alíquotas de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 mL da solução de rutina (0,1 mg/mL em metanol), em tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 120 µL da solução de ácido acético, 2 mL da solução de piridina, 0,5 mL do reagente cloreto de alumínio. O volume final foi completado para 10 mL com água

destilada. As concentrações finais de rutina foram de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0 µg/mL, respectivamente. O teor de flavonóides totais foi expresso como miligramas equivalente de rutina por grama de extrato (mg ER/g).

2.7 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CUMARINAS

O ensaio colorimétrico descrito por Osório e Martins (2004) com adaptações foi utilizado para quantificar o conteúdo de cumarinas. Foram transferidos 0,5 mL do extrato diluído (1,0 mg/mL) para tubos de ensaio em triplicata. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de água destilada e 500 µL da solução de acetato de chumbo. A amostra foi agitada e, em seguida, foram adicionados 7 mL de água destilada. Desta solução, 2 mL foram transferidos para novos tubos de ensaio e adicionados 8 mL da solução de ácido clorídrico.

As amostras permaneceram por 30 minutos ao abrigo da luz à temperatura ambiente. A absorbância da mistura foi medida a 320 nm contra um branco preparado com água destilada.

A curva de calibração (alíquotas de 10, 25, 100, 200, 300, 400 e 500 µL) foi preparada com uma solução padrão de 1,2-benzopirona e todos os demais reagentes citados anteriormente para os extratos, aferindo-se o volume final para 10 mL com água destilada. O ensaio foi realizado em triplicata e as concentrações finais de cumarina ficaram entre 0,4-20,0 µg/mL. O teor de cumarinas totais foi expresso como miligramas equivalente de cumarina por grama de extrato (mg EC/g).

2.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *C. ERECTUS*

A atividade sequestradora de radicais livres foi determinada medindo a capacidade de um composto para remover os radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), conforme descrito por Peixoto Sobrinho et al. (2011) com modificações.

Os extratos foram diluídos em metanol P.A numa concentração de 0,5 mg/mL em balão volumétrico de 100 mL, em triplicata. Alíquotas de 100 a 1000 µL de cada extrato ou padrão foram transferidos para tubos de ensaio, aferindo-se o volume final para 5 mL com metanol P.A. As concentrações finais dos extratos ou padrão (ácido ascórbico) foram de 10-500 µg/mL. Aos extratos diluídos foram adicionados 3 mL da solução de DPPH a 40 µg/mL (ou 3 mL de metanol para o branco) em cada tubo, em duplicata. As soluções foram agitadas cuidadosamente e deixadas em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. A absorbância da mistura foi medida em espectrofotômetro a 517 nm, contra um branco preparado com metanol. A solução do controle negativo consiste na utilização da solução de DPPH a 40 µg/mL. A atividade de remoção dos radicais livres foi expressa como a

concentração eficiente capaz de capturar 50% dos radicais (CE₅₀).

2.9 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS SEMI-SÓLIDA (CREME)

CONTENDO EXTRATOS DE *C. ERECTUS*

A formulação semi-sólida, utilizando creme aniônico (Lanette) como veículo, foi produzido a partir dos extratos hidroalcoólico das folhas de *C. erectus*, sendo manipulada dentro dos padrões e controle de qualidade para medicamentos no Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos da Universidade Federal de Pernambuco. As concentrações dos extratos utilizados foram de 5 e 10%. Como controle negativo foi utilizado o veículo da formulação (creme lanette) e como positivo utilizamos o fármaco Dexpanthenol 5% em creme.

2.10 MATERIAL BIOLÓGICO

2.10.1 Células Vero e Macrófagos murinos (RAW-264.7)

As células Vero (fibroblastos de rim de macaco verde africano) e os macrófagos murinos (RAW-264.7) foram provenientes do Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos/UFPE, mantidas de acordo com o protocolo estabelecido pelo setor.

2.10.2 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos wistar machos (*Rattus norvegicus*), pesando entre 250 a 300g, provenientes do Biotério do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades de aço inoxidável e maravalha como cobertura, tendo acesso livre à água “*ad libitum*” e ração balanceada (Presence - Purina Brasil), mantidos num ambiente com temperatura de 22 ± 2 °C e luminosidade controlada, proporcionando um ciclo claro-escuro de 12 h. Os animais foram mantidos de acordo com as normas internacionais do Conselho de Laboratório de Animais Experimentais (ICLAS).

2.10.3 Procedimentos Éticos

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e com as normas estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, sob protocolo de

número 23076.008471/2016-53. Este projeto encontra-se em concordância com as normas vigentes no Brasil, de acordo com a Lei 9.605- art. 32 e decreto 3.179- art. 17, de 21/09/1999, no que se refere ao uso de animais para fins científicos (Anexo 1).

2.11 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

2.11.1 Avaliação citotóxica dos extratos hidroalcoólicos de *C. erectus*

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo ensaio colorimétrico do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, conforme proposto por Takeuchi, Baba e Shigeta (1991), com algumas modificações segundo Sieuwerts et al. (1998). Uma suspensão (1×10^5 células/mL) de células Vero e outra de Raw 264.7 foram distribuídas em uma placa de 96 poços contendo meio de cultura DMEM. As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂.

Após 24 h de incubação foram adicionadas diferentes concentrações dos extratos hidroalcoólico dissolvidos em DMSO (Dimetilsulfóxido 1%) não suplementado com SFB (Soro Fetal Bovino) e incubadas a 37 °C por 72 h. Após esse período de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism* 5.0. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras com atividade (95 a 100 % de inibição), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 70 a 90%) e sem atividade (inibição de crescimento menor que 50 %) (RODRIGUES et al., 2014).

2.11.2 Modelo de ferida excisional

Para o delineamento geral do experimento, ratos Wistar machos (200 - 250g) foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos: Grupo I (controle negativo – creme lanette); Grupo II (FHFCS 10% - Formulação em creme do extrato hidroalcoólico das folhas secas de *C. erectus*); Grupo III (Dexpantenol – Padrão) e Grupo IV (FHFCS 10% - Formulação em creme do extrato hidroalcoólico das folhas frescas de *C. erectus*). Cada grupo foi subdividido em quatro subgrupos com cinco animais cada para eutanásia nos 3°, 7°, 14° e 21° dias. Os animais foram previamente anestesiados com uma associação de ketamina (10 mg kg⁻¹) e xilazina (3 mg kg⁻¹). Posteriormente esses animais foram posicionados em decúbito ventral, para realização da tricotomia manual e antisepsia com álcool iodado 0,1% e na linha

média dorsal da região cervical de cada animal, a área incidida foi demarcada usando um punch metálico com lâmina cortante na sua borda inferior ($\pm 10 \text{ mm}^2$). No procedimento cirúrgico para retirada da pele, foram utilizados tesoura reta de íris e pinça de Adson. Os tratamentos foram iniciados no dia da indução da lesão e uma nova camada das formulações ou veículo (creme lanette) ou dexpanthenol (5%) foram aplicados ($\pm 95\text{mg}$) diariamente de acordo com seus respectivos grupos, com auxílio de espátulas estéreis. Medições dos diâmetros maior e menor das bordas foram realizadas no momento da biópsia ao 3°, 7°, 14° e 21° dias.

2.11.3 Modelo de ferida excisional utilizando Aro de Contenção

Foram utilizados 24 ratos Wistar os quais foram pesados e anestesiados com xilazina (3 mg kg^{-1}) e cetamina (10 mg kg^{-1}), por via intramuscular. Posteriormente os animais foram posicionados em decúbito ventral, e realizada a tricotomia manual e antissepsia com álcool iodado 0,1%. Na linha média dorsal da região cervical de cada animal, a área incidida foi demarcada usando um punch metálico com lâmina cortante na sua borda inferior ($\pm 10 \text{ mm}^2$). No procedimento cirúrgico para retirada da pele, tecido subcutâneo, panículo carnoso e fáscia, utilizou-se tesoura reta de íris e pinça de Adson. Após a excisão, foi suturado um aro de contenção confeccionado em silicone atóxico e hipoalergênico, utilizando-se quatro pontos isolados simples com fio monofilamentoso de náilon 4.0 agulhado, distribuídos simetricamente, de modo que a ferida cirúrgica permanecesse no centro (GALIANO et al., 2004).

Após a cirurgia, os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos com cinco animais cada: Grupo I (controle negativo – creme lanete); Grupo II (FHFCS 10% - Formulação em creme do extrato hidroalcoólico das folhas secas de *C. erectus*); Grupo III (Dexpanthenol – Padrão), Grupo IV (FHFCS 10% - Formulação em creme do extrato hidroalcoólico das folhas frescas de *C. erectus*), Grupo V (FHFCS 5% - Formulação em creme do extrato hidroalcoólico das folhas frescas de *C. erectus*) e Grupo VI (FHFCS 5% - Formulação em creme do extrato hidroalcoólico das folhas secas de *C. erectus*), sendo tratados diariamente durante 14 dias com $\pm 95\text{mg}$ dos respectivos produtos. No 14° dia foi realizada a avaliação dos tecidos e a área real das feridas foi mensurada.

2.12 AVALIAÇÃO DO GRAU DE CONTRAÇÃO (%) E MACROSCÓPICA DOS MODELOS EXCISIONAIS

Para avaliar a contração das feridas tratadas com os diferentes produtos, as mesmas foram mensuradas utilizando um paquímetro digital (0-150 mm, Mitutoyo®). Utilizou-se a

equação formulada por Prata et al. (1988): onde A representa a área (mm²); “R”, o raio maior e “r”, o raio menor.

$$A = \pi \cdot R \cdot r$$

O grau de contração expresso em percentual será mensurado pela equação proposta por Ramsey et al. (1995), sendo: Wo = área inicial da ferida; Wi = área da final da ferida.

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

As avaliações foram feitas pelo mesmo examinador, estando os animais sob contenção física. As feridas foram avaliadas também quanto à presença de exsudato, formação de crosta, início da reepitelização e presença de fibrina.

