



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CAROLINE LEAL RODRIGUES SOARES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L) C.F. GAERTN**

Recife
2018

CAROLINE LEAL RODRIGUES SOARES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L) C.F. GAERTN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Química para a Saúde

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Teresinha Gonçalves da Silva

Recife

2018

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

Soares, Caroline Leal Rodrigues

Avaliação da atividade cicatrizante *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroalcoólico de *Laguncularia racemosa* (L) C.F. Gaertn / Caroline Leal Rodrigues Soares - 2018.

85 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas. Recife, 2018.

Inclui referências e anexo

1. Plantas medicinais 2. *Laguncularia racemosa* 3. Cicatrização
I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orient.) II. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-452

CAROLINE LEAL RODRIGUES SOARES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L) C.F. GAERTN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 31/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva (Orientadora)
Univeridade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Cynthia Layse Ferreira de Almeida (Examinador externo)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof^a. Dr^a. Paloma Lys de Medeiros/ UFPE (Examinador externo)
Univeridade Federal de Pernambuco

Dedico ao meu Deus,
por toda a Sua vontade boa,
perfeita e agradável para mim!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer acima de tudo ao meu Deus! Obrigada por ser um Pai de amor e de milagres, por me dá esperança, sabedoria e força ao longo desses dois anos. Obrigada por ser um Deus do impossível, que constantemente me surpreende com sua perfeita vontade, que me dá vitória e, principalmente, SEMPRE me faz crescer. Só tu sabes como foi essas idas e vindas entre João Pessoa e Recife, Mestrado e segunda graduação, e tu me permitiu chegar até aqui, muito obrigada meu Pai!

Aos meus pais Cristiane e César, meus irmãos Clarisse e Cesinha e toda a minha família, por estarem sempre ao meu lado, mesmo que distante. Por entender minhas ausências, por estarem sempre dispostos a me ajudar quando precisei e terem me aguentado nos momentos de estresse, que foram muitos.

Ao meu melhor companheiro de laboratório, por mais que sejamos tão diferentes trabalhando, ao meu melhor amigo e esposo Caio Lucena. Sou grata por toda a paciência nos momentos difíceis, por todo o apoio, cuidado, amor e todas as palavras de encorajamento. Agradeço a Deus por ter te enviado para Recife na metade do meu mestrado, sua presença deixou tudo mais leve.

A minha orientadora Prof. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva, por ter me recebido no laboratório com braços abertos, ter confiado no meu trabalho, e sempre estar disponível para me ajudar. Além disso, agradeço por todas as oportunidades que foram me dadas ao longo desses dois anos, as quais me fizeram crescer como profissional.

A todos os meus companheiros do BIOFARMATOX, por a cada dia tornar o ambiente de trabalho o mais agradável possível! Por todo o companheirismo, pelas descontrações, pelas conversas, por todo o apoio! Em especial, agradeço a Marllon Santana e Jéssica Andreia, por ter me ensinado e participado de vários resultados importantes desse trabalho!

As queridas amigas que fiz em Recife. As meninas da residência das Palmeiras, Bella, Duda e Barbara, que me acolheram tão bem no período que morei lá e fizeram eu me sentir em casa. Agradeço a Cynthia, Temístocles, Anne e Jhonatta por todos os conselhos, os carões quando preciso, as palavras de carinho, de amizade e de cuidado.

A Pedro Paulo e Michelly (melhor IC da vida), pela amizade construída, por terem sido minha base em Recife e, juntamente com Caio, me ajudarem na construção desse trabalho e por me apoiarem tanto!! Sem vocês três, esse trabalho não seria o mesmo!

A todas as minhas amigadas em João Pessoa, Polliana, Stéphanie, Bianca, Ingrid, Fany, e meus queridos amigos da “Pioneira”: Mayara, Karina, Augusta, Fabrício e Manoel. Por torcerem tanto por mim e sempre estarem dispostos a me ajudar e entenderem minha ausência.

A minha querida igreja Anglicana Comunhão, minha linda célula HUR e antiga célula Ousados A2! Por me apoiarem tanto! Pela comunhão, crescimento e companhia! Agradeço em especial aos meus queridos líderes Neto e Mayara, por serem tão presentes e me inspirarem tanto!

As colaborações dos Laboratórios do Prof. Dr. Rafael Ximenes e da Prof. Dra. Elba Amorim que contribuíram diretamente para a construção desse trabalho.

As professoras Dra. Paloma Medeiros e Dra. Cynthia Almeida, por terem aceitado avaliar o meu trabalho, exemplos de pesquisadoras que tenho certeza que contribuirão para o meu crescimento científico.

A FACEPE, ao Departamento de Antibióticos e UFPE pela estrutura e apoio financeiro para realização desse trabalho.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”

(BÍBLIA, p. 1110, 2008)

RESUMO

A ferida é definida como a separação dos tecidos do corpo ou qualquer lesão tecidual com prejuízo de suas funções básicas. A busca de fármacos que acelerem o processo de cicatrização se tornou relevante, uma vez que inúmeras pessoas sofrem com feridas cirúrgicas ou traumáticas a cada ano. Vários autores investigam medicamentos que possam acelerar a cicatrização de feridas, reduzir os sintomas dolorosos e apresentar uma ótima relação custo-benefício; dentre eles, os extratos de espécies endêmicas dos manguezais pernambucanos, como a *Laguncularia racemosa* (L.), revelou-se com atividade cicatrizante devido aos de altos níveis de metabólitos secundários, como os taninos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade cicatrizante *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroalcoólico e da preparação semissólida das folhas de *L. racemosa*. A coleta do material vegetal foi realizada no manguezal de Itamaracá, localizado no litoral Norte Pernambucano. Após a obtenção do extrato avaliou-se o perfil fitoquímico, a atividade antioxidante e o doseamento dos fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas a fim de determinar e quantificar os metabólitos secundários. Os testes *in vitro* foram realizados pela avaliação da citotoxicidade e o teste de cicatrização com as linhagens L929, HaCat e VERO. Para a avaliação da atividade cicatrizante *in vivo* foi preparada uma formulação semissólida do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. racemosa* a 5 e 10% e testadas em modelo de excisão por um período de 3, 7, 14 e 21 dias. O perfil fitoquímico do extrato indicou a presença de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas e quantitativamente apresentou teor de fenóis e taninos totais de $128,24 \pm 2,6$ e $113 \pm 0,43$ mg EAT/g, respectivamente, de flavonóides $85,75 \pm 7,19$ mg ER/g e cumarinas $226,36 \pm 8,7$ mgEC/g. O extrato apresentou uma atividade antioxidante moderada e não apresentou citotoxicidade significativa frente às linhagens L929, VERO e HaCat no período de 72h de incubação nas concentrações variando entre 1,56 a 200 µg/mL. Na cicatrização *in vitro*, o extrato hidroalcoólico na concentração de 50 µg/mL induziu a migração celular significativa ($p < 0,05$) em todas as linhagens avaliadas, quando comparada ao controle. Na atividade cicatrizante *in vivo*, os grupos tratados com o extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* a 5 e 10% apresentaram grau de contração significativo no período de 3 dias com um percentual de $23,45\% \pm 3,4$ e $23,46\% \pm 2,8$, respectivamente, comparado ao controle de $5,95\% \pm 0,5$. Após 7 dias, o grau de contração foi de 77,

35% $\pm$ 3,0 e 76,10% $\pm$ 6,3, para as concentrações de 5 e 10%, respectivamente, comparado ao controle de 58,24% $\pm$ 5,0. Nas análises histopatológicas, os grupos tratados a 5 e 10% promoveram melhor reepitelização tecidual com volumosa presença de fibroblastos, formação de vasos, fibras colágenas e queratina, caracterizando uma evolução mais rápida do processo cicatricial comparados aos outros tratamentos. O estudo mostrou que a administração tópica das formulações contendo extrato hidroalcoólico das folhas secas de *L. racemosa* auxiliam na aceleração do processo de cicatrização, mostrando potencial terapêutico sobre as lesões cutâneas.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Proliferação celular. Cicatrização. *Laguncularia racemosa*.

ABSTRACT

The wound is defined as the separation of the tissues from the body or any tissue injury to the detriment of its basic functions. The search for drugs that accelerate the healing process has become relevant, since countless people suffer from surgical or traumatic wounds each year. Several authors investigate medications that can accelerate the healing of wounds, reduce painful symptoms and present a great cost-benefit ratio; among them, the extracts of endemic species of the Pernambuco mangroves, such as *Laguncularia racemosa* (L.), showed cicatrizing activity due to high levels of secondary metabolites, such as tannins. Therefore, the objective of this work was to evaluate the healing activity in vitro and in vivo of the hydroalcoholic extract and the semi-solid preparation of *L. racemosa* leaves. The collection of the vegetal material was carried out in the Itamaracá mangrove, located in the north coast of Pernambuco. After obtaining the extract the phytochemical profile, the antioxidant activity and the dosage of the total phenols, tannins, flavonoids and coumarins were evaluated in order to determine and quantify the secondary metabolites. The in vitro tests were performed by the evaluation of cytotoxicity and the cicatrization test with the strains L929, HaCat and VERO. For the evaluation of the healing activity in vivo a semi-solid formulation of the hydroalcoholic extract of the leaves of *L. racemosa* was prepared at 5 and 10% and tested in the excision model for a period of 3, 7, 14 and 21 days. The phytochemical profile of the extract indicated the presence of total phenols, tannins, flavonoids and coumarins and quantitatively presented total phenol content and tannins of 128.24 ± 2.6 and 113 ± 0.43 mg EAT / g, respectively, of flavonoids 85 , 75 ± 7.19 mg ER / g and coumarins 226.36 ± 8.7 mgEC / g. The extract presented a moderate antioxidant activity and showed no significant cytotoxicity against the strains L929, VERO and HaCat in the period of 72h incubation at concentrations ranging from 1.56 to 200 μ g / mL. In vitro healing, the hydroalcoholic extract at 50 μ g / mL induced significant cell migration ($p < 0.05$) in all strains evaluated, when compared to the control. In the healing activity in vivo, the groups treated with the hydroalcoholic extract of *L. racemosa* at 5 and 10% showed a significant contraction degree in the period of 3 days, with a percentage of $23.45\% \pm 3.4$ and $23.46\% \pm 2.8$, respectively, compared to the control of 5, $95\% \pm 0.5$. After 7 days, the degree of contraction was 77.35 ± 3.0 and 76.10 ± 6.3 for concentrations of 5 and 10%, respectively, compared to the

control of $58.24 \pm 5, 0$. In the histopathological analyzes, groups treated at 5 and 10% promoted better tissue re-epithelization with massive presence of fibroblasts, vessel formation, collagen fibers and keratin, characterizing a faster evolution of the cicatricial process compared to the other treatments. The study showed that the topical administration of the formulations containing hydroalcoholic extract of the dry leaves of *L. racemosa* helps accelerate the healing process, showing therapeutic potential on the cutaneous lesions.

Key words: Medical plants. Cell proliferation. Wound healing. *Laguncularia racemosa*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo Geral.....	16
1.1.2 Objetivos Específicos.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	17
2.2 ECOSSISTEMA MANGUEZAL.....	18
2.3 FAMÍLIA COMBRETACEAE.....	21
2.4 <i>LAGUNCULARIA RACEMOSA</i> (L) C. F. GAERTN.....	23
2.4.1 Classificação Taxonômica.....	23
2.4.2 Aspectos Gerais.....	23
2.4.3 Propriedades químicas e biológicas.....	26
2.5 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA PELE.....	27
2.6 FERIDAS: DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO.....	29
2.7 FASES DA CICATRIZAÇÃO TECIDUAL.....	30
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	34
3.1 COLETA DO MATERIAL VEGERAL E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS.....	34
3.2 PERFIL FITOQUÍMICO- CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD).....	34
3.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS E TANINOS... ..	35
3.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONOIDES.....	35
3.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CUMARINAS.....	36
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>L. RACEMOSA</i>	37
3.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>L. RACEMOSA</i>	37
3.8 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>L. RACEMOSA</i>	38
3.9 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS SEMISSÓLIDA (CREME) CONTENDO EXTRATOS DE <i>L. RACEMOSA</i>	39
3.10 MODELO DE FERIDA EXCISIONAL.....	39

3.11 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO FECHAMENTO DA LESÃO.....	39
3.12 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	40
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4 RESULTADOS.....	41
4.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>LAGUNCULARIA RACEMOSA</i> (L) C. F. GAERTN.....	41
5 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	85

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade mundial, em torno de 15 a 20%, com destaque para as plantas superiores (gimnospermas e angiospermas), as quais constitui aproximadamente 24% das espécies nacionais. Entre os elementos que compõem essa biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos (BRASIL, 2016).

A utilização de produtos de origem vegetal em estudos químicos e biológicos tem sido realizada nos últimos anos com o intuito de encontrar compostos biologicamente ativos para a síntese e o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos, devido à sua eficácia e, sobretudo, pela menor taxa de efeitos tóxicos e contraindicações, quando comparados a maior parte dos medicamentos disponíveis (MACIEL et al., 2002; PATWARDHAN et al., 2004; LORENZI et al, 2008; SOUZA et al, 2017).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são excelentes fontes para a 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). Além disso, a OMS ainda respalda que, atualmente, cerca de 60 a 80% da população mundial depende da medicina popular nos seus cuidados básicos de saúde, e deste total, 85% se utilizam de plantas e seus derivados como forma terapêutica (VERRI et al, 2017; FIEBIG et al, 2018).

Entre as principais causas das efetivas propriedades farmacológicas de diversas espécies vegetais está a presença de metabolitos secundários na sua composição bioquímica, tais como os taninos, flavonóides, alcaloides e terpenos presentes nos extratos derivados dessas espécies (SAXENA et al., 1994; MÁRQUEZ et al., 2003). Esses metabólitos, por sua vez, presentes em variadas plantas localizadas nos biomas brasileiros, especialmente no mangue, são as causas científica para efetivos tratamentos já utilizados na medicina popular nacional.

A *Laguncularia racemosa* (L) C. F. Gaertn é conhecida vulgarmente como mangue-branco. Sua ocorrência abrange todo o mundo, com maior presença na América do Norte e do Sul. Espécies pertencente à família Combretaceae são bastante utilizadas por comunidades tradicionais como recurso terapêutico para

vários tipos de dores, resfriado, diarreia, conjuntivites, pneumonia, caxumba, sífilis, febre, infecções e na restauração de lesões teciduais. Além disso, estudos recentes demonstraram propriedades biológicas comprovadas de espécies da família Combretaceae como, atividade antioxidante, hepatoprotetora, anticâncer e antimicrobiana (MASOKO et al., 2010; BARKU et al., 2013; SANTOS et al, 2018).

A cicatrização de feridas é um processo dividido em três fases interativas e sobrepostas, classificadas como fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de remodelação ou de maturação (GURTNER et al, 2008).

Durante a inflamação, os neutrófilos e os monócitos invadem o tecido lesionado e começam a secretar enzimas proteolíticas, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento. A próxima fase conhecida como proliferação é caracterizada pela proliferação e migração de fibroblastos e queratinócitos da borda da ferida para o seu centro. Nessa fase, a angiogênese é desencadeada e, conseqüentemente, leva a formação de tecido de granulação, o que é importante para sustentar os nutrientes e o fornecimento de oxigênio no tecido lesado. Além disso, inicia-se a produção de colágeno e o processo de contração tecidual pelos fibroblastos. Na fase de remodelação, há uma redução nos níveis de células presentes no microambiente da ferida devido à indução da apoptose a fim do retorno a homeostase tecidual. A síntese do colágeno é reduzida e os componentes da matriz são modificados conforme a matriz é remodelada, além da substituição do tecido de granulação para maturação e da deposição, agrupamento e reorganização de fibras colágenas (PITZ et al; 2016; KONDO, 2017). A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga.

Os elevados custos dos tratamentos de alterações relacionadas à deficiência cicatricial aumentam o interesse na busca de medicamentos capazes de interagir com o tecido lesado, tendo por objetivo acelerar o processo (SILVA et al; 2015). Atualmente, diversos estudos com plantas medicinais são realizados com ênfase no processo de cicatrização e com finalidade de trazer novas alternativas terapêuticas para o tratamento de feridas cutâneas. Com isso, a proposta deste estudo foi avaliar a atividade cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Laguncularia racemosa* em lesões *in vitro* e *in vivo*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial cicatrizante *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroalcoólico e preparação semissólida das folhas de *L. racemosa* (L) C. F. Gaertn.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Preparar o extrato hidroalcoólico das folhas de *L. racemosa* e realizar o *screening* fitoquímico desse extrato;
- ✓ Determinar os teores de fenóis totais, taninos totais, flavonoides e cumarinas do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa*;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. racemosa* frente às células L929, VERO e HaCat;
- ✓ Avaliar a atividade cicatrizante *in vitro* em células L929, VERO e HaCat;
- ✓ Desenvolver uma formulação fitoterápica semissólida contendo o extrato hidroalcoólico das folhas de *L. racemosa*;
- ✓ Investigar o potencial cicatrizante das formulações semissólida contendo o extrato hidroalcoólico das folhas de *L. racemosa* sobre lesões cutâneas em ratos Wistar.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. A medicina popular no Brasil é o reflexo do conhecimento transmitido entre as gerações de diferentes povos e imigrantes que difundiram o seu conhecimento sobre a utilização e o aprimoramento da flora medicinal, tornando as plantas medicinais importantes instrumentos na assistência farmacêutica (BRASIL, 2006; BORBA, 2017).

A OMS define planta medicinal como sendo todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos (PASQUA, 2009). Elas são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos. Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo 25% a partir de diversas famílias de plantas (WHO, 1978; CALIXTO, 2001; BRASIL, 2006).

De acordo com Forzza et al. (2013), o Brasil dispõe de aproximadamente 35 mil espécies de plantas, cerca de 20% do número total de espécies do planeta, distribuídas nos diferentes biomas existentes no país: Mata Atlântica, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pantanal e Pampa (VIEIRA et al., 2010; ALBERNAZ et al., 2010), porém apenas um percentual de 17% dessas espécies são investigados cientificamente (RODRIGUES et al., 2011; RABELO et al., 2013).

O conhecimento conceitual e prático das plantas medicinais varia entre as diferentes populações de acordo com as mudanças culturais, forma de coleta dessas plantas e os aspectos ecológicos da região, o que dificulta a comprovação da eficácia desse tratamento alternativo (ABIRI et al., 2018). Dessa forma, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais

diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (JUNIOR et al; 2005; ALMEIDA et al; 2017).