2.13 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As feridas retiradas dos ensaios excisionais com aro de contenção foram fixadas em formalina tamponada neutra a 10% por um período de 24 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas com etanol, clareada com xilol e infiltrada com parafina. Foram realizados cortes de aproximadamente 5 µm de espessura e as amostras processadas de acordo com a técnica histoquímica da hematoxilina/eosina. As lâminas foram fotografadas no microscópio Olympus BX-50 (Aumento de 100x), digitalizadas pelo programa DP2-BSW.

2.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos por média ± desvio padrão para cada grupo experimental. Os dados foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo teste de Tukey, considerando ****p<0,0001 como indicativos de significância estatística quando comparados ao grupo controle. Os dados foram analisados pelo programa *GraphPad Prism* versão *Instant 6.0* (*GraphPad Software*, San Diego, CA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

A partir da preparação dos extratos hidroalcoólico das folhas frescas e secas de *Conocarpus erectus* foi calculado seus respectivos rendimentos (9,25% e 5,52%), no qual o extrato hidroalcoólico das folhas frescas foi o que obteve maior rendimento (Tabela 1).

Tabela 1. Rendimento (%) dos extratos hidroalcoólico das folhas frescas e secas de *Conocarpus erectus*.

Extrato	Rendimento
Folhas Frescas	9,25%
Folhas Secas	5,52%

Em geral, o rendimento dos extratos que são provenientes de espécies vegetais podem apresentar variações devido aos métodos de extração (DINIZ et al., 2004). Segundo Sartório et al. (2000), no momento que o material vegetal é submetido ao processo de secagem, ocorrerá uma redução significativa da massa em relação à planta fresca, diminuindo assim seu rendimento final.

Após a secagem, ocorrem desidratação e alteração da coloração das folhas. Essa modificação ocorre devido às reações químicas e os pigmentos (clorofila e carotenoide), que proporciona o escurecimento dos vegetais. Esses pigmentos são lipossolúveis e sensíveis às condições de secagem, ou seja, sofrem modificações químicas devido ao aumento da temperatura (CABRAL-MALHEIROS et al., 2010; SILVA et al., 2007).

3.2 PERFIL FITOQUÍMICO – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A Tabela 2 mostra os resultados do perfil fitoquímico dos extratos hidroalcoólicos de *C. erectus* por Cromatografia em Camada Delgada. Nesta análise, foram utilizados como fase móvel vários sistemas de solventes com diferentes polaridades.

Tabela 2. Prospecção fitoquímica dos extratos hidroalcoólico das folhas frescas e secas de *C. erectus*.

Metabólitos	Padrões	Reveladores	Fase Móvel/Proporção	Extrato F. Frescas	Extrato F. Secas
Taninos	Ácido Tânico	Cloreto Férrico (1%)	Clorofórmio: Metanol: Água (65:30:05)	+	+
Alcaloides	Escopolamina	Dragendorff	Tolueno: Acetato de Etila: Dietilamina (70:20:10)	-	-
Flavonoides	Quercetina	NEU	Acetato de Etila: Ác. Fórmico: Ác. Acético glacial:Água (100:11:11:26)	+	+
Esteróides e Terpenóides	Lupeol	Liberman- Burchard	Tolueno:Clorofórmio: Etanol (40:40:10)	+	+
Cumarina	Ácido Cumárico	KOH - ETOH (10%)	Clorofórmio: Metanol: Água (01:01)	+	+

(-) Não detectável; (+) Presente.

Através dos resultados obtidos, verificou-se a presença de terpenóides/esteroides, taninos, flavonóides e cumarinas, em ambos os extratos hidroalcoólicos. El-Kamali et al. (2015) observaram a presença de terpenóides, flavonóides e taninos nos extratos etanólico e aquoso de folhas *C. erectus* corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Segundo Matos (1997), a mesma espécie botânica coletada em regiões diferentes pode apresentar diferença na sua composição química. Outro estudo realizado por Abdel-Hameed et al. (2012) utilizando diferentes partes de *C. erectus* demonstraram que os compostos fenólicos, em especial taninos e flavonóides são os metabólitos majoritários presentes em todas as frações do extrato metanólico, no qual conseguiram isolar e identificar rutina, quercetina, catequina, ácido gálico e apigenina (derivados de flavonoide).

3.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONÓIDES, TANINOS E CUMARINAS

O teor de fenóis e taninos totais foram maiores no extrato hidroalcoólico das folhas frescas (46,07 e 42,18 mg EAT/g, respectivamente). O extrato hidroalcoólico das folhas secas apresentou maior teor de flavonóides (15,23 mg ER/g), quando comparado com o extrato hidroalcoólico das folhas frescas (9,86 mg ER/g). Os dois extratos apresentaram baixos teores de cumarinas (tabela 3).

Tabela 3: Determinação dos conteúdos de fenóis totais, flavonóides, taninos totais e cumarinas dos extratos hidroalcoólico das folhas frescas e secas de *C. erectus*.

Extrato	Fenóis Totais (mg EAT/g)	Flavonóides (mg ER/g)	Taninos Totais (mg EAT/g)	Cumarinas (mg EC/g)
Hidroalcoólico Folha fresca	46,07 ± 3,02	9,86 ± 1,57	42,18 ± 3,23	6,85 ± 0,13
Hidroalcoólico Folha Seca	39,40 ± 3,06	15,23 ± 3,90	38,61 ± 2,75	6,31 ± 0,54

mg EAT/g = miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de extrato.

mg ER/g = miligramas equivalente de rutina por grama de extrato.

mg EC/g = miligramas equivalente de cumarina por grama de extrato.

Raza et al. (2016) realizaram a quantificação de fenóis totais em diferentes partes da espécie *C. erectus* utilizando o método de Folin-Ciocalteu e como padrões ácido gálico e catequina. O extrato etanólico das folhas apresentou alto teor de fenóis totais ($30,56 \pm 1,17$ mg EAG/g e $58,23$ mg EAC/g), corroborando com os nossos resultados.

Rajesh et al. (2016) determinaram o conteúdo de taninos totais dos extratos aquoso (25.85 ± 1.45 mg EAT/g), clorofórmio (24.46 ± 0.89 mg EAT/g) e metanólico (50.46 ± 1.1 mg EAT/g) das folhas de *Terminalia catappa* utilizando o método de Folin-Ciocalteu e o ácido tânico como padrão. Esses resultados juntamente com os obtidos nesse trabalho mostram que diferentes espécies da família Combretaceae contem alto teor de taninos.

Outro estudo realizado com o extrato metanólico das folhas de *C. erectus* determinou o teor de flavonoides pelo método de cloreto de alumínio usando como padrão rutina, revelando que o extrato obteve o resultado $27,0 \pm 1,34$ mg ER/g (Abdel-Hameed et al., 2013). A maioria dos extratos polares são constituídos por compostos fenólicos, onde podemos encontrar uma variedade de estruturas que possuem ao mínimo um anel aromático e um hidrogênio substituído por um grupamento hidroxila. Os fenólicos são substâncias sintetizadas por plantas, mas que também podem ser originadas através do catabolismo dos aminoácidos (SIMÕES et al., 2010). Esses compostos são bastante conhecidos por possuir importantes propriedades medicinais (BALASUNDRAM et al., 2006). Dentre os compostos fenólicos podemos destacar uma variedade de compostos fragmentados em várias classes (hidroxicinâmico, ácido hidroxibenzóico, proantocianinas, antocianinas, flavonas, flavanonas, flavonóis, isoflavonas, lignanas e estilbenos) (PANTELIDIS et al., 2007).

Com base nos resultados obtidos no presente estudo podemos evidenciar que o extrato hidroalcoólico das folhas frescas possui uma maior quantidade de fenóis e taninos totais, provavelmente devido ao método de extração utilizado e a maior quantidade de água presente nas folhas. Enquanto que o extrato hidroalcoólico das folhas secas demonstrou possuir maior eficiência na recuperação de flavonoides.

3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH

A atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos de *C. erectus* através do método de sequestro de radicais livres DPPH, apresentaram os valores médios de CE_{50} para o método de extração utilizando folhas frescas ($51,89 \pm 2,94 \mu\text{g/mL}$), folhas secas ($55,10 \pm 1,97 \mu\text{g/mL}$) e ácido ascórbico ($13,04 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 4).

Tabela 4: Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólico das folhas frescas e secas de *Conocarpus erectus* utilizando o radical livre DPPH.

Extratos/Padrões	$CE_{50} (\mu\text{g/mL}) \pm \text{D.P.}$
Hidroalcoólico	
Folha fresca	$51,89 \pm 2,94$
Hidroalcoólico	
Folha seca	$55,10 \pm 1,97$
Ácido ascórbico	13,04

CE_{50} = Concentração que inibe 50% da concentração inicial do radical DPPH

Eshwarappa et al. (2015) investigaram a propriedade antioxidante dos extratos clorofórmio, etanólico e aquoso das folhas de *Terminalia chebula* através do método de sequestrar radicais livres DPPH, sendo o extrato etanólico o que apresentou maior capacidade de sequestrar radicais livres, com CE_{50} de $96 \pm 2 \mu\text{g/mL}$, seguido do extrato aquoso com CE_{50} de $143 \pm 06 \mu\text{g/mL}$ e clorofórmio com CE_{50} de $201 \pm 03 \mu\text{g/mL}$.

Vários estudos sugerem que existe uma relação entre os teores totais de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante em diversas espécies de plantas (CAI et al., 2004; KUMARAN et al., 2006). Os compostos fenólicos, incluindo os flavonóides e taninos, derivados de produtos naturais, são considerados os principais constituintes responsáveis pela atividade antioxidante de diferentes espécies vegetais. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redox, que lhes permitem atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio e sequestradores de oxigênio (RICE-EVANS et al., 1996). Com o aumento de compostos fenólicos, também aumenta o número de hidroxilas disponíveis, consequentemente aumenta a possibilidade de doação de hidrogênios para os radicais (RAJAEI et al., 2010).

Estes compostos têm se destacado por apresentar inúmeros efeitos benéficos relacionadas a saúde humana, tais como: atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica, antidiabética e cicatrizante (GUETENS et al., 2002; GALLI et al., 2005). Portanto, a partir dos resultados observados neste trabalho, podemos sugerir que os extratos hidroalcoólicos das folhas frescas e secas de *C. erectus* apresentaram relevante capacidade de sequestrar radicais livres por conter um alto teor de compostos fenólicos.

3.5 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA FRENTE ÀS LINHAGENS DE CÉLULAS VERO E RAW 264.7

O percentual de inibição da viabilidade celular dos extratos hidroalcoólico das folhas frescas e secas estão apresentados na Tabela 5. Os extratos testados na concentração de 50 µg/mL não apresentaram citotoxicidade frente às linhagens Vero e RAW-264.7.

Tabela 5: Avaliação da citotoxicidade dos extratos hidroalcoólico das folhas frescas e secas (50 µg/mL) de *Conocarpus erectus* frente às linhagens Vero e RAW-264.7.

Extratos	% de inibição (Vero)	% de inibição (RAW 264.7)
Hidroalcoólico Folha fresca	15,2 ± 1,1	21,8 ± 2,1
Hidroalcoólico Folha seca	24,0 ± 1,8	31,2 ± 0,9

Santos et al. (2013) investigaram a citotoxicidade dos extratos de *Combretum rupícola* frente a células vero e concluíram que os extratos metanólico e clorofórmio não foram considerados citotóxicos em todas as concentrações utilizadas (0, 0.25, 2.5, 25 e 250 µg mL).

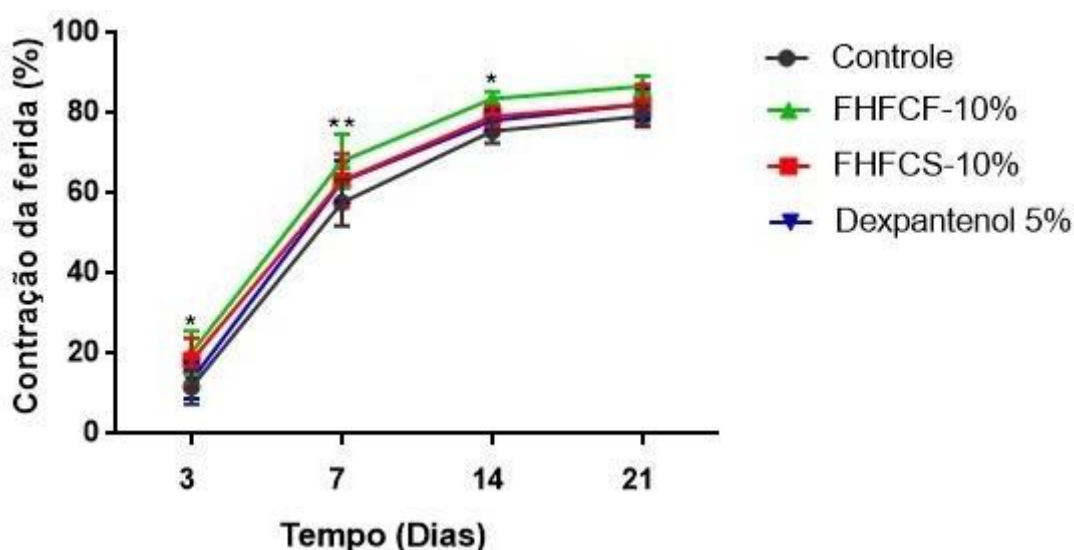
De acordo com Martins et al. (2009) os macrófagos e os fibroblastos são células fundamentais para a evolução de todo o processo cicatricial. Sendo os macrófagos os principais responsáveis pela fase inflamatória, contribuindo para o desenvolvimento do tecido de granulação e desempenhar o processo de fagocitose das bactérias presente nas feridas. Por outro lado, os fibroblastos têm como função a síntese de elastina, fibronectina, proteases e fibras colágenas, tornando-se encarregado pela remoção do tecido desvitalizado presente nas feridas e o remodelamento total da área lesionada (HILDEBRAND et al., 2005). Diante disto, os extratos foram testados em dois tipos celulares que são importantes para o processo de cicatrização e os resultados mostraram que os extratos hidroalcoólico das folhas *Conocarpus erectus* não foram citotóxicos frente às linhagens de Vero e RAW-264.7.

3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DAS FOLHAS DE *C. ERECTUS* SOBRE LESÕES CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR.

3.6.1 Avaliação do grau de contração de lesões cutâneas (%) em modelo excisional

Em relação à percentagem de contração das lesões no modelo de ferida excisional, os grupos tratados com FHFCS e FHFCF na concentração de 10%, e dexpanthenol (5%) foram estatisticamente significativos em relação ao grupo controle. O tratamento com FHFCS apresentou percentuais de contração de 18,27%, 63,19%, 79,21% e 82,22% nos intervalos de 3, 7, 14 e 21 dias, respectivamente. Os animais tratados com FHFCF apresentaram maiores percentuais de contração em comparação aos demais tratamentos, com 20,25%, 68,08%, 83,62% e 86,76% para os mesmos intervalos avaliados (figura 7).

Figura 7: Efeito cicatrizante das formulações semi-sólidas contendo o extrato hidroalcoólico das folhas seca (FHFCS) e fresca (FHFCF) de *Conocarpus erectus* na concentração de 10% sobre lesões cutâneas em ratos Wistar utilizando o modelo de excisão (n=5 animais/grupo).



Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre grupos foram determinados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey, ** $p < 0,01$.

3.6.2 Avaliação dos aspectos macroscópicos e do grau de contração (%) de lesões cutâneas em modelo excisional com aro de contenção

Ao longo dos 14 dias de experimento a evolução das áreas das lesões foram analisadas macroscopicamente, indicando uma melhor reepitelização através dos tratamentos com FHFCS e FHFCF em relação ao grupo controle (Figura 8).

Do 1º ao 4º dia de tratamento com FHFCS e FHFCF foi observado a presença de hiperemia e edema moderado nas lesões cutâneas, enquanto o grupo controle, tratado com creme Lanette demonstrou hiperemia, exsudato e edema acentuado.

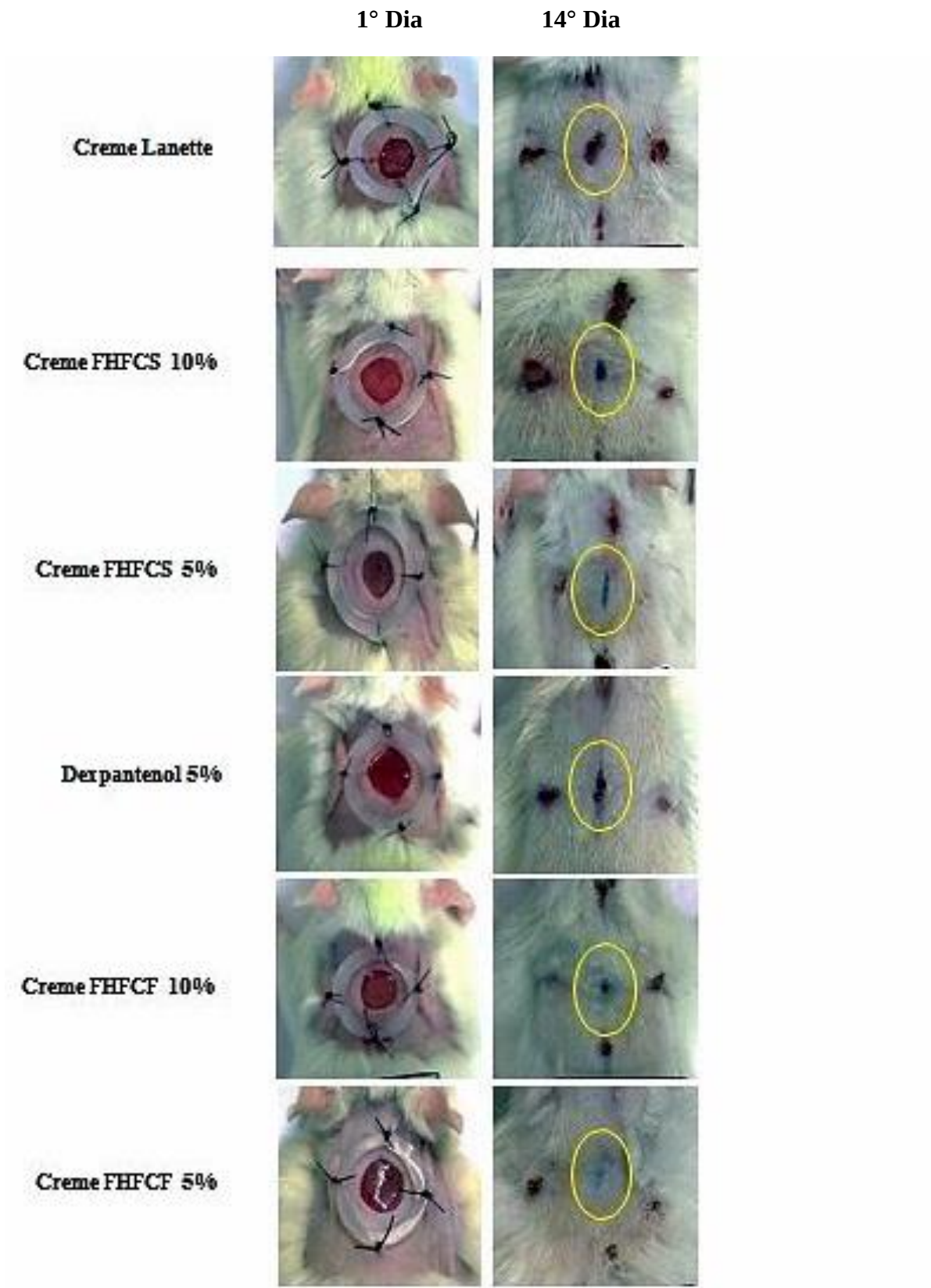
Após a indução da lesão cutânea é formada uma solução constituída por coágulo, fibrina e exsudato inflamatório, originando a formação da crosta que recobrirá a ferida (SANTOS et al., 2006) .