Em 2006, a medicina popular apresentou um grande avanço com a aprovação da Portaria do Ministério da Saúde de número 971 que trata da Política Nacional de Práticas Integrativas (PNPIC) e Complementares no Sistema único de Saúde (SUS) (BRASIL; 2006). Essa portaria traz entre suas normas para plantas medicinais, 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, 2006).

Dessa forma, as pesquisas que visam o maior estudo das vias de atuação de extratos ou compostos isolados de plantas com caráter medicinal no tratamento das mais diversas doenças aumentam exponencialmente.

2.2 ECOSSISTEMA MANGUEZAL

A constante influência marinha através do regime de marés, margens com sedimento lamoso e águas abrigadas e salobras são fatores condicionantes que permitem o surgimento de uma vegetação típica de áreas estuarinas, o que cria um ecossistema altamente adaptado denominado manguezal, definido como um sistema ecológico tropical, entre terra e mar, localização em terrenos baixos na foz dos rios e estuários, com solo inundado pelas variações das marés e com grande variação de salinidade (SCHAEFFER-NOVELLI, 2002; SILVA, 2012; MADI et al, 2016).

Os manguezais são exclusivos de regiões subtropicais e tropicais, onde populações de espécies vegetais interagem entre si, com microrganismos e animais ocupando o mesmo ambiente físico (BARROS et al., 2000; SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2002; XIMENES et al, 2016). Esse rico ecossistema se distribui entre as latitudes 30°N e 30°S (Figura 1), abrangendo uma área de 137.760 km², com maior desenvolvimento próximo à linha do Equador, entre 5°N e 5°S. Há áreas de manguezal em 118 países e territórios nas Américas, Oceania, África e Ásia (SPALDING et al., 2010; GIRI et al, 2011; SOUZA et al, 2018; TANG et al, 2018).

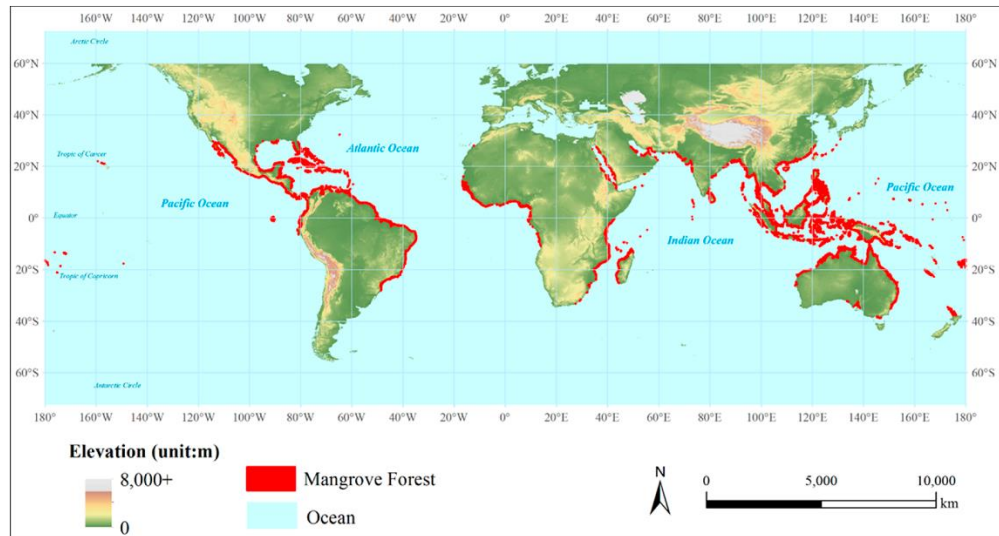


Figura 1: Distribuição do ecossistema manguezal no mundo

Fonte: TANG et al, 2018

O Brasil possui cerca de 7% da área de mangue de todo o mundo, aproximadamente 50% do total da área ocupada por esse ecossistema apresenta 13.800 km² e se estendendo desde o Cabo Orange, litoral do estado do Amapá, até Laguna em Santa Catarina (Figura 2), o que corresponde à segunda maior área desse ecossistema mundial (SILVA, 2012; ANDRADE et al, 2016). O estado de Pernambuco 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).



Figura 2: Distribuição do ecossistema manguezal no Brasil

Fonte: XIMENES et al, 2016

Os ecossistemas manguezais possuem grande importância para a manutenção e o sustento do equilíbrio ecológico da cadeia alimentar das regiões costeiras. Estão entre os principais os costeiros tropicais, pois são considerados importantes transformadores da matéria orgânica, resultando na reciclagem dos nutrientes. Apresentam condições necessárias para a alimentação, proteção e reprodução de diversas espécies de animais que necessitam dessas áreas para se reproduzirem durante o seu ciclo biológico. Andrade (2016) destaca que há uma grande variedade de espécies de mamíferos, aves, répteis, anfíbios, peixes, moluscos e crustáceos que se beneficiam da alta produtividade desse ecossistema para suprir suas necessidades nutritivas, reprodutivas e de abrigo temporário ou definitivo (XIMENES et al, 2016; ROSA et al, 2018).

Em relação às plantas, os manguezais apresentam vegetação composta por espécies do tipo halófilas. Na região Nordeste do Brasil, foram registradas cinco espécies: *Rhizophora mangle* L., *Avicennia schaueriana* Stapf. & Leech, *A. germinans* L., *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn e *Conocarpus erectus* L. (CORREIA et al; 2005). Estas compartilham características fisiológicas e adaptações especiais que permitem sua ocorrência em ambientes em constante inundação, com

alta salinidade e em substratos não consolidados com baixa oxigenação (KATHIRESAN et al, 2001; MADI et al; 2016).

A destruição dos manguezais ocorre como resultado da expansão urbana, do turismo, da agricultura, da instalação de viveiros de aquicultura, entre outros. Um dos maiores problemas enfrentados no Nordeste brasileiro é a atividade da carcinicultura, que a partir da sua instalação e manutenção acarreta impactos negativos para o estuário, o que torna irreversível o equilíbrio do ambiente (OLIVEIRA, 2004). Outro desafio que envolve a questão do desmatamento refere-se a perda do conhecimento sobre potencial medicinal dessas plantas e a preocupante taxa de extinção dessas espécies vegetais, o que mostra a real necessidade de considerar algumas ações e propostas de preservação da herança genética desses vegetais (BORRIS, 1996; SANTANA, 2017).

2.3 FAMÍLIA COMBRETACEAE

A família Combretaceae abrange cerca de 14 gêneros e cerca de 500 espécies, com distribuição pantropical, ocorrendo em ambientes quentes de todos os continentes, com os maiores centros de diversidade na África e Ásia. As espécies que compõem a família constituem importantes elementos de mangues, florestas úmidas e de regiões semiáridas. No Brasil, ocorrem seis gêneros com aproximadamente 70 espécies que, em média, são encontradas em quase todas as formações vegetais brasileiras (LINSINGEN, 2009; RENDÓN- SANDOVAL et al; 2018).

Com relação à classificação, desde Engler e Diels (1899) duas subfamílias têm sido reconhecidas para Combretaceae, Strephonematoideae e Combretoideae (TAN et al; 2002), e empregadas nos tratamentos mais atuais para a família (EXELL, STACE; 1966; STACE; 2004). De acordo com Stace (2004), a subfamília Strephonematoideae possui um único gênero, *Strephonema*, com distribuição exclusiva na África e caracterizada por possuir ovário semi-ínfero. A subfamília Combretoideae possui o maior número de espécies e a distribuição mais ampla, com duas tribos, Laguncularieae e Combreteae, com quatro e doze gêneros, respectivamente, sendo os gêneros *Combretum* e *Terminalia* encontrados em todos os continentes. A complexidade taxonômica e filogenética da subfamília

Combretaceae é reconhecida pela maioria dos autores, principalmente pela ampla variação morfológica nas flores, frutos e brotos vegetativos (LOIOLA et al.; 2009)

Essa família pode ser caracterizada com 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 termina nos lobos do cálice, pétalas 4 ou 5 ou ausentes, lobos do cálice 4 ou 5, ovário ínfero, unilocular, 2-6 rudimentos seminais pêndulos e ovoides. Os frutos são secos indeiscente, drupáceos ou betulídios, endocarpo esponjoso ou lígneo, uma semente, cotilédones plicados ou convolutos e não possui endosperma (LINSINGEN et al., 2009; PRAIA, 2017; SOUSA et al, 2018).

Estudos fitoquímicos realizados com diferentes espécies da família Combretaceae, identificaram a presença de inúmeros compostos bioativos, tais como: fenóis, flavonóides, taninos, cumarinas, fenantrenos, lignanas e cicloartano. Esses resultados estão possivelmente ligados as diversas atividades medicinais que essas espécies possuem (ARAÚJO et al, 2013; COCCARO et al, 2013; SANTOS et al; 2018).

Membros da família Combretaceae apresentaram, segundo a literatura, atividades antibacteriana, antiasmática, anticâncer, antivirais, antidiabética, antimutagênica, antioxidante, antiúlceras, antinociceptiva e propriedades de cicatrização de feridas (MONGALO et al, 2016; ANATO et al, 2018; BASHEER et al; 2018).

2.4 LAGUNCULARIA RACEMOSA (L) C.F. GAERTN.

2.4.1 Classificação Taxonômica

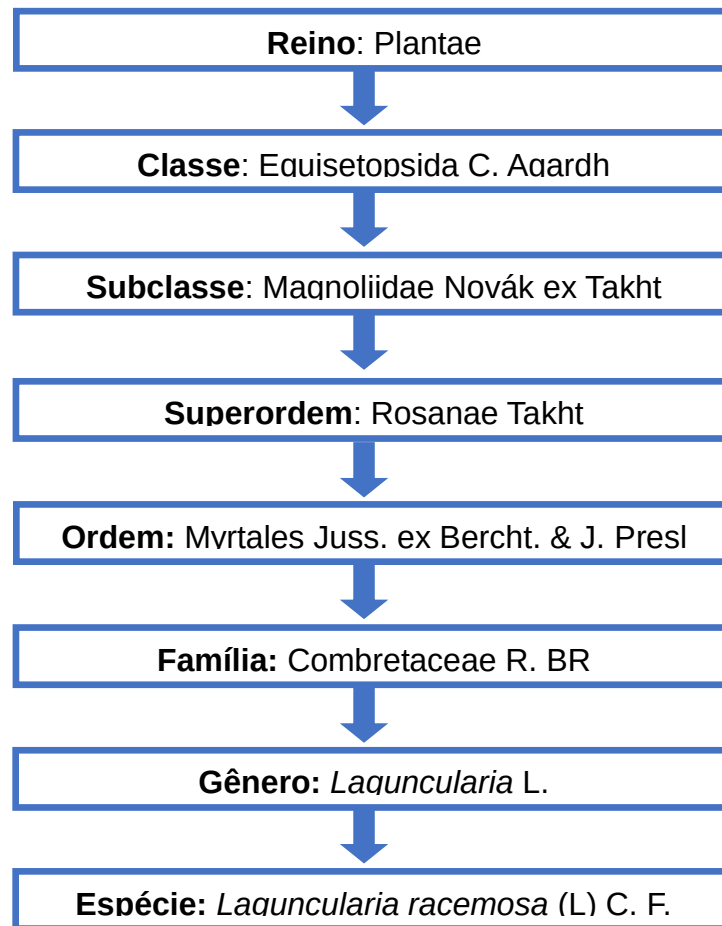


Figura 3: Classificação científica da espécie *Laguncularia racemosa*

Fonte: BASHIR et al., 2014 adaptado

2.4.2 Aspectos Gerais

Laguncularia racemosa (L.) C. F. Gaertn (Figura 4), conhecida como mangue branco, manso ou tinteira, é uma árvore relativamente pequena, com tamanho variando entre 3 a 6 metros de altura, cujas folhas têm pecíolo vermelho com duas glândulas em sua parte superior, próximas à lâmina foliar. As folhas são espessas e variam de elíptica a oblonga, apresentando margem lisa (SILVA et al; 2010). Sua distribuição se dá principalmente ao longo da costa tropical e subtropical das Américas do Norte, Central e do Sul, especialmente no Brasil, México, Peru e

Antilhas. Também ocorre com menor frequência na África Ocidental (SILVA, 2010; NETO et al; 2014).



Figura 4: Espécie *Laguncularia racemosa*

Fonte: Autor (2016)

Considerada a segunda espécie vegetal mais representativa nos manguezais brasileiros, é possível encontrá-la no interior dos manguezais bem como ao longo dos estuários, principalmente na interface entre a terra firme e o manguezal, e nas margens dos rios e ilhotas, apesar da variação nas condições de solos e salinidade. Além disso, a *L. racemosa* também pode ser encontrada em grandes densidades em florestas de restinga e de terras baixas ou planícies (BARTZ et al, 2015; JANTSCH et al; 2018).

Dentre todas as espécies de mangue, *L. racemosa* é a que apresenta menor tolerância à baixas temperaturas, ao contrário das espécies de *Rhizophora* e de *Avicennia*. Entretanto, a espécie *L. racemosa* mostra um mecanismo ecofisiológico de exclusão de sal que pode estar associado a uma ampla faixa de tolerância à salinidade. Este mecanismo também se reflete em suas adaptações morfológicas e anatômicas. Por exemplo, Bartz et al. (2015) sugere que as espécies de manguezal

apresentam menor tamanho do tronco, altura e densidade da copa comparado às espécies exclusivas de florestas de transição.

São caracterizadas por apresentarem raízes pneumatóforas com geotropismo negativo em função do fluxo de marés, o que promove a oxigenação dos tecidos no solo alagado. Além disso, têm lenticelas que auxiliam na troca gasosa entre a planta e o meio externo. Possui o tronco solitário ou agrupado, com a casca do caule dura, fissurada e de coloração cinza. O desenvolvimento dos brotos é contínuo ou irregular, com uma inflorescência terminal, sem botão terminal ou articulações. Os galhos possuem numerosas lenticelas ligeiramente salientes. As folhas se apresentam com pecíolo curto (1 a 2 cm), ligeiramente entalhados, o seu limbo é um pouco carnudo, elíptico ou alongado, com 5-8 por 3-5 cm, possui bordas firmas e arredondadas, elas ainda apresentam pecíolos curtos e avermelhados e uma estrutura especializada em eliminar o excesso de sal, denominada glândulas de sal (Figura 5). As flores (Figura 6) podem ser unissexuais ou bissexuais. Cada flor tem de 4 a 5 mm de diâmetro. A taça do cálice é de rasa a profunda e coberta de pelos externamente, contendo 5 cálices pontiagudo e as pétalas são arredondadas e cobertas de pelos. Os frutos são produzidos abundantemente em plantas ovuladas. Possuem um suporte em forma de nervuras, uma pequena noz descascada com 2 cm e comprimento, com alguns resíduos do cálice. (SILVA, 2010; NETO, 2014).



Figura 5: Glândulas de sal em *Laguncularia racemosa*

Fonte: <https://netnature.wordpress.com>



Figura 6: Flores da espécie *Laguncularia racemosa*

Fonte: Autor (2018)

2.4.3 Propriedades químicas e biológicas

Apesar da espécie *Laguncularia racemosa* (L) C. F. Gaertn estar presente em diversos estudos de caracterização e monitoramento do ecossistema manguezal ou em estudos de interação com microrganismos e extratos de espécies da sua família terem relatos de diversos ensaios biológicos, poucos estudos farmacológicos e fitoquímicos foram realizados e caracterizados na literatura atual.

Os poucos relatos apresentados indicam a *L. racemosa* com um potencial atuante na atividade moluscicida (MENDES et al.; 2018), antioxidante (XUE et al, 2008) e inibição da Fosfolipase 2 (PLA-2) e outras vias da cascata da inflamação (PINHO et al; 2014).

Silva (2003) e Shi et al (2010) realizaram estudos fitoquímicos com extratos da espécie *L. racemosa*, através de cromatografia de camada delgada e espectrometria de massa e relataram o isolamento de 27 compostos fenólicos, dentre eles taninos e flavonoides, os quais já foram observados em diversos extratos presentes na literatura atividades antioxidante e inibitória de proteínas quinase (PINHO, 2014).

Metabólitos secundários (taninos, flavonoides, saponinas, alcaloides, etc.) são biossintetizados por plantas para diferentes fins, como regulação do crescimento, interações intra e interespecíficas, proteção contra radiação ultravioleta e defesa contra predadores e infecções. Muitos destes apresentam importantes atividades biológicas e farmacológicas e são utilizados como agentes quimioterápicos ou servem como ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos (MENDES et al, 2018).

Os flavonoides compõem um grupo de pigmentos vegetais presente em várias espécies na natureza e sua principal função pode ser atribuída ao mecanismo de defesa e de atração de polinizadores (SIMÕES et al., 2010). Os taninos, por sua vez, são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico. Apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton. Estruturalmente, esses compostos possuem de 12 a 16 grupos fenólicos, 5 a 7 anéis aromáticos e podem ser divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados.

Pesquisas sobre atividade biológica dos taninos evidenciaram importante ação contra determinados microrganismos, como agentes carcinogênicos e

causadores de toxicidade hepática. Eles também podem agir como anti-inflamatórios e, especialmente, cicatrizantes (MONTEIRO et al; 2005; SIMÕES et al; 2010).

Segundo revisões bibliográficas realizadas por Simões et al (2010), os taninos atuam no processo de cicatrização de feridas através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada, ocorrendo, abaixo desta, o processo natural de cicatrização, reestruturação do epitélio e formação de novos vasos.

2.5 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo e representa cerca de 15% do peso corporal total do adulto. Apresenta-se de maneira contínua com as membranas mucosas que revestem os sistemas digestório, respiratório e urogenital, nos locais onde estes se abrem para a superfície. Além disso, a pele realiza diversas funções vitais, incluindo proteção contra agressores físicos, químicos e biológicos externos, termorregulação, como principal barreira para a absorção sistêmica de produtos químicos aplicados topicamente e um portal para a entrega sistêmica de medicamentos transdérmicos (PAGNANO et al, 2009; KOLARSICK et al, 2011; TSAKOVSKA et al, 2017; AREDES et al, 2018).

A pele consiste em três camadas, a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo (Figura 7). A epiderme é composta principalmente por queratinócitos, mas também contém melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Ela é dividida em quatro camadas sobrepostas pelos apêndices da pele, como unidades pilossebáceas e glândulas sudoríparas. A derme é dividida em uma camada papilar e reticular, na qual reside o fornecimento neurovascular da pele. O tecido subcutâneo abaixo da pele contém a fáscia superficial e a gordura subcutânea, a qual é formada por lóbulos de células de gordura separadas por septos fibrosos, constituídos por grandes vasos sanguíneos e colágeno (LOSQUADRO et al, 2017; JAMES et al, 2017).

A epiderme é um epitélio escamoso estratificado terminalmente diferenciado, cujo principal tipo celular são os queratinócitos. Sua divisão em quatro camadas se baseia na morfologia e na posição dos queratinócitos à medida que se diferenciam em células córneas, incluindo a camada de células basais, a camada de

células escamosas, granulares e a camada celular cornificada ou córnea (KOLARSICK et al, 2011).

A derme, por sua vez, se situa entre a epiderme e o tecido subcutâneo e é responsável pela variação regional na espessura da pele. É composta principalmente de colágeno, mas também contém elastina, vasos sanguíneos, nervos e glândulas sudoríparas. A derme possui duas subcamadas: a derme papilar, que fornece laços capilares à epiderme; e a derme reticular, que contém um extenso plexo vascular, linfática e proteínas do tecido conjuntivo (VENUS et al, 2011; MURPHREE, 2017).

As camadas da epiderme e da derme estão conectadas por meio de uma membrana basal denominada junção dérmico-epidérmica. Essa junção está dividida em duas camadas, a camada mais superficial, a lâmina lúcida, é composta de filamentos de âncora conectando hemidesmossomas dentro da membrana plasmática basal celular à camada mais profunda e mais compacta, conhecida como lâmina densa. A lâmina densa, por sua vez, está conectada à derme subjacente através de fibrilações de colágeno. Este mecanismo coesivo fornece um movimento unificado das 2 camadas. (TSAKOVSKA et al, 2017; LOSQUADRO, 2017).

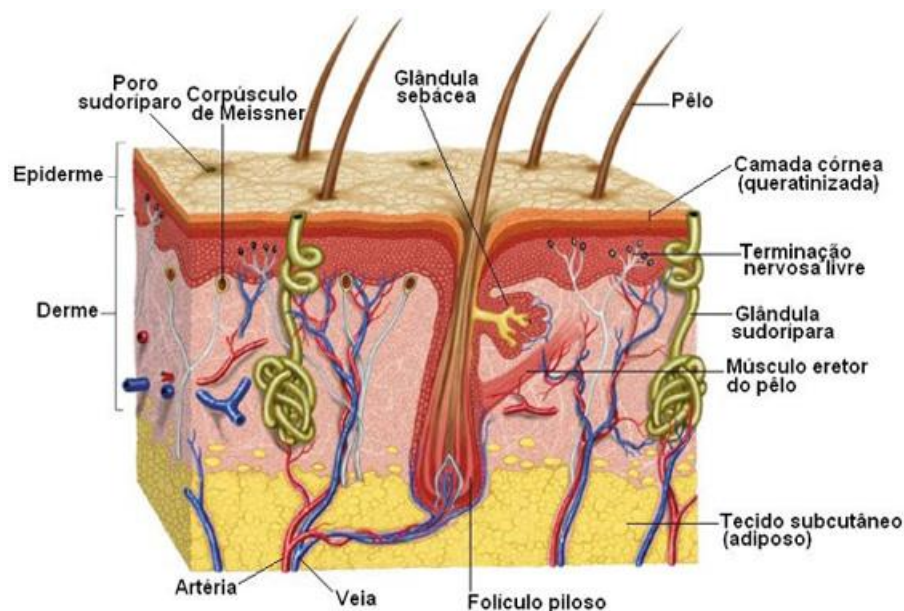


Figura 7: Representação esquemática das estruturas da pele e seus constituintes celulares.

Fonte: Adaptado de Kendall et al., 2013.

2.6 FERIDAS: DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

As feridas são definidas como uma interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou menor extensão, ocasionadas por traumas, processos inflamatórios, degenerativos, circulatórios, por distúrbios do metabolismo ou por defeito de formação (BLANES, 2004; CUNHA, 2006; PEREIRA, 2018).

Baseado na evolução do processo de cicatrização, as feridas podem ser classificadas como agudas ou crônicas. As feridas agudas são um problema de saúde comum, com 11 milhões de pessoas afetadas anualmente no mundo. Normalmente, a cicatrização de feridas agudas é um processo bem organizado que leva a um reparo previsível dos tecidos onde plaquetas, queratinócitos, células de vigilância do sistema imune, células microvasculares e fibroblastos desempenham papéis fundamentais na restauração da integridade do tecido (DEMIDOVA-RICE et al, 2012). As feridas são classificadas como crônicas, por sua vez, caso sua origem torne o processo de cicatrização muito lento, e quando estão associadas a processos anormais, como a insuficiência vascular, isquemia local, necrose e contaminação bacteriana. Tais fatores são capazes de aumentar a fase inflamatória e constante migração de macrófagos e neutrófilos para o leito da ferida (COELHO, 2006; GONÇALVES, 2015). Podem ser englobadas como feridas crônicas, por exemplo, as úlceras vasculares, por pressão e diabéticas (SINGH et al, 2013; DEMIDOVA -RICE et al; 2012).

As feridas também podem ser classificadas em relação ao agente causal (a), grau de contaminação (b) e comprometimento tecidual (c).

a) Agente Causal: as feridas podem ser cirúrgicas ou incisivas quando produzidas por um instrumento cortante; contusas quando produzidas por objetos rombos; lacerantes, produzidas por tração; ou perfurantes, quando ocorre abertura na pele (TAZIMA et al, 2008; GARCIA et al, 2018).

b) Grau de contaminação: as feridas podem ser limpas, quando não apresentam sinal de infecção; limpo-contaminada, quando apresentam contaminação grosseira com risco de infecção de 10%; contaminadas, caracterizadas pelas feridas acidentais com mais de seis horas de trauma ou que tiveram contato com terra e fezes, por exemplo. O nível de infecção é de 20 a 30%; e infectadas, quando apresentam sinais nítidos de infecção (CUNHA, 2006; TAZIMA et al, 2008).

c) Comprometimento tecidual: As feridas também podem ser classificadas em relação à sua perda de tecido. Podem ser: (a) superficiais - são aquelas que atingem apenas a epiderme; (b) espessura parcial - são as que atingem as camadas mais profundas da epiderme e derme; (c) espessura total - são as mais profundas, apresentam perda de tecido subcutâneo, músculo e osso (GARCIA et al, 2018).

2.7 FASES DA CICATRIZAÇÃO TECIDUAL

O processo cicatricial é comum a todas as feridas, independentemente do agente que o causou, é sistêmico e dinâmico e está diretamente relacionado às condições gerais do organismo. Ademais, é complexo que envolve a interação de diferentes células sanguíneas, componentes da matriz extracelular e mediadores solúveis, como fatores de crescimento e citocinas. Se um desses fatores não funcionam corretamente, feridas crônicas, não curativas ocorrem, que apresentam um alto risco de infecções que levam a amputações e sepse (CAMPOS et al, 2007; KONDO, 2017; ERTL et al, 2018).

Os mecanismos da cicatrização em sequência ordenada de eventos foram descritos por Carrel em 1910, e divididos posteriormente em cinco elementos principais: inflamação, proliferação celular, formação do tecido de granulação, contração e remodelação da ferida. No entanto, na última década diversos autores como Gurtner et al (2008) reclassificaram esse processo em três fases consecutivas e sobrepostas em: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de remodelação ou de maturação (Figura 8) (CARREL, 1910; CAMPOS et al, 2007; GURTNER et al, 2008).

A fase inflamatória se inicia no momento exato da lesão, com extravasamento de sangue dos vasos lesionados, ativação de plaquetas pelas substâncias da matriz extracelular que envolve o endotélio, fazendo com que tenha início os processos de adesão e agregação celular. O coágulo formado, juntamente com uma matriz de fibrina formada, estabelece uma barreira impermeabilizante que protege da contaminação e permite um suporte para as futuras células migratórias. Simultaneamente, ocorre vasoconstrição para limitar a perda de sangue sob os efeitos de mediadores vasoativos como: epinefrina, prostaglandinas, serotonina e fator plaquetário 4 (PF4) liberados pelas plaquetas. Estes também liberam vários fatores que iniciam os estágios subsequentes de sobreposição da cicatrização de

feridas. Esses fatores incluem PF4 e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), proteases e agentes vasoativos, serotonina, histamina. Com a liberação local de histamina, serotonina e bradicinina, ocorre uma vasodilatação e aumento de fluxo sanguíneo no local e, conseqüentemente, sinais inflamatórios como calor e rubor (ISAAC et al, 2010; YATES et al, 2012).

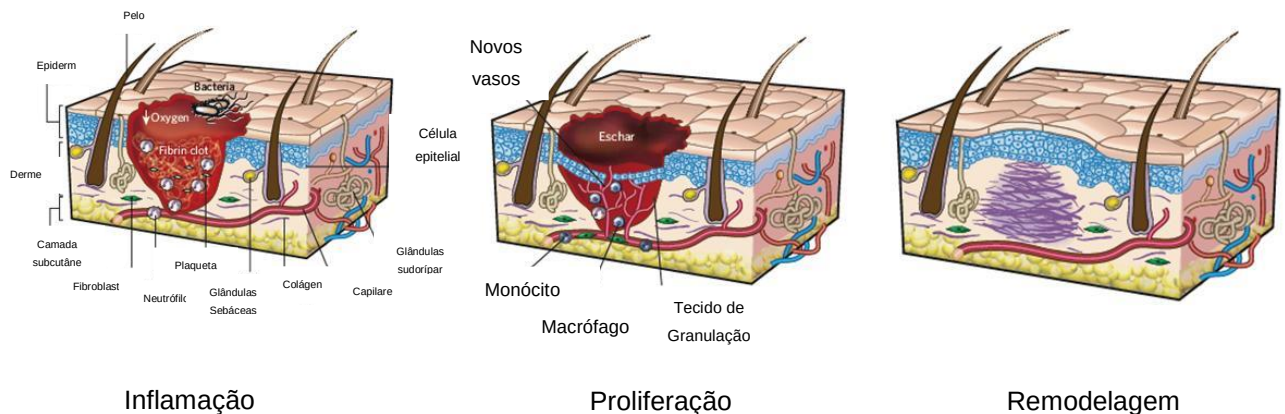


Figura 8: Fases do processo de cicatrização tecidual

Fonte: Adaptado de GURTNER et al; 2008.

Os mediadores bioquímicos de ação curta são a histamina e serotonina e as mais duradouras são a leucotaxina, bradicinina e prostaglandina. A prostaglandina um dos mais importantes no processo de cicatrização, pois além de favorecer a exsudação vascular, estimula a mitose celular e a quimiotaxia de leucócitos (GURTNER et al, 2008; TAZIMA et al, 2008)

Durante a fase de inflamação, a permeabilidade capilar aumenta causando extravasamento de líquidos para o espaço extracelular e conseqüente edema. A resposta inflamatória, que perdura cerca de três dias, e na qual ocorre a migração sequencial das células para a ferida e este mecanismo é facilitada por mediadores bioquímicos supracitados, que aumentam a passagem de elementos celulares para a área da ferida (SINGH et al, 2013).

Inicialmente, neutrófilos são então recrutados para a ferida em resposta à ativação do complemento, à degranulação das plaquetas e aos produtos de degradação bacteriana. Eles são responsáveis pela eliminação de bactérias e materiais necróticos ocasionados por meio da fagocitose, além de liberar mediadores inflamatórios e radicais livres de oxigênio. Entre o segundo e o terceiro

dia, os monócitos aparecem na ferida e se diferenciam em macrófagos. Essas células, além de atuar em fagocitose, também desempenham um papel secundário como fonte de diversos tipos de fatores como fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento beta transformador (TGF- β), os quais promovem a migração, proliferação e sobrevivência de diversas células importantes para os próximos processos da cicatrização, tais como fibroblastos e células endoteliais (LUCAS et al, 2010; YATES et al, 2012; SINGH et al, 2013).

A segunda fase do processo de cicatrização é a fase proliferação ou de granulação que é caracterizada por proliferação celular e migração de diferentes tipos de células. Quatro etapas fundamentais constituem essa fase: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Esta fase tem início em torno do 4º dia após a lesão e se estende aproximadamente até o término da segunda semana (SIGNH et al, 2013).

A epitelização ocorre precocemente. Se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias. Se a membrana basal for lesionada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora. A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e permite que novos capilares forneçam nutrientes para a ferida, contribuindo para a proliferação dos fibroblastos (SIGNH et al, 2013).

Inicialmente a ferida é hipóxica devido à perda da perfusão vascular, mas com o desenvolvimento de uma nova rede capilar, a perfusão vascular é restaurada. A regulação da angiogênese da ferida em si pode representar um meio de melhorar a cicatrização. Em alguns casos, particularmente, quando a angiogênese está atrasada ou defeituosa, implica diretamente no comprometimento da cicatrização (DARBY et al, 2014).

Os novos vasos sanguíneos formados e os brotos de capilares associados a fibroblastos e macrófagos substituem a matriz de fibrina por tecido de granulação, o que constitui um novo substrato para a migração de queratinócitos nos estágios posteriores do processo de reparo. O fator de crescimento mais importante na proliferação e ativação dos fibroblastos são as prostaglandinas, citadas anteriormente. Os fibroblastos são ativados e adquirem a capacidade de expressar a proteína α -SM actina e se diferenciam em miofibroblastos. Essas células

miofibroblásticas sintetizam e depositam os componentes da matriz extracelular, principalmente na forma de colágeno, que substituem a matriz provisória de fibrina, que em última análise, forma a maior parte da cicatriz madura (HINZ et al, 2003; DARBY et al, 2014).

Os queratinócitos, por sua vez, proliferam, amadurecem e, finalmente, restauram a função de barreira do epitélio, através da produção de queratina. A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Os reguladores positivos mais importantes da angiogênese são o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF2) (KONDO, 2017).

A fase de remodelação tecidual representa a última fase da cicatrização e pode 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; SANTANA, 2017).

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 e contribuem para o crescimento de uma cicatriz acelular que ocupa toda região da lesão, revestida por uma epiderme íntegra e desenvolvida (KRAFTS et al., 2010).

Atualmente, na prática clínica, curativos e produtos tópicos são usados para criar e manter um ambiente favorável e fornecer condições adequadas para a cicatrização, além de acelerar esse processo cicatricial. No entanto, eles são frequentemente caros ou ineficazes e podem gerar várias reações adversas. Mesmo com avanços nos estudos farmacológicos, a maioria dos fármacos sintéticos avaliados na literatura como curativos ou enxertos de pele são de alto custo de fabricação e poucos eficazes (ERTL et al, 2018; LORDANI et al, 2018). Diante disso, cresce a necessidade de tratamentos inovadores oriundos de produtos naturais, com baixo custo de produção e que acelere o processo cicatricial, gerando poucos efeitos colaterais ao paciente.

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS

A espécie *L. racemosa* foi coletada no manguezal de Itamaracá (8° 44' 54" Sul, 35° 49' 33" Oeste), litoral Norte do Estado de Pernambuco, identificada e depositada no Herbário UFP- Geraldo Mariz, localizado no centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, com o número de tombamento *Laguncularia racemosa* (Combretaceae); Soares, C. (01) UFP 83.203. Em seguida, o material vegetal foi triturado com o auxílio de um moinho de facas. Para obtenção do extrato hidroalcoólico foi utilizado 50 g do material vegetal para 500 mL de solução etanol/água 70% (v/v), no qual foi macerado em temperatura ambiente durante 48 horas, mantidos em vidros âmbar, sob o abrigo da luz do sol e com agitações ocasionais. Em seguida, esse material extrativo foi filtrado, concentrado em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a temperatura de 40-50 °C e logo depois liofilizado para obtenção do extrato hidroalcoólico de folhas secas de *Laguncularia racemosa*. 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

3.2 PERFIL FITOQUÍMICO- CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

A análise do perfil fitoquímico foi feita segundo metodologia descrita por Wagner e Bladt (2009) e Waksmundzka-Hajnos et al (2008). O extrato foi testado na concentração de 10 mg/mL em Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se como fase fixa sílica gel F254 (MERCK®) e fases móveis específicas de acordo com o metabólito analisado. Uma amostra do extrato bruto na concentração de 10 mg/mL foi aplicada em placas cromatográficas de sílica gel 60 (0,20 mm - fase fixa) e solventes orgânicos (fase móvel) pré-selecionados. Posteriormente, foram reveladas de acordo com a classe de metabólitos pesquisados, sendo estes: flavonoides, terpenos e esteroides, cumarinas, alcaloides e taninos.

3.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS E TANINOS

A fim de quantificar o conteúdo fenólico total e dos taninos, foi utilizada 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.

Para o doseamento dos fenóis totais, após a diluição, foi adicionada uma alíquota de 200 µL do extrato diluído a tubos 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 completado o volume com água destilada para 10 mL. Após a preparação, a solução foi agitada e, posteriormente, foi deixada em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, a absorbância da mistura foi medida a 760 nm contra um branco preparado com água destilada.

Para o doseamento dos taninos, após a diluição, 1 g de caseína foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 50 mL, acrescentando 6 mL da amostra diluída e 12 mL de água destilada, em triplicata. Após 3 horas de reação sob agitação, filtrou-se a solução 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 Folin-Ciocalteu. O teor de taninos foi calculado pela diferença entre o conteúdo de fenóis totais e fenóis residuais.

O padrão utilizado foi o ácido tânico para ambos os ensaios, no qual preparou-se uma curva de calibração em tubos de ensaio com alíquotas de 0,050; 0,100; 0,150; 0,200; 0,250; 0,500; 0,750 e 1 mL da solução padrão de ácido tânico a 1 mg/mL, em água destilada. Em seguida, executou o mesmo procedimento realizado com o extrato. 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).

3.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONOIDES

Para a quantificação dos teores de flavonoides utilizou-se a metodologia descrita por Peixoto Sobrinho et al (2008). O método é fundamentado na interação

do íon alumínio (Al^{3+}) com as moléculas de flavonoides presentes na amostra do extrato. Ao estabelecer o complexo estável flavonoide- íon alumínio, de coloração amarela, é possível determinar a concentração de flavonoides na amostra, onde a intensidade da coloração amarela é proporcional a concentração de metabólitos 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. Uma alíquota de 200 μL do extrato diluído foi transferida para tubos de ensaio. Posteriormente, 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.