Bates-Jensen (1998) descreveu em seu trabalho, que a presença de exsudato pode ser considerado normal durante as 48 ou 72 horas após a indução da lesão, caso contrário, ultrapassando esse período será reconhecido como um sinal de dano para o processo de cicatrização. A presença de exsudato a partir das 72 horas contribuirá para o crescimento de microorganismo e desintegração do tecido de granulação.

No 7º dia, os grupos tratados com dexpantenol, FHFCS e FHFCF apresentaram crosta, ausência de hiperemia e edema, por outro lado, no grupo controle foi possível observar pouca quantidade de exsudato, apesar da formação de crosta. O aparecimento de crosta logo após a lesão tecidual ocorre em razão do contato com o ar, que promove o ressecamento da lesão. Sua principal função é conter a hemorragia na área lesada e liberar mediadores químicos inflamatórios, que por sua vez irá ativar os fatores de crescimento endotelial vascular e o crescimento de plaquetas, importantes também no processo de angiogênese (ALVES et al., 2011; REINKE et al., 2012).

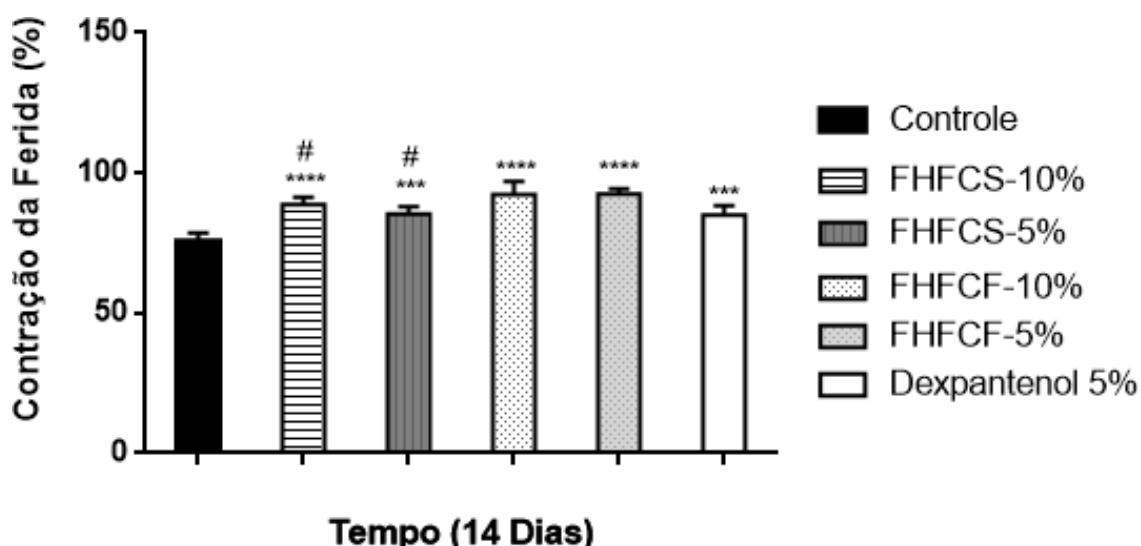
No período entre o 9º e 14º dias, todos os grupos tratados apresentaram desprendimento da crosta, sendo os tratamentos com FHFCS e FHFCF os primeiros que apresentaram tecido cicatricial. Enquanto que os animais do grupo controle ainda apresentavam fragmentos de crosta, caracterizando uma lenta formação do tecido cicatricial.

Figura 8: Aspectos macroscópicos das lesões cutâneas tratadas com creme Lanette, Dexpanthenol (5%), FHFCS e FHFCE (5 e 10%) no 1º e 14º dia.



Em relação à percentagem de contração das lesões no modelo de ferida excisional utilizando aro de contenção, os grupos tratados com FHFCS e FHFCF nas concentrações de 5 e 10% foram estatisticamente significativos em relação ao grupo controle. O tratamento com FHFCS em ambas as concentrações não apresentou diferença significativa em relação ao dexpanthenol, onde apresentaram percentuais de contração de 85,31 e 88,83%, respectivamente. Os animais tratados com FHFCF (5 e 10%) apresentam maiores percentuais de contração em comparação ao dexpanthenol, apresentando 92,33 e 92,58% de redução da área da lesão (Figura 9).

Figura 9: Efeito cicatrizante das formulações semi-sólidas contendo o extrato hidroalcoólico das folhas seca (FHFCS) e fresca (FHFCF) de *Conocarpus erectus* nas concentrações de 5 e 10% sobre lesões cutâneas em ratos Wistar, utilizando o modelo com aro de contenção (n=5 animais/grupo).



Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre grupos foram determinados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey, **** $p < 0,0001$ e # não significativo vs. dexpanthenol (5%).

Estes achados corroboram com outros estudos realizados com espécies da família Combretaceae. Estudos *in vivo* avaliaram a atividade cicatrizante da pomada produzida a partir do extrato da casca de *Terminalia catappa* (Combretaceae) em lesões induzidas em ratos Wistar. O estudo revelou que o tratamento com a pomada reduziu 97% a área das lesões cutâneas (KHAN et al., 2014).

Masoko et al. (2010) avaliaram os efeitos cicatrizantes dos cremes contendo os extratos acetona das folhas de *Combretum imberbe* e *Combretum nelsonii* na concentração de 10 e 20% em lesões induzidas em ratos Wistar, onde verificaram que ambos os extratos promoveram a aceleração da contração das lesões.

Segundo Ghosh et al. (2012), os compostos isolados de plantas podem possibilitar a contração das lesões de forma mais eficaz e ágil em relação a outros fármacos comercializados, especialmente por estimular a proliferação de vários tipos de células e promover a epitelização consecutivamente.

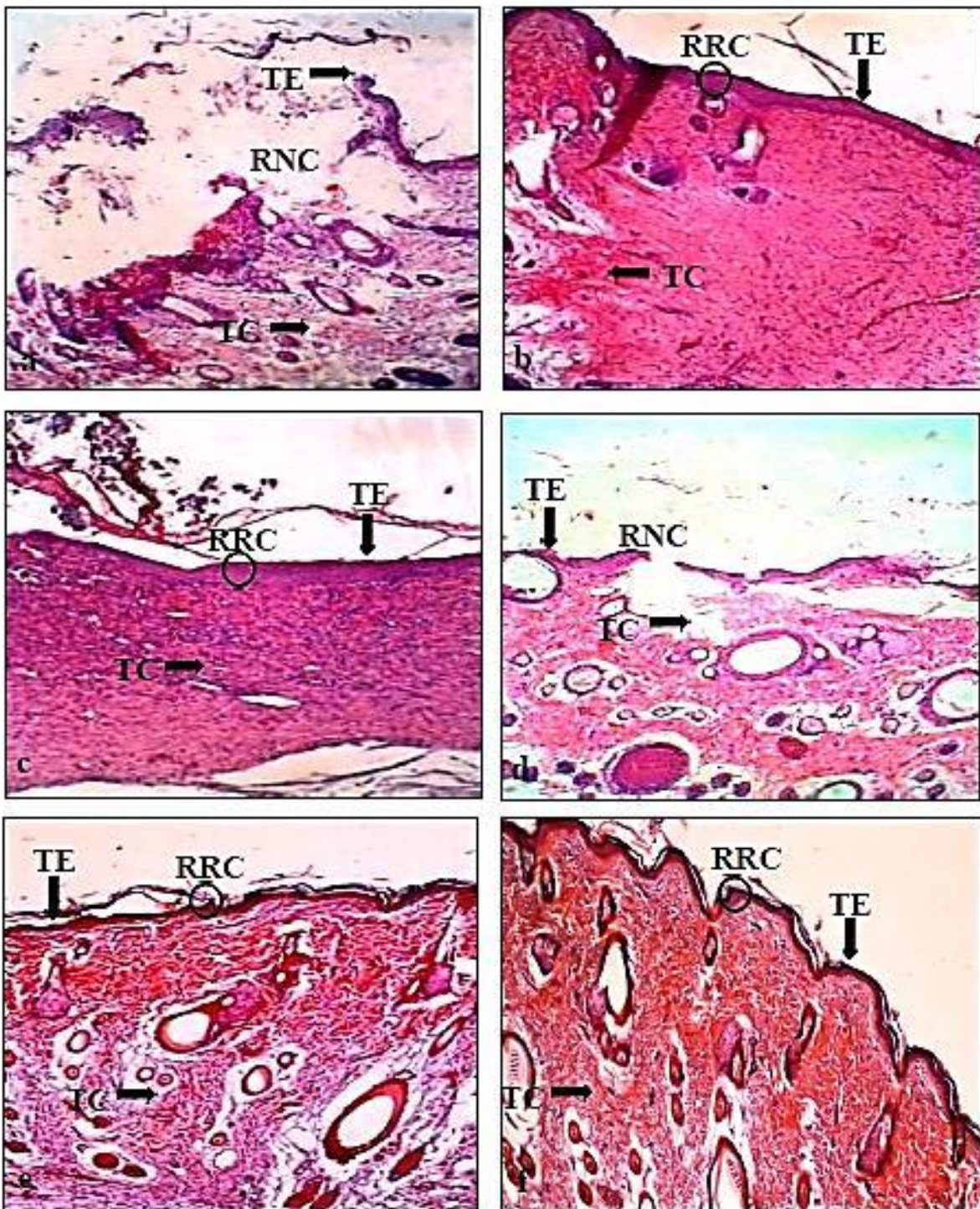
As substâncias provenientes de vegetais apresentam um excelente potencial na aceleração da cicatrização de feridas, sendo atribuída a sua magnífica atividade medicinal e a presença de metabólitos secundários, como os triterpenos, taninos e flavanóides que podem estar contidos nas partes anatômica das plantas (ADIELE et al., 2014). Vários estudos têm comprovado as propriedades farmacológicas dos taninos como sendo o principal responsável pela formação de uma barreira mecânica devido à precipitação das proteínas dos tecidos lesados, formando um revestimento protetor que favorece a regeneração (HEIJMEN, 1997; PANIZZA et al., 1998).