Foi preparada uma curva de calibração com alíquotas de 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00 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 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O teor de flavonoides totais foi expresso como miligramas equivalente de rutina por grama de extrato (mg ER/g).

3.5 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. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de água destilada e 500 μL da solução de acetato de chumbo. Agitou-se a amostra 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, 500 μ L) 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 teste foi realizado em triplicata e as concentrações finais de cumarina ficaram entre 0,4-20,0 μ g/mL. O teor de cumarinas totais foi expresso como miligramas equivalente de cumarina por grama de extrato (mg EC/g).

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *L. RACEMOSA*

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

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 μ L do extrato ou do ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, foram transferidos para tubos de ensaio, aferindo-se o volume final para 5 mL com metanol P.A. As concentrações finais do extrato ou padrão foram de 10-500 μ g/mL.

Em seguida, para cada 0,5 mL das concentrações do extrato diluído em metanol foi adicionada 3 mL da solução de DPPH a 40 μ g/mL (ou 3 mL de metanol para fazer 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 foi medida a 517 nm, contra um branco preparado com metanol. A solução do controle negativo consistiu na utilização da solução de DPPH a 40 μ g/mL. A atividade de remoção de radicais livres foi expressa como a concentração eficiente capaz de capturar 50% dos radicais (CE_{50}).

3.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *L. RACEMOSA*

O ensaio de MTT [brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio] consiste em um ensaio colorimétrico que avalia a atividade citotóxica ou proliferativa de diversos compostos. O MTT é um sal tetrazólio, solúvel em água, que é convertido em cristais de formazan, com coloração púrpura, após a clivagem do anel

tetrazólio mediado por desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas. Após a solubilização dos cristais de formazan e medição da densidade óptica pelo espectrofotômetro, é possível avaliar a viabilidade celular, onde a intensidade do produto colorido formado após a solubilização do formazan foi diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra (MOSMANN, 1983).

Uma suspensão (1×10^4 células/mL) de células VERO (fibroblastos de rim de macaco verde africano), L929 (fibroblasto murino) e HaCat (queratinócitos), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos/UFPE, foram distribuídas em uma placa de 96 poços e incubada a 37 °C, em estufa enriquecida com CO₂. Após 24 horas de incubação, foram adicionadas diferentes concentrações do extrato dissolvidos em DMSO e incubadas a 37 °C por 72 horas. Decorrido esse período, o MTT (25 µL) foi adicionado em cada poço. Após 3 horas de incubação, o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado para solubilizar os cristais de formazan. A leitura foi feita em espectrofotômetro do tipo leitor de placas no filtro de 540 nm.

3.8 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *LAGUNCULARIA RACEMOSA*

Para a avaliação da cicatrização *in vitro* foi utilizada a metodologia proposta por Rochetti (2015). Células L929, HaCat e VERO foram plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de 5×10^5 células/mL e cultivadas *overnigh* para obter uma monocamada confluenta. Em seguida, foram feitas “feridas” usando a ponta de uma pipeta estéril de 200 µL. As células desprendidas foram removidas por lavagem em solução tampão fosfato (PBS). Após a lavagem foi adicionado meio fresco contendo 10% de soro fetal bovino juntamente com o extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* L. nas concentrações que variaram entre de 25 a 200 µg/mL. O controle negativo foi incubado com meio contendo 0,1% de DMSO e o controle positivo com 2,5 µg/mL de fitohemaglutinina. A borda da ferida riscada foi fotografada no mesmo ponto de visão, em vários intervalos de tempo, utilizando um microscópio invertido. Os experimentos foram feitos em triplicatas. A área da fenda entre as bordas da ferida foi medida com o auxílio do o programa ISCapture. A percentagem de migração celular foi calculada a partir do tamanho da fenda em 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72

horas após a formação da ferida, comparada com a fenda da ferida inicial no tempo zero.

3.9 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS SEMISSÓLIDA (CREME) CONTENDO EXTRATOS DE *L. RACEMOSA*

A formulação semissólida, utilizando creme aniônico Polawax, cera auto emulsificadora com solubilidade em meio aquoso alcóolico, ideal para emulsões viscosas ou finas, como veículo, foi produzido a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. racemosa*, sendo manipulada dentro dos padrões e controle de qualidade para medicamentos. As concentrações do extrato utilizadas foram de 5 e 10%. Como controle negativo foi utilizado o veículo da formulação, creme Polawax, e como positivo foi utilizado o fármaco dexpanthenol 50 mg/g.

3.10 MODELO DE FERIDA EXCISIONAL

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 em seguida, realizada a tricotomia manual e antissepsia 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, tecido subcutâneo, panículo carnosos e fáscia, utilizou-se tesoura reta de íris e pinça de Adson.

Após a cirurgia, os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos com seis animais cada um: Grupo I (controle negativo – creme base Polawax); Grupo II (EHFSLR 5% - Formulação do extrato hidroalcoólico das folhas secas de *L. racemosa*); Grupo III (EHFSLR 10%- Formulação do extrato hidroalcoólico das folhas secas de *L. racemosa*) e Grupo IV (dexpanthenol – Controle positivo) em todos os grupos os respectivos produtos foram aplicados ($\pm 95 \text{ mg}$) diariamente, durante 3, 7, 14 e 21 dias, utilizando espátula metálica. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), sob protocolo de número 23076.006034/2017-86.

3.11 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO FECHAMENTO DA LESÃO

Para avaliar a contração das feridas tratadas com os diferentes produtos, as mesmas foram medidas utilizando o programa *ImageJ pro* 6.1. O grau de contração expresso em percentual foi mensurado pela equação proposta por Ramsey et al. (1995), sendo $100 \times (W_o - W_i) / W_o = \% \text{ de contração}$. 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 tecido de granulação.

3.12 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As amostras retiradas do tecido cicatricial foram removidas dos animais e armazenadas com formalina a 10%, por 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram transferidas para álcool etílico a 70% e desidratadas a variadas concentrações de etanol, clareadas com xilol e embebidas em parafina. Cortes de aproximadamente 5 μm de espessura foram realizados no material embocado em micrótomo. As lâminas montadas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas até secarem e coradas com hematoxilina - eosina (HE). As análises foram realizadas no microscópio óptico Olympus BX-50.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos por média $\pm$ desvio padrão e avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni (para os ensaios de MTT) ou teste Tukey (para os ensaios de cicatrização). Para o intervalo de confiança de 95%, valores de “p” menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância estatística. Os dados foram analisados pelo programa *Graph Pad Prism* 7.0.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L) C. F. GAERTN

Rendimento do extrato hidroalcoólico de *Laguncularia racemosa* (L) C.F. Gaertn

Após a preparação do extrato hidroalcoólico das folhas secas da espécie *L. racemosa* foi possível calcular o rendimento do extrato de 10,47%.

Os extratos são as mais simples e tradicionais formas de derivados de plantas medicinais, a partir dos quais é possível a obtenção e desenvolvimento de um medicamento fitoterápico (SOUZA, 2018). Dentre os fitoterápicos, mais de 70% apresentam-se como formas farmacêuticas sólidas constituídas principalmente de extratos secos (CARVALHO et al., 2008). A produção de extratos secos é uma alternativa tecnologicamente viável por proporcionar produção em larga escala de produtos mais concentrados, com maior estabilidade química, física e microbiológica e com uma maior facilidade de padronização dos compostos ativos (PETROVICK, 2010; SILVA et al., 2012; MACHADO, 2014).

Em geral, os rendimentos dos extratos que são provenientes de espécies vegetais podem apresentar variações devido aos métodos de extração e os solventes utilizados (DINIZ et al., 2004). Segundo Sartori et al. (2012), no momento que o material vegetal é submetido ao processo de secagem, ocorrerá uma redução significativa da sua massa em relação à da planta fresca.

Segundo Oliveira et al (2015), para escolha do solvente ideal deve levar em consideração a sua toxidez, riscos, a disponibilidade e o custo do solvente. O método extrativo e o solvente extrator estão diretamente relacionados ao rendimento do extrato final, e também aos metabólitos extraídos. Dessa forma é preciso levar em consideração o que se deseja extrair, pois muitas substâncias são termo sensíveis, enquanto outras podem sofrer modificações estruturais irreversíveis em altas temperaturas (SEABRA et al., 2012; SANTANA, 2017).

Perfil Fitoquímico - Cromatografia de camada delgada (CCD)

A Tabela 1 mostra o perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico de *Laguncularia racemosa* por cromatografia em camada delgada. Para esta análise,

foram utilizados como fase móvel vários sistemas de solventes com polaridade crescente.

Tabela 1: Prospecção fitoquímica dos extratos hidroalcoólico das folhas secas de *L. racemosa*.

Metabólitos	Padrões	Reveladores	Fase Móvel/Proporção	Extrato <i>Laguncularia racemosa</i>
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)	++
Terpenoides	Lupeol	Liberman-Burchard	Tolueno:Clorofórmio: Etanol (40:40:10)	-
Cumarinas	Ácido Cumárico	KOH (10%)	- ETOH Clorofórmio: Metanol: Água (01:01)	+

Forte: ++; Fraco: +; Ausente: -

O etanol é um solvente capaz de extrair uma grande quantidade de constituintes de interesse, pois além do seu ponto de ebulição (78,3°C) ser favorável a posterior extração do solvente, apresenta caráter anfifílico, permitindo a extração tanto de substâncias com características apolares quanto polares. Esse fato que pode justificar o maior teor de substâncias fenólicas no extrato etanólico. A água, por sua vez, é bastante utilizada como solvente extrator, pois apresenta diversas características interessantes, como a baixa toxidez, além disso, é conhecida por extrair substâncias com potencial atividade antimicrobiana, como os flavonoides, além de apresentar vantagens relacionadas a aspectos econômicos e ambientais (COSTA et al; 2017).

Através dos resultados obtidos, verificou-se a presença de flavonoides, taninos e cumarinas no extrato hidroalcoólico. Embora a atividade farmacológica

observada por um determinado extrato seja normalmente resultado do efeito sinérgico e conjugado, alguns metabólitos presentes nos extratos vegetais podem responder majoritariamente pela atividade biológica (COSTA et al; 2017).

Silva (2003) observou a presença de flavonoides e taninos nos extratos de *Laguncularia racemosa*. Reddy et al (2016) através de estudos fitoquímicos de camada delgada com *L. racemosa*, também observou a presença de taninos e flavonoides. Além disso, diversos estudos com a família dessa espécie vêm apresentando como característica esses metabólitos secundários, corroborando, dessa maneira, com os nossos resultados (KATERERE et al; 2012).

Determinação do conteúdo de fenólicos totais, taninos totais, flavonoides e cumarinas

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos se deve à grande variedade de combinações que acontece na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis (HARBONE, 1989). Segundo Zeiger (2004) e Sartori (2012), os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos. Dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos e ligninas. Esses compostos fenólicos possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Eles são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (SHAHIDI, 2004; SARTORI, 2012). A tabela 2 mostra os teores de fenólicos totais, flavonoides, taninos e cumarinas encontrados durante análise do extrato das folhas secas de *L. racemosa*.

Tabela 2: Determinação dos conteúdos de fenólicos totais, flavonoides, taninos e cumarinas $\pm$ DP do extrato hidroalcoólico das folhas secas de *L. racemosa*.

Classe de Compostos	<i>Laguncularia racemosa</i>
Fenóis totais (mg EAT/g)	128,24 $\pm$ 2,60
Taninos (mg EAT/g)	113,75 $\pm$ 0,47
Flavonóides (mg ER/g)	85,75 $\pm$ 7,19
Cumarinas (mg EC/g)	226,36 $\pm$ 8,70

Não foi encontrado na literatura, até o presente momento, doseamento do conteúdo de taninos, cumarinas e fenóis totais com a espécie *L. racemosa*. No entanto, Abdel-Hameed et al. (2013) avaliaram a quantificação dos fenólicos totais, flavonóides e taninos do extrato de folhas da família Combretaceae e suas respectivas frações, nas quais as melhores frações obtiveram 328,74 mg EAT/g de compostos fenólicos, 51,36 mg ER/g de flavonoides e 75,86 mg EAT/g de taninos. Dessa forma, extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* apresentou maiores concentrações de taninos e flavonoides do que os dados apresentados na literatura.

A maioria dos extratos não voláteis (polares) são constituídos por compostos fenólicos, onde podemos encontrar uma variedade de estruturas e 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 de catabolismo dos aminoácidos (SIMÕES et al., 2010; SANTANA, 2017).

As aplicações de drogas com taninos estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Por via interna exercem efeito antidiarreico e antisséptico; por via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes. Os flavonóides, por sua vez, apresentam diversos efeitos terapêuticos como anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, entre outros. Devido a esse amplo espectro terapêutico, essa classe é de especial interesse para a farmacologia (HARBONE et al, 2000; PINHO, 2014; OLIVEIRA et al, 2016).

Venugopala et al (2013) relataram diversas atividades biológicas de plantas com elevados níveis de cumarinas na sua composição química, tais como: atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, anticâncer, antiviral, anti-hipertensiva e anticonvulsivante.

Os compostos fenólicos também são muito conhecidos por apresentar a capacidade em sequestrar os radicais livres. Esse potencial antioxidante é atribuído ao grupo das hidroxilas que podem ceder os elétrons e resistir ao deslocamento deste em torno do sistema aromático. Essas substâncias ainda podem agir como agente pró-oxidativos, exercer efeito antitumoral e promover a atividade antitumoral (OLIVEIRA, 2009).

Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *Laguncularia racemosa* pelo método de DPPH

Após a avaliação da propriedade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* pelo método de sequestro de radicais livres DPPH, foram obtidos os valores médios de CE₅₀ de 322,37 ± 24,28 µg/mL (Tabela 3). O controle positivo ou padrão utilizado para o ensaio, o ácido ascórbico, no qual já vêm sendo utilizado na literatura como padrão para ensaios antioxidantes, apresentou um resultado de 16,34 µg/mL.

Tabela 3: Atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas secas de *Laguncularia racemosa* utilizando o radical livre DPPH

Extrato/ Padrão	CE ₅₀ (µg/mL) ± D.P.
Folhas secas de <i>L. racemosa</i>	322,37 ± 24,28
Ácido Ascórbico	16, 34

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

Diversas funções fisiológicas são controladas por vias que envolvem reações de troca de elétrons por redução e oxidação, como a produção aumentada de espécies reativas a oxigênio (EROs) por leucócitos em processos inflamatórios e também em processos que envolvem adesão celular, como embriogênese, diferenciação, reparo e cicatrização (JASIULIONIS et al, 2014; OLIVEIRA et al, 2015).

Shi et al (2010) avaliou a atividade antioxidante de frações da *L. racemosa* pelo método DPPH e apresentaram resultados de 28 µM. Raza et al. (2016), por sua vez, avaliaram a atividade antioxidante das partes aéreas da espécie *Conocarpus erectus*, família Combretaceae, demonstrando que os extratos exerceram uma notável atividade anti-radicalar, com os valores de CE₅₀ 7 ± 2 µg/mL.

Existem diferentes modelos disponíveis para avaliação de atividades antioxidantes. A complexidade química, principalmente dos extratos poderia levar a resultados dispersos, dependendo do teste empregado. Portanto, uma abordagem com múltiplos ensaios para avaliar o potencial antioxidante dos extratos seria mais informativa e até mesmo necessária, pois alguns extratos apresentam diferentes taxas de atividade dependendo do ensaio abordado (SANNIGRAHI et al, 2010).

Dessa forma, outros ensaios que sejam capazes de detectar a atividade antioxidante serão realizados para determinar a atividade no extrato de *Laguncularia racemosa*.

Avaliação citotóxica do extrato hidroalcoólico de *Laguncularia racemosa* (L) Gaertn

Antes da aprovação de qualquer novo composto para testes em seres humanos, são efetuados ensaios de toxicidade extensos em sistemas *in vitro* e *in vivo*, utilizando diversas espécies de animais. Essas técnicas de bioensaios avaliam e definem a concentração de uma substância capaz de produzir uma resposta biológica em nível celular ou sistêmico (FAHEINA- MARTINS, 2009).

A citotoxicidade considera, primariamente, o potencial de um composto induzir morte celular. Testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, isto é, a habilidade intrínseca de um composto em causar morte celular, como consequência de danos às funções básicas celulares (EISENBRAND, 2002; RANG et al, 2004; GHOSH et al, 2012).

O efeito citotóxico do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* foi investigado através de ensaios de redução do MTT, que avalia a atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas com diferentes tipos linhagens normais. Essa técnica foi escolhida por ser um método rápido, econômico e capaz de avaliar a viabilidade celular de diferentes linhagens após o tratamento de novos compostos.

O extrato não apresentou citotoxicidade significativa frente às linhagens L929, HaCaT e VERO no período de 72 horas de incubação nas concentrações variando entre 1,56 a 200 µg/mL. Na linhagem L929, o extrato reduziu a viabilidade celular nas menores concentrações (1,56- 6,25 µg/mL). No entanto, a partir da concentração de 12,5 µg/mL houve um aumento da proliferação celular, de forma proporcional ao aumento da concentração do extrato. Nas linhagens HaCaT e VERO houve uma redução da viabilidade celular apenas na maior concentração (200 µg/mL). Os resultados podem ser observados nas figuras 1, 2 e 3, respectivamente.