3.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Com relação às alterações no tecido cicatricial, foi observado que os animais tratados com creme Lanette apresentam ruptura no tecido epitelial, caracterizando uma reepitelização não contínua e a reorganização do tecido conjuntivo na região cicatricial (Figura 10). Entretanto, nos grupos tratados com FHFCS e FHFCF (5 e 10%) foi observado a reepitelização contínua da região cicatricial, reorganização do tecido conjuntivo frouxo, presença de fibras colágenas com arranjo modelado próximo ao epitélio e grande concentração de fibroblastos. O grupo tratado com dexpanthenol (5%) apresentou reepitelização não contínua da região cicatricial, reorganização do tecido conjuntivo e presença de fibras colágenas desorganizadas (Figura 10 e 11).

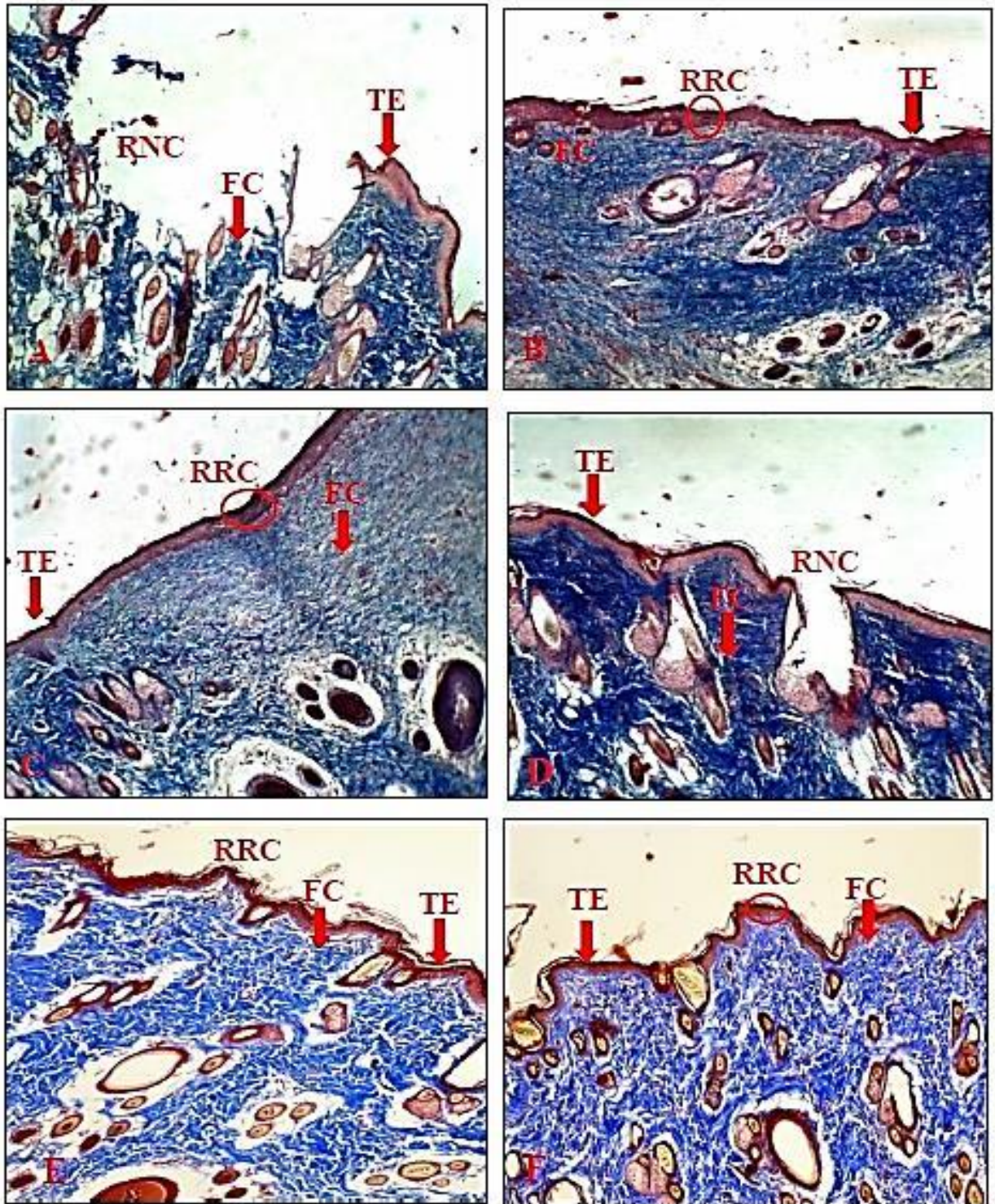
Li et al. (2011) investigaram o potencial cicatrizante dos taninos extraído da espécie *Terminalia chebula* (Combretaceae) no tratamento de feridas cutâneas em ratos. Os resultados demonstraram alterações semelhantes aos encontradas neste trabalho, como uma melhor reepitelização, proliferação de fibroblastos e moderada quantidade de fibras colágenas organizadas, contribuindo para a aceleração do processo cicatricial. Dessa forma, podemos sugerir que os grupos tratados com FHFCS e FHFCF em ambas as concentrações apresentaram uma melhor reepitelização da região cicatricial, possivelmente devido à presença de metabólitos secundários, entre eles, os taninos que promove a formação de uma barreira mecânica no tecido lesado favorecendo a cicatrização do tecido e a regeneração celular.

Figura 10. Cortes histológicos dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional com aro de contenção corado com hematoxilina e eosina (HE 100 X).



Os grupos são representados por (a) creme lanette, (b) FHFCS (10%), (c) FHFCF (10%), (d) dexpanthenol (5%), (E) FHFCF (5%) e (F) FHFCS (5%). Tecido epitelial (TE); Tecido conjuntivo (TC); Reepitelização contínua da região cicatricial (RRC); reepitelização não contínua da região cicatricial (RNC).

Figura 11. Cortes histológicos dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional com aro de contenção corado com tricômio de masson (100 X).



Os grupos são representados por (a) creme lanette, (b) FHFCS (10%), (c) FHFCF (10%), (d) dexpanthenol (5%), (E) FHFCF (5%) e (F) FHFCS (5%). Tecido epitelial (TE); Fibras colágenas (FC); Reepitelização contínua da região cicatricial (RRC); reepitelização não contínua da região cicatricial (RNC).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho podemos concluir que:

- ✓ Os extratos hidroalcoólico das folhas secas e frescas de *Conocarpus erectus* apresentaram, na triagem fitoquímica, taninos, flavonoides, triterpenos e cumarinas;
- ✓ O extrato hidroalcoólico das folhas frescas de *C. erectus* apresentou maiores teores de fenóis e taninos totais, em relação as secas, apresentando maior capacidade de sequestrar radicais livres DPPH;
- ✓ Os extratos não apresentaram citotoxicidade frente às linhagens de células Vero e de macrófagos (RAW-264.7);
- ✓ As feridas tratadas com FHFCS e FHFCF (5 e 10%) apresentaram maior grau de contração quando comparadas ao grupo controle;
- ✓ Histopatologicamente, os grupos tratados com FHFCS e FHFCF (5 e 10%) promoveram uma melhor reepitelização tecidual, com presença de fibroblastos e fibras colágenas, caracterizando uma evolução mais rápida do processo cicatricial quando comparados aos outros tratamentos;
- ✓ Portanto o nosso estudo mostrou que a administração tópica das formulações contendo extratos hidroalcoólicos das folhas secas (FHFCS) e frescas (FHFCF) de *C. erectus* nas concentrações de 5 e 10% auxiliam na aceleração do processo cicatricial, sugerindo estar associado a atividade antioxidante dos metabólitos secundários encontrados, tornando-se alternativas terapêuticas no reparo de lesões cutâneas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, E. S. S.; BAZAID, S. A.; SHOHAYEB, M. M.; EL-SAYED, M. M.; EL-WAKIL, E. A. Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties of *Conocarpus erectus* L. Growing in Taif, Saudi Arabia. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 2, n. 2, p. 93-112, 2012.
- ABDEL-HAMEED, E. S. A.; BAZAID S. A; SABRA, A. N. A. Protective effect of *Conocarpus erectus* extracts on CCl₄-induced chronic liver injury in Mice. **Global Journal Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 52-60, 2013.
- ABE, R.; DONELLY, S. C.; PENG, T.; BUCALA, R.; METZ, C. N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, p. 7556-7562, 2001.
- ADIELE, L.C.; ADIELE, R.C.; ENYE, J.C. Wound healing effect of methanolic leaf extract of *Napoleona vogelii* (Family: Lecythidaceae) in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 8, p. 620–624, 2014.
- ALBERNAZ, L. C.; DE PAULA, J. E.; ROMERO, G. A. S.; SILVA, M. R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L.S. Investigation of plants extracts in tradicional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116-121, 2010.
- ALVES, H.; MACHADO, M. T.; NORONHA, A. M. N. W. Qualitative Analysis of the Repair Process in Surgical Scar in Treated Rats with *Musa Sapientum* Extract, *Aloe Vera*, Collagenase and Placebo. **Revista Ciências em Saúde**, v. 1, n. 2, p. 8-18, 2011.
- AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; PEIXOTO-SOBRINHO, T. J. S.; ARAÚJO, T. A. S.; ALBUQUERQUE, U. P. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 2, n. 1, p. 88-94, 2008.
- ARAÚJO, E. C.; OLIVEIRA, R. A. G.; CORIOLANO, A. T.; ARAÚJO, E. C. Use of medicinal plants by patients with cancer of public hospitals in João Pessoa (PB). **Revista Espaço para a Saúde**, v. 8, n. 2, p. 44-52, 2007.
- ARAÚJO, J. M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4º edição. Viçosa: Editora UFV, 2008. 596 p.
- ARENHOLT-BINDSLEV, D.; BLEEG, H. Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies: tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts. **International endodontic journal**, v. 23, n. 2, p. 84-91, 1990.
- ARGENTA, S. C.; ARGENTA, L. C.; GIACOMELLI, S. R.; CEZAROTTO, V. S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão**, v. 7, n. 12, p. 51-60, 2011.

ARNOLD JR. H. L.; ODOM R. B., JAMES W. D. **A pele: estrutura básica e função. Doenças básicas da pele de Andrews: Dermatologia clinica.** 8º edição. São Paulo: Manole, 1994. P. 1-14.

ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 52, n. 3, p. 407-422, 1991.

BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA, K.; BOUCHET, P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 335-338, 1999.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p.191-203, 2006.

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

BANDEIRA, A. R. G.; NASCIMENTO, M. S. **Estudo Fitoquímico e Atividade Biológica de *Conocarpus erectus* L.** (Mangue botão). 2003. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE.

BARANOSKI, S.; AYELLO, E. A. **Wound Care Essentials.** 1º edition. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 432 p.

BARBUL, A. Immune aspects of wound repair. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 17, n. 3, p. 433-442, 1990.

BARKU, V. Y. A.; BOYE, A.; AYABA, S. Phytochemical screening and assessment of wound healing activity of the leaves of *Anogeissus leiocarpus*. **European Journal of Experimental Biology**, v. 3, n. 4, p. 18-25, 2013.

BARROS, H. M. B; MACEDO, S. J.; ESKINAZI-LEÇA, E.; LIMA, T. **Gerenciamento Participativo de Estuários e Manguezais.** 2000. Recife: Editora Universitária da UFPE.

BASHIR, M.; UZAIR, M.; CHAUDHRY, A. C. A review of phytochemical and biological studies on *Conocarpus erectus* (Combretaceae). **Pakistan Journal of Pharmaceutical Research**, v. 01, n. 01. p. 1 - 8, 2014.

BATES-JENSEN, B. M.; OVINGTON, L. G. **Management of exsudate and infection. Wound care: a collaborative practice manual for physical therapists and nurses.** Gaithersburg: Aspen Publishers, 1998. 159-177 p.

BEANES, S. R.; DANG, C.; SOO, C.; TING, K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, n. 8, p. 1-22, 2003.

BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins: a current perspective. **Biodegradation**, v. 9, p. 343-357, 1998.

BORGES, E. L.; SAAR, S. R. C.; LIMA, V. L. A. N.; GOMES, F. S. L.; MAGALHÃES, M. B. B. **Feridas: Como Tratar**. 2ª edição. Belo Horizonte -BH: *Coopmed*, 2008. 189-223p.

BORRIS, R. P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, n. 1, p. 29-38, 1996.

BRASIL. Ministério Da Saúde. **Portaria nº 971, 3 de maio de 2006**. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. 2006a. Disponível em: http://www.apa-da.pt/20-%2000/frames/lei_brasileira.htm. Acessado em: 22/04/2016.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BREYTENBACH, J. C.; MALAN, S. F. Pharmacochemical properties of *Combretum zeyheri*. **South African Journal of Science**, v. 85, p. 372-374, 1989.

BROUGHTON 2ND, G.; JANIS J. E.; Attinger C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7, p. 12S-34S, 2006.

BROUGHTON, G. I. I.; JANIS, J. E. ATTINGER, C. E. A Brief History of Wound Care. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 117, n. 7S, p. 6S-11S, 2006.

BUSTI, A. J.; HOOPER, J. S.; AMAYA, C. J.; KAZI, S. Effects of perioperative antiinflammatory and immunomodulating therapy on surgical wound healing. *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, v. 25, n. 11, p. 1566–1591, 2005.

CABRAL - MALHEIROS, G.; HECTHEUER, L. H. R.; CANTOL, M. W.; BALSAMO, G. M. O tempo e o tipo de embalagem sobre a erva-mate tipo chimarrão durante armazenagem em condições ambientais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 654 - 660, 2010.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, v. 74, n. 17, p. 2157-2184, 2004.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 131-134, 2005.

CHAPMAN, V. J. **Botanical surveys in mangrove communities**. Monographs on Oceanographic Methodology, UNESCO- Paris, v. 8, p. 53-80, 1984.

CHOWDHURY, R.; ISLAM, N. Ahydroxylated mansumbinem-28-oic acid from *Combretum coccineum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 4, p. 443-445, 2004.

CINTRÓN-MOLERO, G.; SCHAEFFER-NOVELLI Y. **Introducción a la ecología del manglar**. Montevideo, Uruguai, Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la Unesco para América Latina y el Caribe - ROSTLAC, 1983. 109 p.

CINTRÓN-MOLERO G.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Ecology and management of New World Mangroves**. Coastal Plant Communities of Latin America. San Diego: Academic Press, p. 233-258. 1992.

CLARK, R. A. **The molecular and cellular biology wound repair**. 2° edition New York: Plenum Press; 1996. 600 p.

CUNNINGHAM A. L.; ABENDROTH, A.; JONES, C.; NASR, N; TURVILLE, S. **Immunology Cell Biology**, v. 88, n. 4, p. 416-23, 2010.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 3° edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007. 763 p.

DAVID, J. P.; DAVID, J. M. **Plantas Medicinais. Fármacos Derivados de Plantas**. 6° Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.134-145.

DAVIDSON, E. B. Managing bit wounds in dogs and cats. Part II. **Compendium on Continuing Education for the practicing Veterinarian**, v. 20, n. 7, p. 811-820, 1998.

DI MEGLIO, P.; PERERA, G. K.; NESTLE, F. O. The multitasking organ: recent insights into skin immune function. **Immunity**, v. 35, n. 6, p. 857-869, 2011.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers Bioscience**, v. 9, n. 1, p. 283-289, 2004.

DIEGUES, A. C. S. Comunidades litorâneas e os manguezais do Brasil. Simpósio sobre ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira, 2. Águas de Lindóia, 1990. Síntese dos conhecimentos. São Paulo, **Academia de Ciências do Estado de São Paulo**, v. 3, n. 2, p. 123-146, 1990.

DINIZ, M. F. F. M.; MELO, A. F. M.; SANTOS, H. B.; SILVA, M. V. B.; MEDEIROS, I. A. Ensaio Toxicológicos Pré-Clínicos Agudos com as Folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl em Ratos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 8, n. 2, p. 135-142, 2004.

EL-KAMALI, H. H.; ELSHIKH, A. A. Preliminary Phytochemical Screening of 27 Plants Species Use in Ethnoveterinary in Khartoum State, Sudan. **Advances in Life Sciences**, v. 5, n. 2, p. 48-52, 2015.

ELOFF, J. N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of Ethnopharmacology**, v 60, n. 1, p 1-8, 1998.

EMING, S. A.; WERNER, S.; BUGNON, P.; WICKENHAUSER, C.; SIEWE, L; UTERMÖHLEN, O.; DAVIDSON, J. M.; KRIEG, T.; ROERS, A. Accelerated wound closure in mice deficient for interleukin-10. **American Journal of Pathology**, v. 170, n. 1, p. 188-202, 2007.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 514–525, 2007.

ESHWARAPPA, R. S. B.; RAMACHANDRA, Y. L.; SUBARAMAIIHHA, S. R.; SUBBAIAH, S. G. P.; AUSTIN, R. S.; DHANANJAYA, B. L. Antioxidant activities of leaf galls extracts of *Terminalia chebula* (Gaertn.) Retz. (Combretaceae). **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 14, n. 2, p. 97-105, 2015.

EXELL, A. W.; STACE, C. A. REVISION OF THE COMBRETACEAE. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 40, n. 2, p. 5-25, 1966.

FORZZA, R. C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; MARTINELLI, G.; MONTEIRO, R. F.; SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; PAIXÃO-SOUZA, B.; LOUZADA, R. B. **In Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do RJ, 2013.

FYHRQUIST, P. **Traditional medicinal uses and biological activities of some plant extracts of African *Combretum* Loeffl., *Terminalia* L. and *Pteleopsis* Engl. Species (Combretaceae)**. 2007. Academic dissertation. Faculty of Biosciences. University of Helsinki.

GALIANO, R. D.; MICHAELS, L. V.; DOBRYANSKY, M.; LEVINE, J.P.; GURTNER, G.C. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound repair and regeneration**, v. 12, n. 4, p. 485-492, 2004.

GALLI, F.; PIRODDI, M.; ANNETTI, C.; AISA, C.; FLORIDI, E.; FLORIDI, A. Oxidative stress and reactive oxygen species. *Contributions to Nephrology*, Basel, v. 149, no. 1, p. 240-260, 2005.

GARCIA, C. C.; TALARICO, L.; ALMEIDA, N.; COLOMBRES, S.; DUSCHATZKY, C.; DAMONTE, E.B. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 9, p. 1073-1075, 2003.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 592 p.

GHOSH, S.; SAMANTA, A.; MANDAL, N. B.; BANNERJEE, S.; CHATTOPADHYAY, D. Evaluation of the wound healing activity of methanol extract of *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit leaf and its isolated active constituents in topical formulation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 714 –722, 2012.

GILMAN, E. F.; WATSON, D. G. ***Conocarpus erectus* L. (buttonwood)**. U.S. Forest Service and Southern Group of State Foresters, Gainesville, FL .1999.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.

GOLENIOWSKI, M. E.; BONGIOVANNI, G. A.; PALACIO, L.; NUÑEZ, C. O.; CANTERO, J. J. Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3 p. 324-341, 2006.