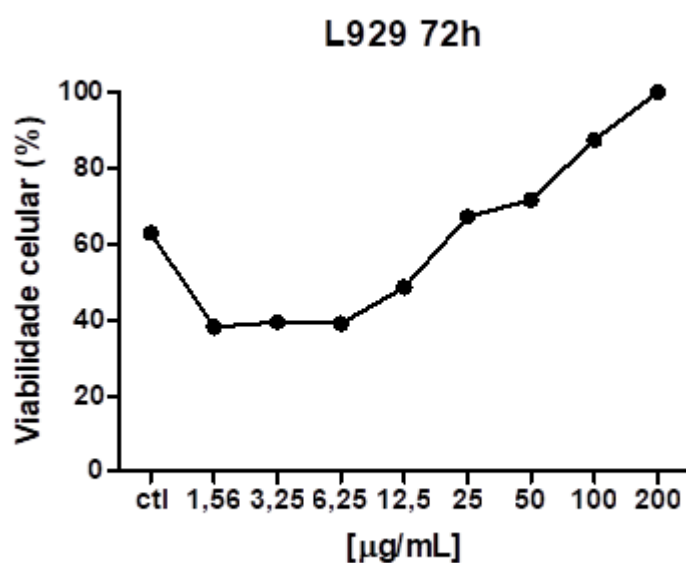


Figura 1: Efeito citotóxico do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* sobre linhagem L929 após 72 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

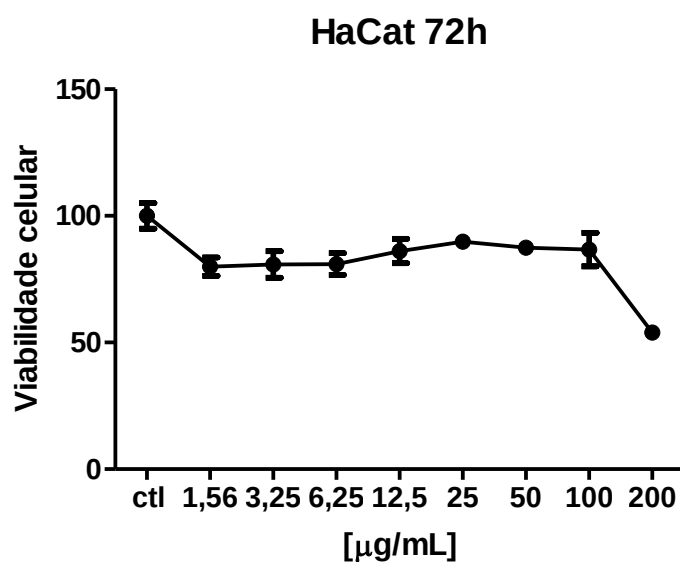


Figura 2: Efeito citotóxico do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* sobre linhagem HaCat após 72 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

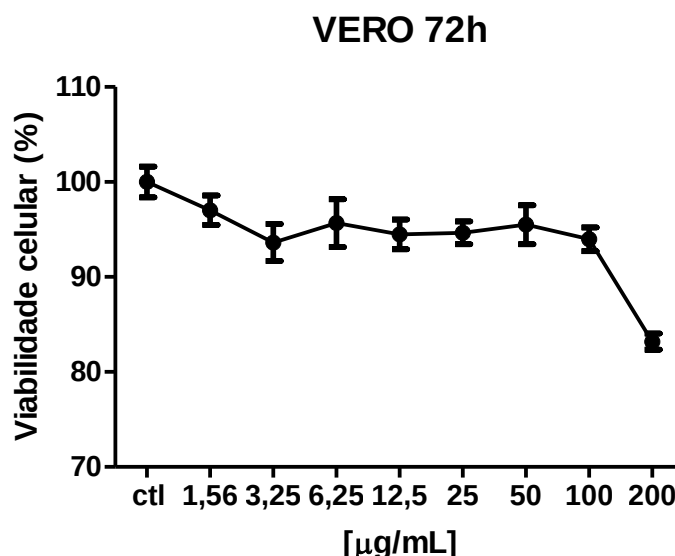


Figura 3: Efeito citotóxico do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* sobre linhagem VERO após 72 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Segundo Darby et al (2014) e Kondo et al (2017), os fibroblastos são células primordiais no processo de cicatrização tecidual, onde irão produzir fatores de crescimento como fator transformador do crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento dos queratinócitos (KGF), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e interleucina-8 (IL-8), os quais irão promover a quimiotaxia e proliferação de queratinócitos e indução da angiogênese.

A HaCat é uma linhagem de queratinócitos humanos espontaneamente imortalizados que tem sido amplamente utilizada para estudos de mecanismos de células epiteliais, como diferenciação e respostas inflamatórias relacionadas à infecção (LOOTENS et al., 2012). Os queratinócitos assim como os fibroblastos, fisiologicamente, participa da produção e liberação de fatores de crescimento como PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- β e a IL-1 (interleucina 1) (ISAAC et al., 2010). Dessa forma, ao induzir a proliferação celular dessas células, o extrato hidroalcoólico de *L. racemosa*, possivelmente, pode facilitar o processo de cicatrização tecidual.

Avaliação da cicatrização *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Laguncularia racemosa*

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica, que não causem reações adversas e nem lesem o organismo do paciente (ROGERO et al., 2003). Além disso, ensaios *in vitro* permitem determinar uma triagem para os ensaios *in vivo*, reduzindo consideravelmente o número de animais utilizados.

Dois processos principais são responsáveis pelo reparo de feridas, migração celular e proliferação celular. A migração celular é o principal evento para a cicatrização, e quando esta função é prejudicada, o processo de cicatricial é dificultado apesar da proliferação celular se manter intacta (BUACHAN et al, 2014). O ensaio de cicatrização *in vitro* é uma forma de mimetizar uma ferida *in vitro* e avalia a taxa de migração celular. Uma vez que a célula monocamada é interrompida, a perda da interação célula-célula resulta na crescente concentração de fatores de crescimento e citocinas na borda da ferida, iniciando migração e proliferação de células (PITZ et al., 2016). Dessa forma, é possível avaliar se o extrato ou composto em estudo promove a proliferação e migração celular e, conseqüentemente, se possivelmente poderá atuar na via de cicatrização tecidual. As Tabelas 4, 5 e 6 e as Figuras 4, 5 e 6 apresentam a porcentagem da migração celular das linhagens celular L929, HaCat e VERO após o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* nas concentrações variando de 25 a 200 µg/mL no período de 0 a 48 horas. Foi utilizado como controle positivo a fitohemaglutinina, composto que já vem sendo apresentado na literatura como um agente mitógeno ideal para padronização de ensaios de migração ou proliferação celular (FEDERICO et al., 2018).

Tabela 4: Porcentagem (%) $\pm$ DP da migração celular da linhagem L929 após o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* e da fitohemaglutinina comparado com o controle após cada hora avaliada a partir da lesão. As letras “a”, “b” e “c” correspondem a * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$), respectivamente.

Extrato Hidroalcoólico da *Laguncularia racemosa*

	Controle	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	Fitoheamaglutinin a (1%)
2h	1,6 $\pm$ 0,2	20,0 $\pm$ 0,1 (c)	13, 6 $\pm$ 0,3 (c)	8,7 $\pm$ 0,4 (b)	9,9 $\pm$ 0,1 (b)	18,3 $\pm$ 0,5 (c)
4h	8,5 $\pm$ 0,8	26,9 $\pm$ 0,3 (c)	20,6 $\pm$ 0,3 (c)	22,6 $\pm$ 0,5 (c)	22,5 $\pm$ 0,7 (c)	24,5 $\pm$ 0,7 (c)
6h	15,1 $\pm$ 0,2	36,2 $\pm$ 0,2 (c)	36,0 $\pm$ 0,0 (c)	36,0 $\pm$ 0,0 (c)	25,3 $\pm$ 0,2 (c)	26,0 $\pm$ 0,0 (c)
8h	26,0 $\pm$ 0,0	34,8 $\pm$ 0,4 (c)	49,4 $\pm$ 0,5 (c)	48,7 $\pm$ 0,7 (c)	46,9 $\pm$ 0,8 (c)	35,9 $\pm$ 0,1 (c)
10h	32,2 $\pm$ 0,7	50,7 $\pm$ 0,6 (c)	55, 3 $\pm$ 0,7 (c)	56,3 $\pm$ 0,1 (c)	56,4 $\pm$ 0,5 (c)	45,6 $\pm$ 0,8 (c)
12h	45,6 $\pm$ 0,8	65,1 $\pm$ 0,4 (c)	68,9 $\pm$ 0,4 (c)	64,4 $\pm$ 0,2 (c)	58,5 $\pm$ 0,7 (c)	54,7 $\pm$ 0,4 (c)
24h	84,7 $\pm$ 0,2	84,5 $\pm$ 0,7	84,5 $\pm$ 0,7	84,4 $\pm$ 0,4	84,4 $\pm$ 0,6	84,3 $\pm$ 0,2
48h	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0

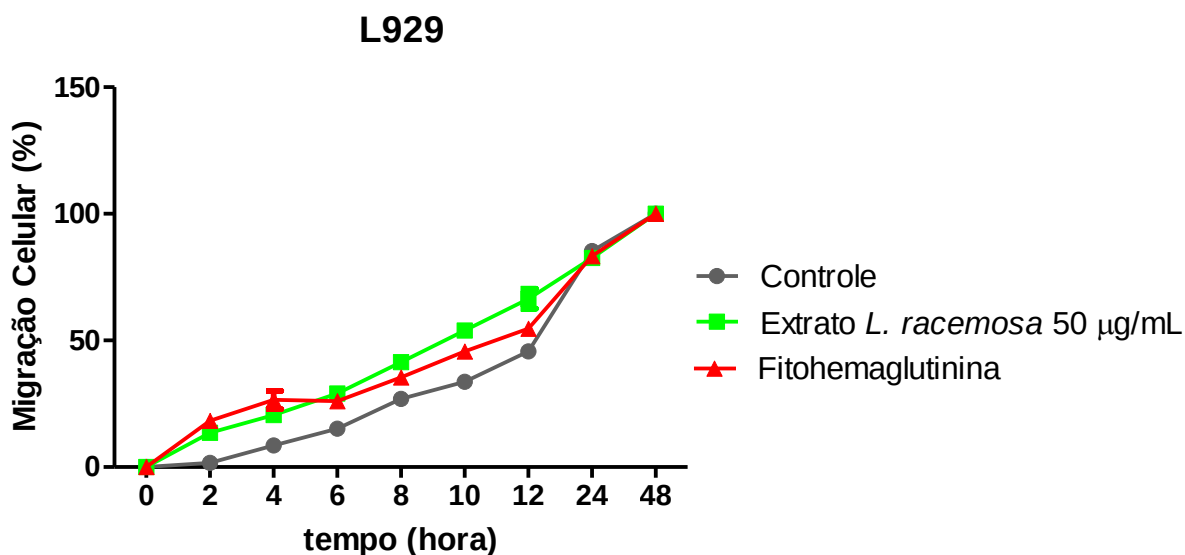


Figura 4: Porcentagem da migração celular da linhagem L929 após o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e fitohemaglutinina a 1% comparado com o controle.

Tabela 5: Porcentagem (%) $\pm$ DP da migração celular da linhagem HaCat após o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* e da fitohemaglutinina comparado com o controle após cada hora avaliada a partir da lesão. As letras “a”, “b” e “c” correspondem a * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$), respectivamente.

	Extrato Hidroalcoólico da <i>Laguncularia racemosa</i>					Fitohemaglutinin a (1%)
	Controle	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	200 μ g/mL	
2h	7,4 $\pm$ 0,3	7,0 $\pm$ 0,5	7,18 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,4
4h	10,1 $\pm$ 0,5	8,7 $\pm$ 0,1	14,9 $\pm$ 0,5 (c)	10,3 $\pm$ 0,3	6,7 $\pm$ 0,4	10,2 $\pm$ 0,0
6h	10,4 $\pm$ 0,4	9,4 $\pm$ 0,4	15,4 $\pm$ 0,1 (c)	10,7 $\pm$ 0,3	6,9 $\pm$ 0,2	10,6 $\pm$ 0,0
8h	29,7 $\pm$ 0,0	31,1 $\pm$ 0,8 (a)	38,7 $\pm$ 0,0 (c)	21,3 $\pm$ 0,6	9,5 $\pm$ 0,6	29,1 $\pm$ 0,0
10h	32,5 $\pm$ 0,2	38, $\pm$ 0,0 (c)	44,2 $\pm$ 0,9 (c)	30,5 $\pm$ 0,5	16,6 $\pm$ 0,3	33,1 $\pm$ 0,0
12h	36,1 $\pm$ 0,1	39,4 $\pm$ 0,4 (c)	66,6 $\pm$ 0,0 (c)	52,1 $\pm$ 0,1 (c)	28,6 $\pm$ 0,4	38,3 $\pm$ 0,2 (b)
24h	80,6 $\pm$ 0,2	87,0 $\pm$ 0,1 (c)	100 $\pm$ 0,0 (c)	80,6 $\pm$ 0,7	78,4 $\pm$ 0,3	70,2 $\pm$ 0,0
48h	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0

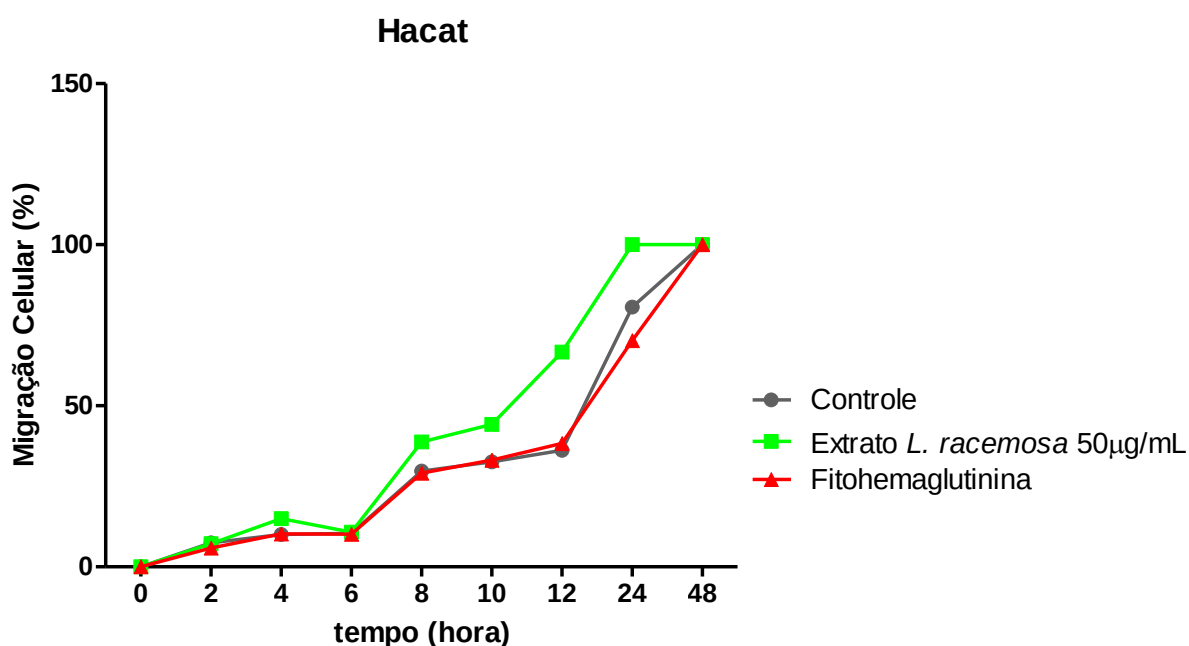


Figura 5: Porcentagem da migração celular da linhagem HaCat após o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* na concentração de 50 μ g/mL e fitohemaglutinina a 1% comparado com o controle.

Tabela 6: Porcentagem (%) $\pm$ DP da migração celular da linhagem VERO após o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* e da Fitohemaglutinina comparado com o controle após cada

Extrato Hidroalcoólico da <i>Laguncularia racemosa</i>						Fitohemaglutinina (1%)
	Controle	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	200 μ g/mL	
2h	4,9 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,1	4,51 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,5
4h	10,4 $\pm$ 0,3	10,3 $\pm$ 0,2	16,4 $\pm$ 0,9 (c)	12,6 $\pm$ 0,5 (a)	5, 5 $\pm$ 0,7	10,0 $\pm$ 0,6
6h	20,5 $\pm$ 0,1	20,5 $\pm$ 0,2	23,2 $\pm$ 0,8 (c)	19,2 $\pm$ 0,4	16,9 $\pm$ 0,5	25,7 $\pm$ 0,7
8h	28 $\pm$ 0,2	28,6 $\pm$ 0,5	33,7 $\pm$ 0,6 (c)	28,4 $\pm$ 0,3	17,4 $\pm$ 0,0	35,2 $\pm$ 0,5 (c)
10h	33,1 $\pm$ 0,6	36,9 $\pm$ 0,5 (c)	36,5 $\pm$ 0,2 (c)	35,6 $\pm$ 0,0 (c)	31,7 $\pm$ 0,8	34,8 $\pm$ 0,8 (a)
12h	39,7 $\pm$ 0,2	40,3 $\pm$ 0,5 (c)	45,4 $\pm$ 0,7 (c)	42,8 $\pm$ 0,6 (c)	36,3 $\pm$ 0,4	42,2 $\pm$ 0,2 (b)
24h	63,9 $\pm$ 0,9	79,1 $\pm$ 0,3 (c)	79,4 $\pm$ 0,3 (c)	73,7 $\pm$ 0,8 (c)	61,9 $\pm$ 0,5	69,6 $\pm$ 0,0 (a)
48h	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	70,6 $\pm$ 0,6	100 $\pm$ 0,0

hora avaliada a partir da lesão. As letras “a”, “b” e “c” correspondem a * (p< 0,05), ** (p< 0,01) e *** (p<0,001), respectivamente.

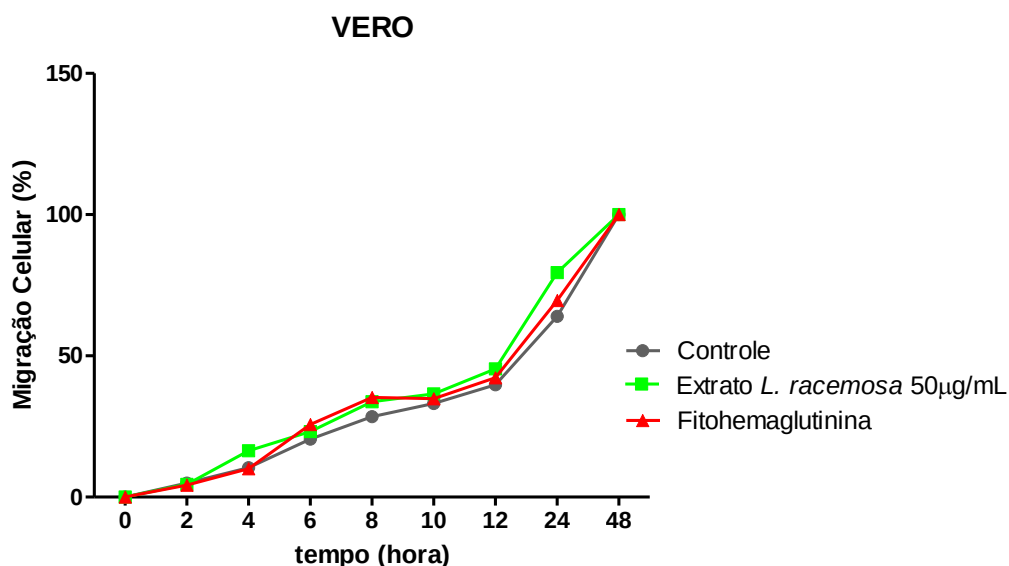


Figura 6: Porcentagem da migração celular da linhagem VERO após o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* na concentração de 50 μ g/mL e fitohemaglutinina a 1% comparado com o controle.