GREAVES, N. S.; ASHCROFT, K. J.; BAGUNEID, M.; BAYAT, A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, n. 3 ,p. 206-217, 2013.

GUETENS, G., BOECK, G. D., HIGHLEY, M.; VAN OOSTEROM, A. T.; BRUIJN, E. A. Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 39, n. 4-5, p. 331-457, 2002.

GURTNER, G. C.; WERNER, S; BARRANDON, Y; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-321, 2008.

HANKS, C. T.; WATAHA, J. C.; SUN, Z. In vitro models of biocompatibility: a review. **Dental Materials**, v. 12, n. 3, p. 186-193, 1996.

HARTLAPP, I.; ABE, R.; SAEED, R. W.; PENG, T.; VOELTER, W.; BUCALA, R.; METZ, C. N. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 12, p. 2215-2224, 2001.

HEIJMEN, F. H.; DU PONT, J. S.; MIDDELKOOP, E.; KREIS, R. W.; HOEKSTRA, M. J. Cross-linking of dermal sheep collagen with tannic acid. **Biomaterials**, v. 18, n. 10, p. 749-754, 1997.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; KROMHOUT, D.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **The Lancet Journal**, v. 342, n. 8878, p. 1007- 1011, 1993.

HILDEBRAND, K. A.; GALLANT-BEHM, C. L.; KYDD, A. S.; HART, D. A. The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v. 13, n. 3, p. 136-144, 2005.

HOGARTH, P. J. **The Biology of mangroves**. OXFORD University press, New York, 1999. 228 p.

HOWARD, R. A. **Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward Islands**. *Jamaica Plain*, 5, 604. 1989

HOWARD, R. A. **Flora of the Lesser Antilles. Leeward and Windward Islands**. Massachusetts: Arnold Arboretum, Harvard University, Jamaica Plain, 1989. 604 p.

HUPPES, R. R.; VIEIRA, E. R.; PAZZINI, J. M.; DE NARDI, A. B.; MINTO, B. W.; SANTALUCIA, S.; AMORIM, R. L.; CASTRO, J. L. C. Manejo de feridas abertas em cães e gatos. **Jornal brasileiro de cirurgia veterinária**, v. 2, n. 5, p. 24-34, 2013.

HUTCHINGS, A.; SCOTT, A. H.; LEWIS, G.; CUNNINGHAM, A. B. **Zulu Medicinal Plants: An Inventory**. Pietermaritzburg: University of Natal Press, 1996. 450 p.

JANIS, J. E.; HARRISON, B. H. Wound Healing: Part I. Basic Science. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 133, n. 2 ,p. 199e - 207e, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10º edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540 p.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangrove ecosystems. **Advanced in Marine Biology**, v 40, p. 81-251, 2001.

KENDALL, A. C.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 1, p. 141- 64, 2013.

KHAN, A. A.; KUMAR, V.; SINGH, B. K.; SINGH, R. Evaluation of wound healing property of *Terminalia catappa* on excision wound models in Wistar rats. **Drug Research**, v. 64, n. 5, p. 225-228, 2014.

KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Science International**, v. 203, n. 1, p. 93-98, 2010.

KOOPMANN, C. F. Wound healing: a review of factors affecting wound repair. **Otolaryngology**, Philadelphia: JBLippincot, 1991.

KRAFTS, K.P. Tissue repair: The hidden drama. **Organogenesis**, v. 6, n. 4, p. 225-233, 2010.

KUMAR, B.; VIJAYAKUMAR, M.; GOVINDARAJAN, R.; PUSHANGADAN, P. Ethnopharmacological approaches toward healing-exploring medicinal plants of India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 103-113, 2007.

KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 109-114 2006.

LACERDA, L. D. D.; DIOP, E. S. Conservation and sustainable utilization of mangrove forests in Latin America and Africa regions. In: **Workshop on Conservation and Sustainable Utilization of Mangrove Forests in Latin America and Africa Regions**. International Society for Mangrove Ecosystems; International Tropical Timber Organization, 1993.

LACERDA, L. D.; SANTOS, J. A.; MADRID, R. M. Copper emission factors from intensive shrimp aquaculture. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1823-1826, 2006.

LACERDA, L. D.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Mangroves of Latin America: the need for conservation and sustainable utilization. In: YÁNEZ-ARANCIBA, A. e LARA-DOMINGUEZ, A. L. (Ed.). **Ecosistemas de manglar en America Tropical**: UICN / NOAA / Instituto De Ecologia, A.C., p. 5-8, 1999.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9-18, 2007.

LI, K.; DIAO, Y.; ZHANG, H.; WANG, S.; ZHANG, Z.; YU, B.; HUANG, S.; YANG, H. Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz. promote cutaneous wound healing in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 86, 2011.

LINDÉN, O.; JERNELÖV, A. The mangrove swamp: an ecosystem in danger. **Ambio**, v. 9, n. 2, p. 81- 88, 1980.

- LINSINGEN, L. V.; CERVI, A. C. Guimarães, o. Sinopse taxonômica da família Combretaceae R. Brown na Região Sul do Brasil. **Acta botânica brasílica**, v. 23, n. 3, p. 738 – 750, 2009.
- LITTLE, E. L. JR.; WADSWORTH, F. H. **Common trees of Puerto Rico and the Virgin Islands**. Agriculture Handbook 249, 1964. 548 p.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. A. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte I. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. E. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. Educação Médica Continuada. **Anais Brasileiro Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003.
- MÁRQUEZ, B. P.; CÁRDENAS, A. O.; MORALES, C. R.; STAR, M. J. V. Identificación decompuestos de *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum* con efecto inhiibitorio sobre bacterias y hongos. **Ciência UANL**. v. 6, n. 3, p. 333-338, 2003.
- MASIKA, P. J.; AFOLAYAN, A. J. Antimicrobial activity of some plants used for the treatment of livestock disease in the Eastern Cape, South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 1, p. 129-134, 2002.
- MASOKO, P.; PICARD, J.; ELOFF, J. N. The use of a rat model to evaluate the *in vivo* toxicity and wound healing activity of selected *Combretum* and *Terminalia* (Combretaceae) species extracts. **Onderstepoort Journal of veterinary Research**. v. 77, n. 1, p.1-7, 2010.
- MARTINS, M. D.; MARQUE, S. M. M.; BUSSADORI, S. K; MARTINS, M. A. T.; PAVESI, V. C. S.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; FERNANDES, K. P. S. Comparative analysis between Chamomilla recutita and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 2, p. 274-278, 2009.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2º edição. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141 p.
- MCGAW, L. J.; RABE, T.; SPARG, S. G.; JAGER, A. K.; ELOFF, J. N.; VAN STADEN, J. An investigation on the biological activity of *Combretum* species. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 75, n. 1, p.45-50, 2001.
- MCLAFFERTY, E., HENDRY, C., ALISTAIR, F. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. **Nursing Standard**. v. 27, n. 3, p. 35-42, 2012.
- MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETO, J. Cellular aspects of wound healing. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.
- MONACO, J. L.; LAWRENCE, T. Acute wound healing an overview. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 30, n. 1, p. 1-12, 2003.

MONTEIRO, L. H. U.; MARQUES E SOUZA, G.; MAIA, L. P.; SILVA, L. F. F. ; LACERDA, L. D. Evolução das áreas de manguezal do litoral nordeste brasileiro entre 1978 e 2004. **Revista da associação Brasileira de Criadores de Camarão**, p.36-42, 2004.

NETTEL, A.; DODD, R. S.; CID-BECERRA, J. A.; ROSA-VELEZ J. D. L. Ten new microsatellite markers for the buttonwood mangrove (*Conocarpus erectus* L., Combretaceae). **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 4, p. 851-853, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products of therapeutic importance. **Natural products**, v. 2, p. 623- 650, 2010.

OJEWOLE, J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of mollic acid glucoside, a 1 alpha-hydroxycycloartenoid saponin extractive from *Combretum molle* R. Br. ex G. Don (Combretaceae) leaf. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 1, p. 30-35, 2008a.

OJEWOLE, J. A. Cardiovascular effects of mollic acid glucoside, a 1alpha-hydroxycycloartenoid saponin extractive from *Combretum molle* R Br ex G Don (Combretaceae) leaf. **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 19, n. 3 p. 128-134, 2008b.

ONO, M. C. C.; FREITAS, R. S.; OKAWA, L.; BORGES, A. M.; BALBINOT, P.; CAMPOS, A. C. L. Influência de Dieta imunomoduladora na cicatrização cutânea em ratos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 29, n. 3, p. 432-438, 2014.

OSÓRIO, A. C.; MARTINS, J. L. S. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 481-486, 2004.

PAGNANO, M. W.; TROUSDALE, R. T.; MENEGHINI, R. M.; HANSEN, A. D. Slower recovery after two-incision than mini-posterior-incision total hip arthroplasty. **Journal of Bone Joint Surgery**, v. 90, n. 5, p. 1000-1006, 2008.

PANIZZA, S.; ROCHA, A. B.; GECCHI, R.; SOUZA-SILVA, R.; PENTEADO, R. *Stryphnodendron barbatiman* (Vellozo) Martius: Teor em taninos na casca e sua propriedade cicatrizante. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 10, p. 101-6, 1988.

PANNIER, F. Estudio fisiológico sobre la viviparí de *Rhizophora mangle* L. **Acta Cientifica Venezoelana**, v. 13, n. 6, p. 184-197, 1962.

PANNIER, F. Mangrove physiology: water relations. **Monographs on oceanographic methodology**, v. 8, p. 208-230, 1984.

PANTELIDIS, G. E.;VASILAKAKIS, M.; MANGANARIS, G. A.; DIAMANTIDIS, G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 777-783, 2007.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v. 187, n. 5, p.S11-S16, 2004.

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

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; CASTRO, V. T. N. A.; SARAIVA, A. M.; ALMEIDA, D. M.; TAVARES, E. A.; AMORIM, E. L. C. Phenolic content and antioxidant capacity of four Cnidoscopus species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 20, p. 2310-2316, 2011.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22, p. 2960-2972, 2007.

JOSHI, G. V.; PIMPLASKAR, M.; BHOSALE, L. J. Physiological studies in germination of mangroves. **Botanica Marina**, v.15, n. 2, p. 91-95, 1972.

POOL, D. S.; LUGO, A. E.; SNEDAKER, S. C. Litter production in mangrove forest of Southern Florida and Porto Rico. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGY AND MANAGEMENT OF MANGROVES, 1., Hawaii, 1974. Proceedings. Gainesville, USA, University of Florida, 1975. p. 213-237.

PRATA, M. B.; HADDAD, C. M.; GOLDENBERG, S.; SIMÕES, M. D. J.; MOURA, L. A. R. D.; TRABULSI, L. R. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 3, n. 2, pp. 43-48, 1988.

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

QUAN, T. E.; COWPER, S.; WU, S. P.; BOCKENSTEDT, L. K.; BUCALA, R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. **International Journal of Biochemical and Cellular Biology**, v.36, n.4, p.598-606, 2004.

RABE, J. H.; MAMELAK, A. J.; MCELGUNN, P. J. S.; MORISON, W. L.; SAUDER, D. N. Photoaging: mechanisms and repair. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 1-19, 2006.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G.; HOUSTON, D. M. **Exame Clínico e Diagnóstico em Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 591 p.

RAJAEI, A.; BARZEGAR, M.; MOBAREZ, A. M.; SAHARI, M. A.; ESFAHANI, Z. H. Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 1, p. 107-112, 2010.

RAMSEY, D. T.; POPE, E. R.; WAGNER-MANN, C.; BERG, J. N. SWAIM, 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, p. 941-949, 1995.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, SUSAN E. **Biologia Vegetal**. 6ª edição. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

RAZA, M. A.; ANWAR, F.; SHAHWAR, D.; MAJEED, A.; MUMTAZ, M. W.; DANISH, M.; NAZAR, M. F.; PERVEEN, I.; KHAN, S. U. D. Antioxidant and antiacetylcholine esterase potential of aerial parts of *Conocarpus erectus*, *Ficus variegata* and *Ficus maclellandii*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 2, p. 489-495, 2016.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p.35-43, 2012.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RODRIGUES, A. C. F.; DA COSTA, J. F.; SILVA, A. L.; DO NASCIMENTO, E. P.; SILVA, F. R. G.; DE SOUZA, L. I. O.; AZEVEDO, R. R. S.; ROCHA, T. J. M.; DOS SANTOS, A. F. Atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade do extrato etanólico de *Senna obtusifolia*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n.6, p. 250 – 257, 2011.

RODRIGUES, F. A. R.; BOMFIM, I. D. S.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; GONCALVES, R. S. B.; WARDELL, J. L.; WARDELL, S. M. S. V.; SOUZA, M. V. N. Mefloquine-oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 83, p. 126-131, 2014.

RODRIGUES, T.S.; GUIMARÃES, S. F.; RODRIGUES-DAS-DÔRES, R. G.; GABRIEL, J. V. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, p. 587-590, 2011.

RUND, C. R. Nonconventional topical therapies for wound care. **Ostomy Wound Management**, v.42, n.5, p.18 - 26, 1996.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 462-471, 2010.

SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3, p. 161-171, 2008.

SANTOS, M. F. S.; CZECZKO, N. G.; NASSIF, P. A. N.; RIBAS-FILHO, J. M.; ALENCAR, B. L. F.; MALAFAIA, O.; RIBAS, C. A. P. M.; TRAUTWEIN, V. M.; HENRIQUE, G. S.; MAIA, J. M. A.; BITTENCOURT, R. C. A. Evaluation of the use of raw extract of *Jatropha gossypifolia* L. in the healing process of skin wounds in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 2-7, 2006.

SANTOS, S. N.; KAVAMURA, V. N.; CASTANHA, R. F.; ANDREOTE, F. D.; CARVALHO, J. E.; QUEIROZ, S. C. N.; MELO, I. S. Antitumoral, antioxidant and antimicrobial molecules from *Combretum rupicola*. **International Journal of Pharmacy and Biological Science**. v. 4, n.1, p. 422-428, 2013.

SARTÓRIO, M. L.; TRINDADE, C.; RESENDE, P.; MACHADO, J. R. **Cultivo orgânico de plantas medicinais**. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, 2000. 260 p.

SAXENA, G.; MCCUTCHEON, A. R.; FARMER, S.; TOWERS, G. H. N.; HANCOCK, R. E. W. Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, v 42, n. 2, p. 95-99, 1994.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M. L. G.; DE-ROSA, T. Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v 3, n.4, p. 561-570, 2000.

SCHIAFFINO, M. V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. **International Journal of Biochemical and Cellular Biology**, v.42, n.7, p. 1094-1104, 2010.

SCHWAMBORN, R.; SAINT-PAUL, U. Mangroves-Forgotten Forests?, **Natural Resources And Development**, v. 43, n. 44, p. 13-36, 1996.

SHOHAYEB, M.; HAMEED, E. A.; BAZAID, S. Antimicrobial activity of tannins and extracts of different parts of *Conocarpus erectus* L. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 544-553, 2013.

SIEUWERTS A. M.; KLIJN J. G.; HENZEN-LOGMAND S. C.; BOUWMAN I.; VAN ROOZENDAAL K. E.; PETERS H. A., SETYONO-HAN B.; FOEKENS J. A. Urokinase type plasminogen activator (uPA) production by human breast (myo) fibroblasts in vitro: influence of transforming growth factor-beta (1) compared with factor(s) released by human epithelial-carcinoma cells. **International Journal of Cancer**, v. 76, n.6, p. 829-835, 1998.

SILVA, F. G.; NASCIMENTO, V. E.; PINTO, J. E. B. P.; OLIVEIRA, C. B. A.; SANTOS, M. R.; FERRI, P. H. Influência do processamento pós-colheita e armazenamento na composição química da droga vegetal e do óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) DC.). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 12, n. 4, p. 436 - 442, 2010.

SILVER, F. H.; FREEMAN, J. W.; DEVORE, D. Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. **Skin Research Technology**, v. 7, n. 1, p. 18-23, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6º edição. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2010, 1102 p.

SINGER, A J; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**. V. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

SINNO, H.; PRAKASH, S. Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. **Plastic Surgery International**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

SNEDAKER, S. C.; JIMENEZ, J. A.; BROWN, M. S. Anomalous aerial roots in *Avicennia germinans* (L.) L. in Florida and Costa Rica. **Bulletin of Marine Science**, v. 31, n. 2, p. 467-470, 1981.

SOUZA, V.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: **Guia Ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira**. Baseado em APGII. 2º edição. Nova Odessa S.P, Instituto Plantarum, 2008, 702 p.

SPALDING, M.; BLASCO, F.; FIELD, C. **World mangrove atlas**. 1997. 178 p.

STOJADINOVIC, A.; CARLSON, J. W.; SCHULTZ, G. S.; DAVIS, T. A.; ELSTER, E. A. Topical advances in wound care. **Gynecologic. Oncology**, v.111, n. 2, p. S70-S80, 2008.

STRODTBECK, F. Physiology of wound healing. **Newborn and Infant Nursing Reviews**, v. 1, n. 1, p. 43-52, 2001.

STRONCEK, J. D.; BELL, N.; REICHERT, W. M. Instructional powerpoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.90, n. 4, p.1230-1238, 2009.

TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. An application of tetra zolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virology Methods**, v. 33, n.1, p. 61–71, 1991.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Wound biology and The physiology of wound healing: injury through maturation. **Surgical Clinics of North America**, v. 89, n 3 p. 599–610, 2009.

TELLER, P.; WHITE, T. K. The physiology of wound healing: injury through maturation. **Surgical Clinics of North America**, v. 89, n.3, p. 599–610, 2009.

TILLMANN, M. T.; FELIX, S. R.; MUNDSTOK, C. P.; MUCILLO, G. B.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, M. O. Tratamento e manejo de feridas cutâneas em cães e gatos (revisão de literatura). **Nosso Clínico**, n. 103, p. 12-19, 2015.

TOMLINSON, P. B. **The Botany of Mangrove**. Cambridge University Press, 1986. 419 p.

VAN WYK, B. E.; VAN OUDTSHOORN, B.; GERICKE, N. **Medicinal Plants of South Africa**. 2º edição. Pretoria: Editora Briza Publications, 2009. 366 p.

VASCONCELOS, S. Vegetação dos mangues da foz do Capibaribe. **Boletim da Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de Pernambuco**. v 3, p. 316-331, 1937.

Veiga, V. F. J.; Pinto, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VIEIRA, S. C. H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2º edição. Nova York: Springer, 2009. 384 p.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. Nova York: CRC Press, 2008. 896 p.

WATT, J. M.; BREYER-BRANDWIJK, M. G. **The Medicinal and Poilsonian Plants of Southern and Eastern Africa**. Londres: Editora Livingstone, 1962. 679 p.

WEISSMAN, G. **Inflammation: Historical perspectives. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. 2º edição. New York, Raven Press, 1992. 1186 p.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.

ANEXO A- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8640 | 2126 8351
Fax: (55 81) 2126 8350
www.ocb.ufpe.br

Recife, 29 de julho de 2016.

Ofício nº 78/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Teresinha Gonçalves da Silva**

Departamento de Antibióticos

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.008471/2016-53

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação do potencial cicatrizante de *Conocarpus erectus* sobre lesões cutâneas em ratos Wistar**", registrada com o nº 23076.008471/2016-53, sob a responsabilidade de Prof.ª Dr.ª **Teresinha Gonçalves da Silva** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 28/06/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 11/2016
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
Nº de animais	206
Peso/Idade	200-250g/90 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério do Depto de Antibióticos da UFPE

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1301584