Com base nos resultados apresentados, a *L. racemosa* induziu a migração celular na linhagem L929 de maneira independente das concentrações avaliadas. No entanto, o seu maior efeito é apresentado na concentração de 50 µg/mL no período de 8 a 12 horas de tratamento após a lesão, em comparação com o controle e a fitohemaglutinina.

Na linhagem HaCat, o extrato hidroalcoólico promoveu a migração celular de maneira dependente de concentração, com maior atividade na concentração de 50 µg/mL no período de 8 a 24 horas de tratamento após a lesão, quando comparado ao controle e a fitohemaglutinina. Na concentração de 100 e 200 µg/mL, o composto retardou a capacidade de migração celular da linhagem HaCat, sendo os resultados da concentração de 100 µg/mL ainda semelhantes ao controle, possivelmente devido ao início de citotoxicidade, o qual é observada nos ensaios de MTT apresentados na figura 2.

Na linhagem VERO, por sua vez, o extrato de *L. racemosa* promoveu a migração celular nas concentrações de 25 a 100 µg/mL, com maior atividade na concentração de 50 µg/mL no período de 12 a 48 horas de tratamento após a lesão quando comparado com o controle e a fitohemaglutinina. Na concentração de 200 µg/mL, o extrato retardou a capacidade de migração celular, assim como na linhagem HaCat, possivelmente devido ao início de citotoxicidade, no qual é observada nos ensaios de MTT apresentados na figura 3.

Não foi encontrado na literatura, até o momento, ensaios de cicatrização *in vitro* com extratos ou compostos isolados da espécie *Laguncularia racemosa*. No entanto, Mundian et al (2018) e Talekar et al (2017) relataram atividades de extratos das espécies *Alternanthera sessilis*, *Vitex negundo* L., *Embllica officinalis* Gaertn e *Tridax procumbens* L., que apresentaram metabólitos secundários similares aos encontrados na *L. racemosa* com atividades na promoção da migração celular em linhagens de fibroblastos e HaCat, corroborando com os nossos resultados.

A literatura relata que os flavonoides podem atuar como moléculas de sinalização para modular algumas vias de sinalização de proteínas quinases, como: Fosfoinositídeo 3-quinase (PI3- quinase), MAP quinases, proteína quinase C (PKC) e tirosinas quinases, as quais geralmente desempenham papéis centrais no crescimento, diferenciação e sobrevivência das células. Dessa forma, dependendo da concentração utilizada para o tratamento com as linhagens celulares, o extrato

em estudo poderá ativar vias cruciais permitindo a proliferação e migração celular, ou, em excessividade do metabólito secundário, suprimir essas vias obtendo o efeito inverso (Williams et al., 2004; CAO et al, 2017).

Dessa forma, possivelmente, o extrato hidroalcoólico de *L. racemosa*, o qual apresentou altos índices de flavonoides no doesamento fitoquímico, ativou vias de sinalizações cruciais para o progresso da sobrevivência, proliferação e migração celular, como as citadas anteriormente, nas linhagens L929, HaCat e VERO na concentração de 50 µg/mL e inibiu essas mesmas atividades na concentração de 200 µg/mL nas linhagens HaCat e VERO.

Avaliação da atividade cicatrizante do extrato hidroalcoólico de folhas secas de *L. racemosa* nas lesões cutâneas em ratos Wistar

O potencial cicatrizante do extrato hidroalcoólico de folhas secas de *L. racemosa* (EHFSLR) foi analisado por um período de 3, 7, 14 e 21 dias. Ao longo desse período, a evolução das áreas das lesões foi analisada macroscopicamente, indicando uma melhor reepitelização nos grupos tratados com EHFSLR a 5 e 10%, quando comparados ao grupo controle (creme Polawax) (Figura 7).

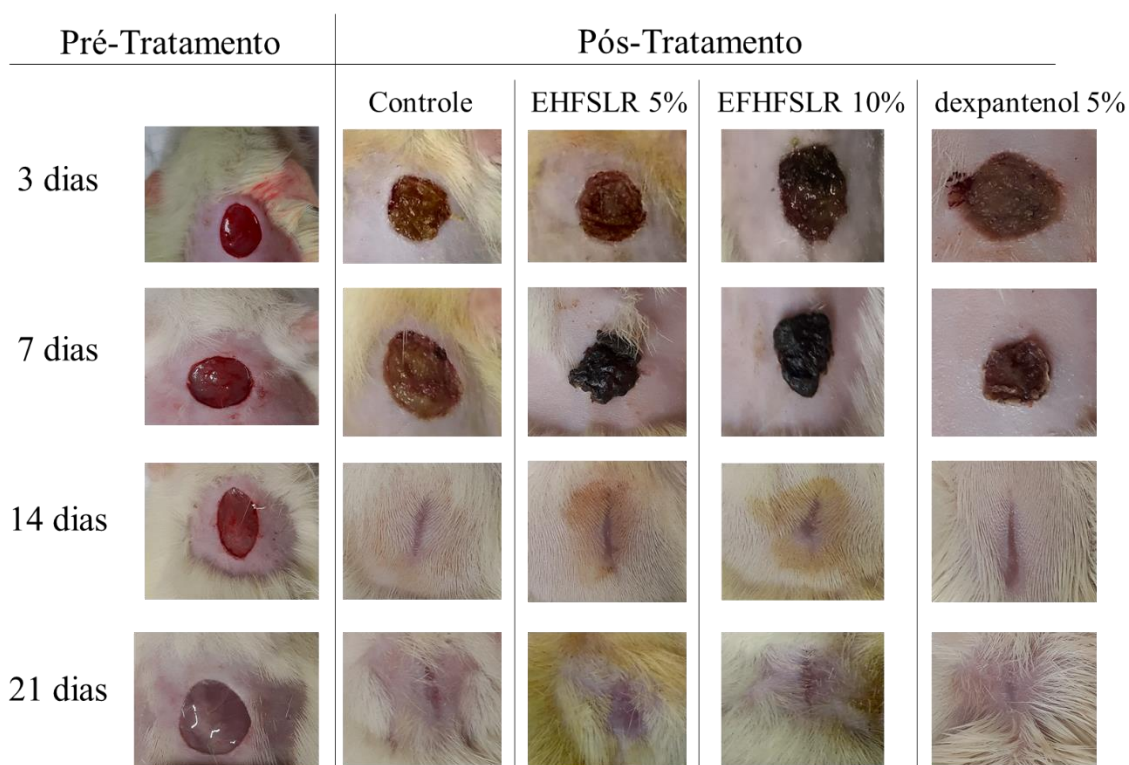


Figura 7: Aspectos macroscópicos das lesões cutâneas antes do tratamento e após o tratamento com creme controle (creme Polawax), EHFSLR 5%, EHFSLR 10% e Dexpantenol 5% durante um período de 3, 7, 14 e 21 dias.

Do 1° ao 3° dia de tratamento com EHFSLR a 5 e 10% foi observado o início da formação do tecido de granulação nas lesões cutâneas com presença de exsudato e pouco edema, enquanto o grupo controle, tratado com creme Polawax, demonstrou hiperemia, exsudato e edema moderado. Não houve em nenhum grupo presença de sangramento ou infecção bacteriana. A retirada de um fragmento de pele, constituindo a lesão cutânea, induz a formação de solução de continuidade que é preenchida por fibrina, coágulo e exsudato inflamatório, formando a crosta que recobre a ferida (MARTINS et al., 2006).

Segundo Katz et al. (1991), o exsudato de feridas agudas é benéfico por conter nutrientes e fatores de crescimento que estimulam o desenvolvimento de células endoteliais e fibroblastos. Martins et al. (2013), relataram no seu trabalho, a presença de exsudato seroso no terceiro dia de tratamento após a lesão tecidual, decorrente do trauma cirúrgico e como um preparo fisiológico para iniciar o processo de reparação.

No 7º dia, os grupos tratados com dexpanthenol, EHFSLR 5% e 10%, apresentaram crosta, especialmente os grupos tratados com o extrato, e ausência de exsudato 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 lesionada e liberar mediadores químicos inflamatórios, que por sua vez irão ativar os fatores de crescimento endotelial vascular e de crescimento de plaquetas, importantes também no processo de angiogênese (ALVES et al., 2011).

A grande intensidade de crosta presente nos grupos tratados com o extrato hidroalcoólico de *Laguncularia racemosa* pode ser atribuída aos altos níveis de taninos presentes no extrato. Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, permitindo que, logo abaixo dessa camada, o processo de reparação tecidual ocorra naturalmente (MELLO & SANTOS, 2001; VIEIRA, 2015).

No período entre o 9º e 14º dias, todos os grupos tratados apresentaram desprendimento da crosta, sendo os grupos tratados com EHFSLR os primeiros a iniciar o processo de reepitelização do tecido. A partir do 15º dia até o 21º, macroscopicamente, a reepitelização tecidual foi completa para todos os grupos analisados, ocorrendo o crescimento de pelos, os quais cobriam a cicatriz gerada, produto de um efetivo processo cicatricial.

Em relação ao grau de contração das lesões teciduais, os grupos tratados com EHFSLR nas concentrações de 5 e 10% reduziram significativamente a área das lesões em comparação com o grupo controle durante o período de 3 e 7 dias após a indução da lesão (Figura 8). Após 3 dias, o grau de contração da ferida para os extratos nas concentrações de 5 e 10% foram de $23,45\% \pm 3,4$ e $23,46 \pm 2,8$, respectivamente, comparado ao controle de $5, 95\% \pm 0,5$. Após 7 dias, o grau de contração foi de $77, 35\% \pm 3,0$ e $76,10\% \pm 6,3$, para as concentrações de 5 e 10%, respectivamente, comparado ao controle de $58,24\% \pm 5,0$.

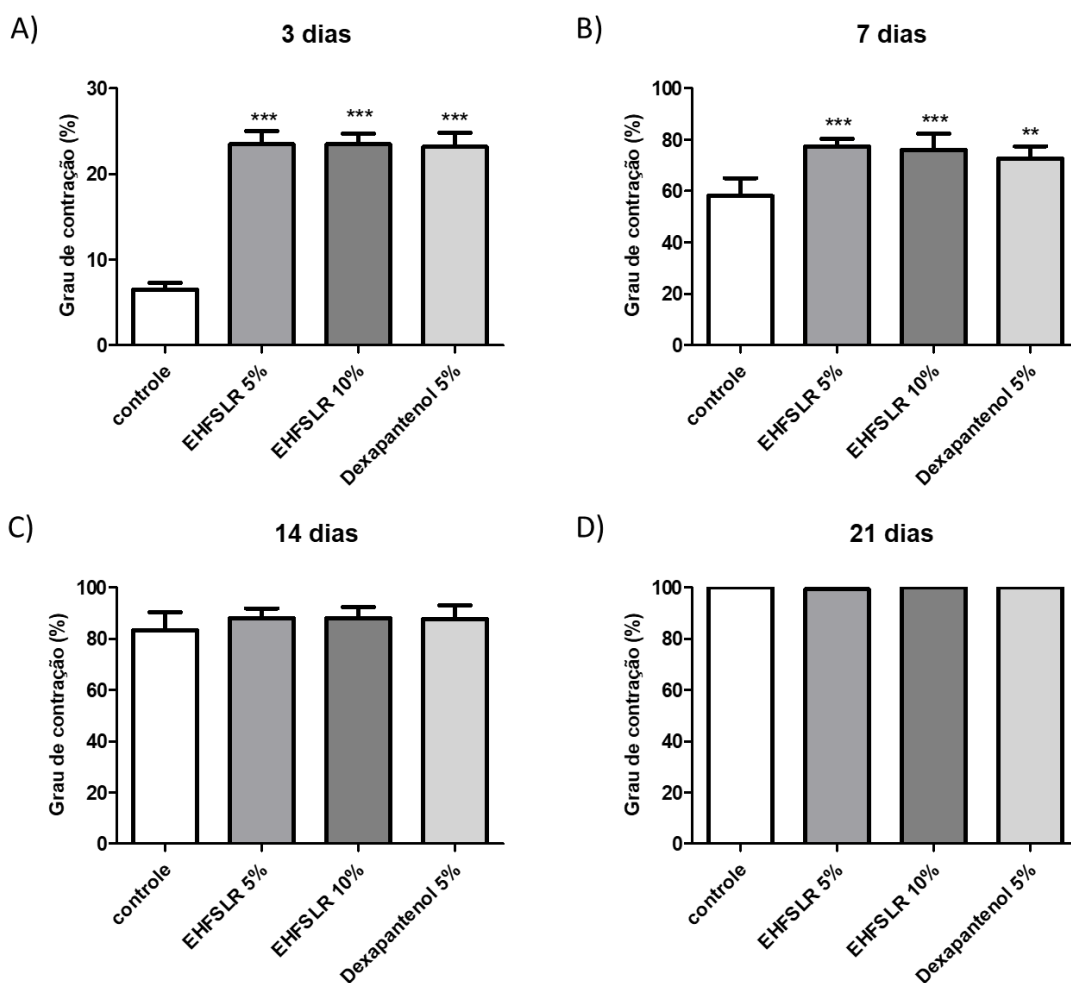


Figura 8: Efeito cicatrizante das formulações semissólidas contendo o extrato de folhas secas de *Laguncularia racemosa* nas concentrações de 5 e 10%, Dexapantenol 5% e creme Polawax (controle) sobre lesões cutâneas em ratos Wistar (n=5 animais/grupo). Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a diferença entre grupos foram determinados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey ** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

A cicatrização cutânea é um processo complexo, influenciado por uma série de fatores, tais como: estado nutricional, doenças sistêmicas, infecção local ou sistêmica, extensão da ferida entre outros. Nesse estudo, foram escolhidos ratos da linhagem Wistar machos para os ensaios experimentais devido à sua grande resistência a processos infecciosos e a agressões cirúrgicas, além de ser de fácil obtenção e manuseio e ser bastante utilizado, na literatura, como modelos para ensaios de reparo tecidual. A escolha do sexo macho para os experimentos se deu com a finalidade de que não houvesse interferência da variação hormonal, o qual poderia interferir no processo de cicatrização (MARTINI et al., 2016).

As plantas são a mais antiga fonte conhecida de medicamentos usados para tratamento de diversas doenças, assim como para o tratamento de feridas e ainda hoje continuam sendo candidatos promissores para novos medicamentos. Neste contexto, algumas espécies da família Combretaceae foram consideradas para o isolamento de novas moléculas com atividade pró-cicatrizante, além da utilização dos seus extratos brutos.

Segundo Ghosh et al. (2012), os compostos que são 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 (Neto et al., 2015).

O processo de contração de feridas é caracterizado por uma resposta inicial a área lesionada com a finalidade de justapor as bordas de uma ferida aberta, essa contração é uma aliada essencial para a cicatrização de feridas, especialmente as abertas, reduzindo a quantidade e o tamanho da cicatriz desordenada (TAZIMA et al., 2008).

Apesar de estudos com a espécie *L. racemosa* voltados para a atividade cicatricial ainda não terem sido relatados na literatura até o presente, esses resultados corroboram com outros já apresentados referentes à variadas espécies da família Combretaceae.

Neto et al (2015) avaliaram o efeito cicatrizante de compostos isolados da espécie *Combretum leprosum* em ratos por um período de 12 dias, após a indução da lesão tecidual. Este estudo revelou que o tratamento com o extrato etanólico das folhas de *C. leprosum* reduziu significativamente o tamanho da ferida, com um percentual de $86,88 \pm 9,37\%$ comparado com $74,25 \pm 3,59\%$ do controle.

Khan et al (2014), por sua vez, revelou que o tratamento com cremes produzidas a partir de extrato da casca de *Terminalia catappa* reduziu em 97% o tamanho da ferida em ratos Wistar comparado a 81% do controle.

Análise Histopatológica

Com relação a análise histológica, foram avaliadas as lâminas contendo o tecido com as lesões dos grupos controle e dos grupos tratados com EHFSLR 5 e 10% e o dexpanthenol (5%) por um período de 3,7, 14 e 21 dias. Os resultados podem ser observados nas figuras 9 a 12.

Após o tratamento de 3 dias (Figura 9) com os extratos hidroalcoólico de *Laguncularia racemosa* a 5 e 10% e dexpanthenol (5%) foi possível observar: presença moderada de infiltrado inflamatório, intensa proliferação vascular e fibroblástica, presença de exsudato, presença de crosta fibrinosa e reepitelização não contínua e início de formação do tecido de granulação. O grupo controle, tratado com o creme Polawax apresentou um intenso infiltrado inflamatório, presença de neutrófilos e proliferação leucocitária, presença de crosta fibrinosa, necrose celular e reepitelização não contínua.

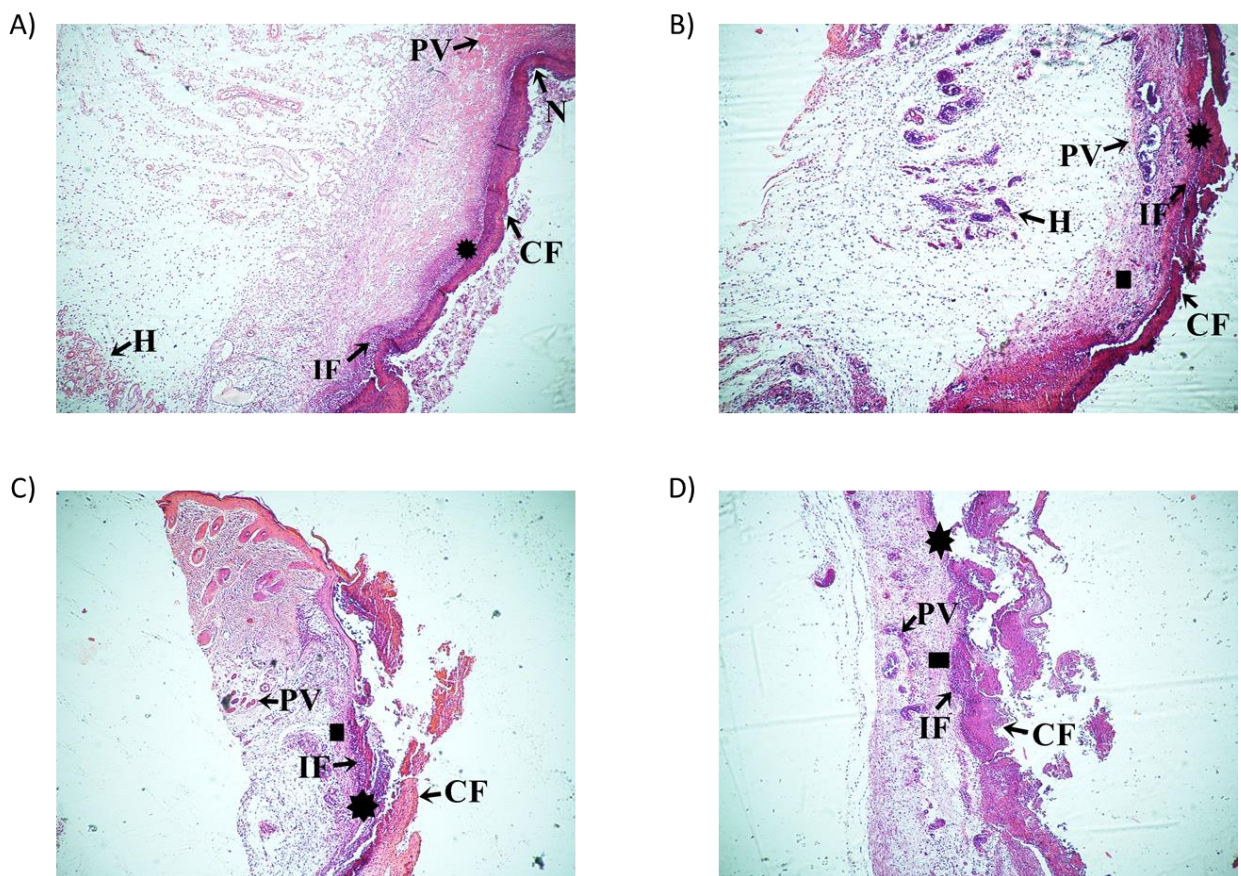


Figura 9: Fotomicrografias dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional após 3 dias de tratamento (aumento de 40 X). Os grupos são representados por (a) creme Polawax, (b) EHFSLR (5%), (c) EHFSLR (10%) e (d) dexpanthenol (5%). CF: Crosta de Fibrina, IF: Infiltrado inflamatório, H: Hiperemia, N: Necrose, PV: Proliferação vascular, Estrela: Reepitelização Contínua ou não, Quadrado: Tecido de granulação. Coloração H. E.

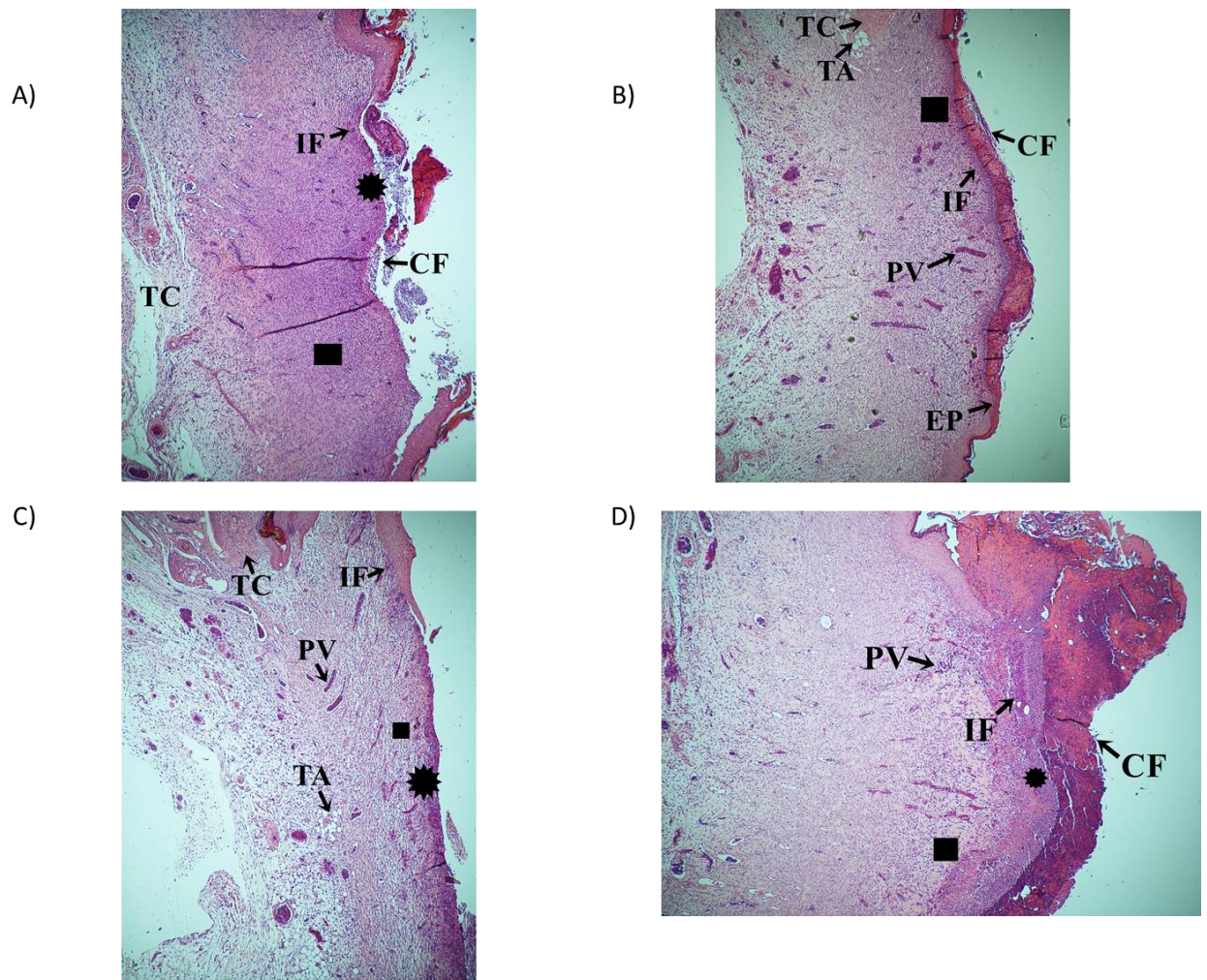


Figura 10: Fotomicrografias dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional após 7 dias de tratamento (aumento de 40 X). Os grupos são representados por (a) creme Polawax, (b) EHFSLR (5%), (c) EHFSLR (10%) e (d) Dexpanthenol (5%). CF: Crosta de Fibrina, EP: Reconstrução do tecido epitelial, IF: Infiltrado inflamatório, PV: Proliferação vascular, TA: Tecido adiposo, TC: Tecido conjuntivo Estrela: Reepitelização Contínua ou não, Quadrado: Tecido de granulação. Coloração H. E.

Após o tratamento de 7 dias (Figura 10), observou-se no grupo controle: reepitelização não contínua na região cicatricial, pouca presença de fibroblasto, intensa presença de infiltrado inflamatório, descaracterização do tecido conjuntivo, pouca presença de vasos sanguíneos e formação inicial do tecido de granulação. As formulações do extrato hidroalcoólico de *Laguncularia racemosa* a 5 e 10% apresentaram: presença moderada de infiltrados inflamatórios, formação de crosta

de fibrina, tecido de granulação, intensa presença de vasos, maior presença de fibroblasto, reepitelização não contínua da região cicatricial, reorganização do tecido conjuntivo e presença de tecido adiposo. O tratamento com dexpanthenol se assemelhou ao tratamento com o extrato de *L. racemosa*, exceto pela presença de vasos e fibroblastos, no qual o dexpanthenol apresentou uma presença moderada para essas características, além de não possuir uma reorganização do tecido conjuntivo.

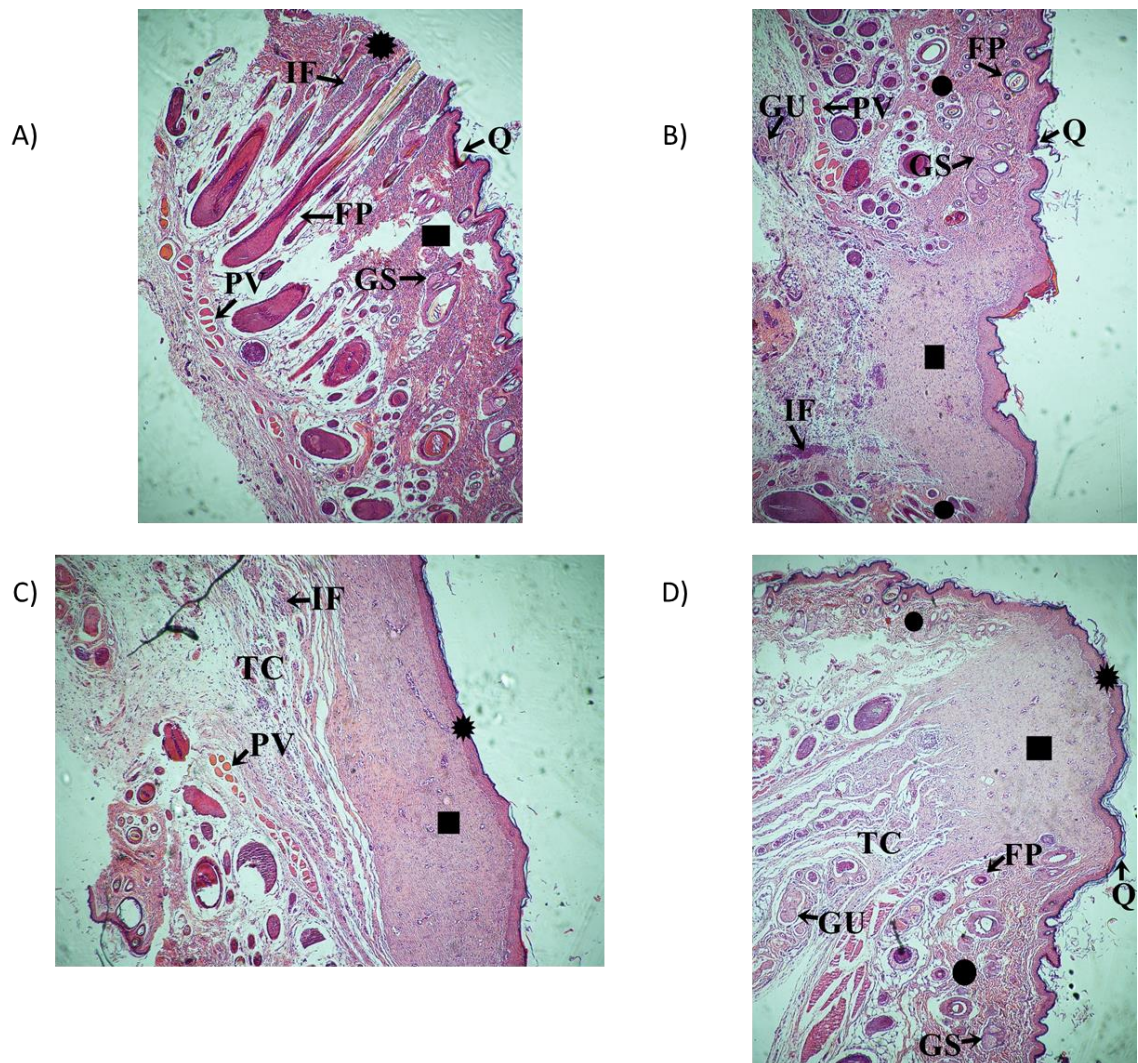


Figura 11: Fotomicrografias dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional após 14 dias de tratamento (aumento de 40 X). Os grupos são representados por (a) creme Polawax, (b) EHFSLR (5%), (c) EHFSLR (10%) e (d) Dexpanthenol (5%). IF: Infiltrado inflamatório, FP: Folículos pilosos, GS: Glândulas sebáceas, GU: Glândulas sudoríparas, PV: Proliferação vascular, Q: Queratina, TC: Tecido conjuntivo, Circulo: Região com intensa presença de fibroblastos e fibras colágenas, Estrela: Reepitelização Contínua ou não, Quadrado: Tecido de granulação. Coloração H.E.

Após o tratamento de 14 dias (Figura 11), observou-se no grupo controle: Reepitelização não contínua na região cicatricial, presença de tecido de granulação, aumento do número de vasos, desenvolvimento do folículo piloso e de glândulas sebáceas e depósito de queratina. No entanto, ainda houve intensa presença de infiltrado inflamatório. As formulações contendo *Laguncularia racemosa* a 5 e 10% apresentaram: Presença de anexos cutâneos totalmente ou parcialmente formados (folículos pilosos, sebáceas e sudoríparas), intensa angiogênese (formação de novos vasos), grande quantidade de fibras colágenas, como consequência da intensa presença de fibroblastos, reorganização do tecido conjuntivo e pouca presença de infiltrado inflamatório. Além disso, observou-se a presença de queratina e tecido adiposo e presença de tecido de granulação, demonstrando uma reepitelização contínua. O tratamento com Dexpanthenol continuou assemelhando-se ao tratamento com o extrato de *L. racemosa* no período de 14 dias.

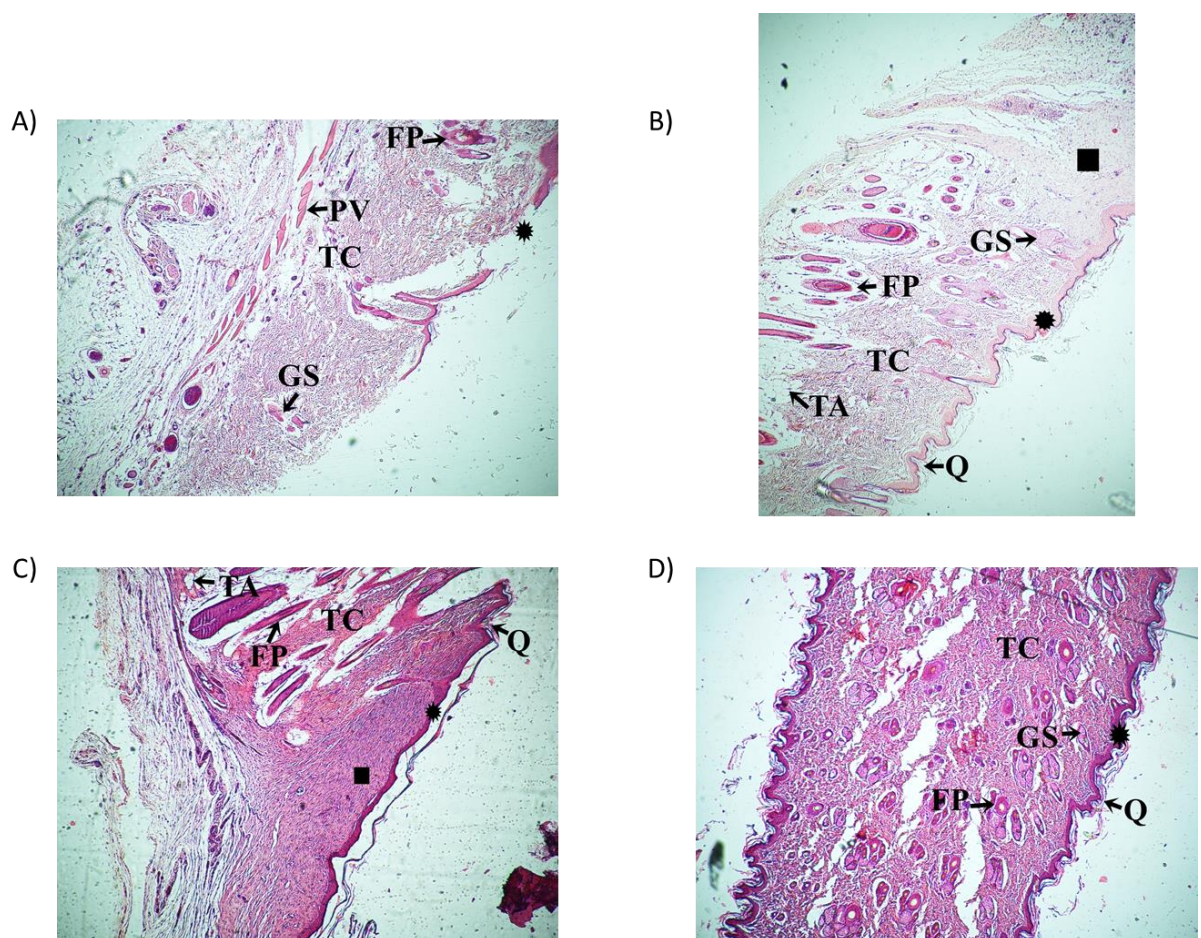


Figura 12: Fotomicrografias dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional após 21 dias de tratamento (aumento de 40 X). Os grupos são representados por (a) creme Polawax,

(b) EHFSLR (5%), (c) EHFSLR (10%) e (d) Dexpantenol (5%). %). FP: Folículos pilosos, GS: Glândulas sebáceas, PV: Proliferação vascular, Q: Queratina, TA: Tecido adiposo, TC: Tecido conjuntivo, Circulo: Região com intensa presença de fibroblastos e fibras colágenas, Estrela: Reepitelização Contínua ou não, Quadrado: Tecido de granulação. Coloração H. E.

Após o tratamento de 21 dias (fig. 12), observou-se no grupo controle um processo de cicatrização mais avançado, mas a região cicatricial ainda não foi totalmente reepitelizada de maneira contínua, tecido conjuntivo em organização, presença de vasos e anexos, tais como, folículos pilosos e glândulas sebáceas, menor quantidade de células inflamatórias. A formulação EHFSLR a 5 e 10% mostraram intensa presença de queratina e maior depósito de colágeno, e como consequência, intensa presença de fibroblastos. Observou-se também a presença de vasos e anexos totalmente formados e redução do tecido de granulação.

Após 21 dias com o tratamento com o EHFSLR a 5%, a região cicatricial foi totalmente cicatrizada de maneira contínua, no entanto, o tratamento com o extrato a 10% ainda apresentou poucas regiões com reepitelização não contínua. O tratamento com Dexpantenol se assemelhou ao tratamento com a formulação do extrato de *L. racemosa* a 5%.

Segundo Kant et al (2013) a inflamação é necessária e deve ocorrer para fornecer proteção contra microrganismos e preparar a ferida para as fases seguintes da cicatrização. Essa resposta inflamatória é caracterizada por intenso infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares, nas quais, quando devidamente estimulados pelas prostaglandinas, produzem mediadores inflamatórios, tais como IL-1, IL-6, TNF- α e proteoglicanos que iniciam a modelagem da matriz extracelular e coordenam as fases posteriores da cicatrização.

Existem muitas drogas que limitam a inflamação e retardam a cicatrização de feridas. O uso de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), em modelos animais demonstrou um efeito antiproliferativo na cicatrização de feridas devido à diminuição do número de fibroblastos, redução da contração da ferida, atraso na reepitelização e comprometimento da angiogênese (Kant et al, 2013). A formulação do extrato de *Laguncularia racemosa* nas concentrações de 5 e 10% induziram um aumento na progressão da contração da ferida comparado ao

controle, possivelmente devido a promoção da inflamação moderada na região cicatricial.

O processo de angiogênese ou formação de novos vasos, observados nas análises histológicas desse trabalho, está associado, especialmente, a fase proliferativa da cicatrização de feridas. Segundo Bao et al (2009) novos vasos emergem no terceiro ou quarto dia após a lesão tecidual, dependendo dos níveis de expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

Os fibroblastos e os queratinócitos são as principais células envolvidas na produção da matriz extracelular e formação do tecido de granulação. Park et al (2017) demonstraram que o receptor VEGFR1 expresso nessas células, após ativado estimula a proliferação e migração para a área da lesão, promovendo a reepitelização tecidual e formação do tecido de granulação. Os resultados *in vitro* e *in vivo* apresentados nesse trabalho associados ao que é demonstrado na literatura, sugerem que possivelmente a promoção da atividade cicatrizante, nas fases iniciais, do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* se dá pela liberação de VEGF e suas por seguintes sinalizações e ativações. No entanto, estudos com determinação dos níveis de expressão desse fator precisam ser realizados para a comprovação da associação da atividade cicatrizante a via de sinalização.

Diversos estudos trazem esse tecido como um fator essencial no processo cicatricial, devido a liberação do fator de crescimento do tecido conjunto (CTGF). Esse fator de crescimento, quando liberado, estimula a proliferação, diferenciação e migração de fibroblastos, além de permitir uma maior adesão celular e promover a quimiotaxia de células inflamatórias (YAN et al, 2017). A partir de 7 dias após a lesão para o tratamento com a formulação de *L. racemosa*, é possível observar uma reorganização do tecido conjuntivo. Dessa forma, possivelmente, a presença do tecido conjuntivo auxilie na progressão da cicatrização das lesões.

Neto et al (2015) revelaram em análises histológicas de animais tratados com compostos isolados da espécie *Combretum leprosum* por um período de 3, 7 e 12 dias, após a lesão tecidual, a presença de tecido de granulação, formação de novos vasos, presença moderada de infiltrado inflamatório, intensa presença de fibroblastos e reepitelização não contínua.

Li et al (2011) realizaram ensaios de cicatrização em rator Wistar com extrato da espécie *Terminalia chebula*. Os resultados das análises histopatológicas demonstraram formação de tecido de granulação, proliferação fibroblástica, e

reepitelização contínua. Todos esses resultados explanados, corroboram com os achados do presente trabalho.

5 CONCLUSÃO

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

- ✓ O extrato hidroalcoólico de folhas secas de *Laguncularia racemosa* apresentou, na avaliação fitoquímica, a presença de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas, sendo os fenóis totais e os taninos as classes de metabólitos majoritário presente no extrato;
- ✓ O extrato apresentou uma atividade antioxidante moderada e promoveu a proliferação celular para as linhagens L929, HaCat e VERO;
- ✓ No ensaio de cicatrização *in vitro*, o extrato hidroalcoólico induziu a migração celular para as linhagens L929, HaCat e VERO de maneira mais significativa comparado ao controle na concentração de 50µg/mL;
- ✓ No ensaio de cicatrização *in vivo*, as feridas tratadas com EHFSLR na concentração de 5 e 10% apresentou maior grau de contração quando comparadas ao grupo controle no período de 3 e 7 dias;
- ✓ Histopatologicamente, os grupos tratados com EHFSLR a 5 e 10% promoveram uma melhor reepitelização tecidual com volumosa presença de fibroblastos, formação de vasos, fibras colágenas e queratina, caracterizando uma evolução mais rápida do processo cicatricial quando comparados aos outros tratamentos;
- ✓ A administração tópica das formulações contendo extrato hidroalcoólico das folhas secas de *L. racemosa* auxiliam na aceleração do processo de cicatrização, podendo estar relacionado a liberação de fatores de crescimento, mostrando potencial terapêutico sobre as lesões cutâneas e comprovando sua utilização popular por comunidades tradicionais.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ABIRI, R.; SILVA, A. L. M.; DE MESQUITA, L. S. S.; *et al.* Towards a better understanding of *Artemisia vulgaris*: Botany, phytochemistry, pharmacological and biotechnological potential. **Food Research International**, v. 109, p. 403–415, 2018.
- ALBERNAZ, L. C.; DE PAULA, J. E.; ROMERO, G. A. S.; SILVA; *et al.* 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.
- AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; *et al.* 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.
- ANDRADE, J.; MATOS, F. O. Nas trilhas da educação ambiental: por uma relação renovada com ecossistemas manguezal. **Geosaberes**. v.7, nº12, p.91-103, 2016.
- ARAUJO, L. C. J; DA SILVA, V. C.; DALL’OGLIO, E. L.; *et al.* Flavonoids from *Combretum lanceolatum* Pohl. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 49, p. 37–38, 2013.
- BAO P; KODRA A; TOMIC-CANIC M; *et al.* The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. **J Surg Res**. v.153, p. 347–58, 2009.
- 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**. Recife: Editora Universitária da UFPE. 2000.

BARTZ, M. C.; MELO JUNIOR, J. C. F.; LARCHER, L. Variação morfológica de *Laguncularia racemosa* (L) C. F. Gaertn. (Combretaceae) em áreas de manguezal de transição entre manguezal e floresta de restinga. **Biotemas**, v. 28, n. 1, p. 21–29, 2015.

BASHEER, A. Z. C.; FARUK, K. M. In vitro evaluation of antiasthmatic activity of ethanol leaf extract of *Guiera senegalensis* j. F. GMEL (Combretaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 12, n. 9, p. 112–120, 2018.

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.

BÍBLIA. **Palara do Senhor a Josué**. Tradução de João Ferreira Almeida. Rio de Janeiro: King Cross Publicações, p. 1110, 2008.

BLANES, L. Tratamento de feridas. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**, p. 1–379, 2004.

BORBA, E. F. O. **Estudo químico e avaliação das atividades biológicas dos extratos de três espécies do gênero *Miconia* (Melastomataceae)**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2017.

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

BUACHAN, Paiwan; CHULAROJMONTRI, Linda; WATTANAPITAYAKUL, Suvara K. Selected activities of *Citrus Maxima merr.* Fruits on human endothelial cells:

Enhancing cell migration and delaying cellular aging. **Nutrients**, v. 6, n. 4, p. 1618–1634, 2014.

CALIXTO, J. B. et. al. Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v. 2, p. 261- 279, 2001.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Wound healing. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51–58, 2007.

CAO, X.; CHEN, Y.; ZHANG, J.; *et al.* Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its in vitro antioxidant activity. **Phytomedicine**, v. 34, p. 76–84, 2017.

Carrel A. The treatment of wounds. **JAMA**. v. 5, p21-48, 1910.

COCCARO, P.; LOPES GUIMARÃES, L.; CHRISTINA, G.; *et al.* Avaliação fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada das folhas caídas de *Terminalia catappa* Linn (Combretaceae). **UNISANTA BioScience**, v. 2, n. 2, p. 110–114, 2013.

COELHO, C. História do tratamento e classificação de feridas. In: Rocha MJ, Cunha EP, Dinis AP, Coelho C. **Feridas uma arte secular: avanços tecnológicos no tratamento de feridas**. Coimbra: Minerva Coimbra, pp. 25-29, 2006.

CORREIA, M. D.; SOVIERZOSKI, H. H. Ecossistemas Marinhos: recifes, praias e manguezais. **Edufal**, p. 55, 2005.

COSTA, J; HOSCHEID, J.; *et al.* Desenvolvimento da química verde no cenário industrial brasileiro. **Fitos**, 2017.

CUNHA, N. A. **Sistematização da assistência de enfermagem no tratamento de feridas crônicas**. Olinda: Pernambuco, 2006.

DAŁBROWSKA, A. K.; SPANO, F.; DERLER, S.; *et al.* The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. **Skin Research and**

Technology, v. 24, n. 2, p. 165–174, 2018. Immune systems in skin wound healing. v. 1, n. 2, p. 24294, 2017.

DARBY, IAN A.; LAVERDET, BETTY; BONTÉ, FRÉDÉRIC; *et al.* Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 7, p. 301–311, 2014.

DE ALMEIDA, C. L. F.; BRITO, S. A.; DE SANTANA, T. I.; *et al.* Spondias purpurea L. (Anacardiaceae): Antioxidant and antiulcer activities of the leaf hexane extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 14, 2017.

DEL, N.; AREDES, A.; CRISTINA, R.; *et al.* Cuidados com a pele do recém-nascido prematuro: revisão integrativa. **Revista Eletrônica de Enfermagem**. n. 1, p. 1–25, 2017.

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.

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.

EISENBRAND, G. *et al.* Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2-3, p. 193–236, 2002.

ENGLER, A; DIELS, L. **Monographieen Afrikanischer Pflanzenfamilien und Gattungen 3: Combretum**. Leipzig, Verland von Wilhelm Engelmann. 1899.

EXELL, A.W.; STACE, C.A. Revision of the Combretaceae. **Boletim Sociedade Broteriana**. v.40, p. 5-25. 1966.

ERTL, J.; PICHLBERGER, M.; TUCA, A. C.; *et al.* Comparative study of regenerative effects of mesenchymal stem cells derived from placental amnion, chorion and umbilical cord on dermal wounds. **Placenta**, v. 65, p. 37–46, 2018.

FAHEINA-MARTINS, G.V. **Avaliação do Potencial Citotóxico das lectinas de *Canavalia Ensiformis*, *Canavalia Brasiliensis* e *Cratylia Floribunda***. (dissertação) Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2009.

FEDERICO, C.; GIL, L.; BRUNO, F.; *et al.* Phosphorylated nucleolar Tau protein is related to the neuronal in vitro differentiation. **Gene**, v. 664, n. October 2017, p. 1–11, 2018.

FERNANDES, V.; SOUSA, D. O.; LOPES, G.; *et al.* Levantamento etnobotânico da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal. **Acta Biológica Catarinense**. v. 5, n. 1, p. 46–55, 2018.

FORZZA, R. C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; *et al.* **In Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do RJ, 2013.

FIEABIG, G. M.; PASA, C. As plantas medicinais na comunidade Passagem da Conceição, Mato Grosso, Brasil. **Advances in Forestry Science**. v.5, n.1, p.237-248, 2018.

GARCIA, F. J.; BLANES, L.; GOMES, H. F. C.; *et al.* **Protocolo de tratamento de feridas para o sistema penitenciário do estado de São Paulo**. 1 ed, São Paulo: São Paulo, 2018.

GHOSH, S.; SAMANTA, A.; MANDAL, N. B.; *et al.* 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.

GIRI, C.; OCHIENG, E.; TIESZEN, L.L.; *et al.* Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, v. 20, n. 1, p. 154-159, 2011.

GOMES, E. C.; ROCHA, T. C. Uso De Plantas Medicinais Por Comunidades Do Município De Curitiba. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**. v. 10, n. 2, p. 91-97, 2017.

GONÇALVES, R.Q. **Prevalência de feridas em pacientes atendidos em uma rede primária de saúde**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina Dr. Hélio Mandetta, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 2008.

HAN, J.; JIN, W.; HO, N.; *et al.* Decursin and decursinol angelate improve wound healing by upregulating transcription of genes encoding extracellular matrix remodeling proteins, inflammatory cytokines, and growth factors in human keratinocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 499, n. 4, p. 979–984, 2018.

HARBONE, J. B. General procedures and measurement of total phenolics. In: **Methods in plant biochemistry: plant phenolics**. London: Academic, v. 1, p. 1-28, 1989.

HARBONE JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v. 55, p. 481-504, 2000.

HINZ B, GABBIANI G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. **Thromb Haemost**. v. 90, n. 6, p. 993–1002, 2003.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; RÊGO, F. M. P.; *et al.* Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3/4, p. 125, 2010.

JASIULIONIS, M.G.; SILVA, C. T. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n.1, 2014.

KANT, V.; GOPAL, A.; KUMAR, D.; *et al.* Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 1, p. 5–13, 2014.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; *et al.* Phytochemical and antimicrobial investigations of stilbenoids and flavonoids isolated from three species of Combretaceae. **Fitoterapia**, v. 83, n. 5, p. 932–940, 2012.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B.L. Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystems. **Advances in Marine Biology**, Plymouth, v.40, p.81-251, 2001.

KATZ, M.H. *et al.* Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth. **J Am Acad Dermatol**, v.25, n.6, p.1054-1058, 1991.

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.

KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and Physiology of the Skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, n. 4, p. 203–213, 2011.

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

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

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; RÊGO, F. M. P.; *et al.* Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3/4, p. 125- 131, 2010.

JANTSCH, A.; JÚNIOR, J. C. F.; AMORIM, M. W.; *et al.* Wood anatomy of *Laguncularia racemosa* (Combretaceae) in mangrove and transitional forest, Southern Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 66, n. 2, p. 647–657, 2018.

JUVINO, R.; MENDES, D. A.; ALVES, A.; *et al.* Evaluation of molluscicidal activity of three mangrove species (*Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* and *Rhizophora mangle*) and their effects on the bioactivity of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. p. 1–9, 2018.

LI, K.; DIAO, Y.; ZHANG, H.; *et al.* 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.

LI, X.; WANG, Y.; ZOU, Z.; *et al.* OM-LV20, a novel peptide from odorous frog skin, accelerates wound healing in vitro and in vivo. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 91, n. 1, p. 126–136, 2018.

LIMA, J. L. C. Flora das cangas da serra dos carajás, pará, brasil: Rhizophoraceae. **Rodriguesia**, v. 69, n. 1, p. 205–207, 2018.

LINSINGEN, L. V.; CERVI, A. C. A família Combretaceae R. Brown nas formações de Cerrado do estado do Paraná. **Pesquisas, Botânica**, v. 59, n. 3, p. 211–221, 2008.

LOIOLA, M. I. B.; ROCHA, E. A.; BARACHO, G. S.; *et al.* Flora da Paraíba, Brasil: Combretaceae. **Acta bot. bras.** v. 23, n. 2, p. 330-342. 2009

LOOTENS, L.; BRUSSELAERS, N.; BEELE, H.; *et al.* Keratinocytes in the treatment of severe burn injury: An update. **International Wound Journal**, v. 10, n. 1, p. 6–12, 2013.

LORDANI, T. V. A.; LARA, C. E.; FERREIRA, F. B. P; *et al.* Therapeutic Effects of Medicinal Plants on Cutaneous Wound Healing in Humans: A Systematic Review. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1-12, 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, p. 246-251, 2008.

LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 283–289, 2017.

LUCAS, J. B. The Physiology and Biomechanics of Skin Flaps. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 303–311, 2017.

LUCAS, T.; WAISMAN, A.; RANJAN, R.; *et al.* Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 7, p. 3964–3977, 2010.

MACHADO, M.; MARIA, A.; WOOD, N.; *et al.* 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**. v1, n 2, p. 2011.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.

MADI, A. P. L. M.; BOEGER, M. R. T.; LARCHER, L.; *et al.* Estrutura do componente de regeneração natural e arbóreo de dois manguezais no estado do Paraná. **Ciencia Florestal**, v. 26, n. 1, p. 159–170, 2016.

MARTINI, CARLOS AUGUSTO NUNES; SCAPINI, JOÃO GUILHERME SEIFERT; COLLAÇO, LUIZ MARTINS; *et al.* Comparative analysis of the effects of Copaifera multijuga oil-resin and nitrofurazona in the cutaneous wound healing process. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgições**, v. 43, n. 6, p. 445–451, 2016.

MARTINS, EAN; INVERNIZZI, MS. Emprego de membrana de quitosana em feridas cutâneas induzidas experimentalmente em equinos. **Ciência Rural**, p. 1824–1830, 2013.

MARTINS, N.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J.; *et al.* Healing process in cutaneous surgical wounds in rats under the influence of *Orbignya phalerata* aqueous extract. **Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 21 Suppl 3, n. Suplemento 3, p. 66–75, 2006.

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 inhiitatorio sobre bacterias y hongos. **Ciência UANL**. v. 6, n. 3, p. 333-338, 2003.

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.

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFGRS/Ed.UFSC, 2001. cap. 24, p.517-543.

MERKIN, A.; MESELE, B.; TSIGE, K. Effect of *Combretum molle* (Combretaceae) seed extract on hematological and biochemical parameters. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 5, p. 55–63, 2018.

MONGALO, N. I.; MCGAW, L. J.; SEGAPELO, T. V.; *et al.* Ethnobotany, phytochemistry, toxicology and pharmacological properties of *Terminalia sericea* Burch. ex DC. (Combretaceae) – A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, n. October, p. 789–802, 2016.

MURPHREE, R. W. Impairments in Skin Integrity. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 3, p. 405–417, 2017.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. **Extraction and analysis of phenolics in food** *Journal of chromatography A*, New York, v. 1/2, p. 95-111, 2004.

NETO, L. G.; EVARISTO, F. F. V.; DE ALENCAR ALVES, M. F.; *et al.* Effect of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene isolated from the leaves of *Combretum leprosum* Mart. on cutaneous wounds in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, n. 29, p. 116–120, 2015.

NETO, R. L. S.; CORDEIRO, L. S.; LOIOLA, M. I. B. Flora do Ceará, Brasil: Combretaceae. **Rodriguesia**, v. 65, n. 3, p. 685–700, 2014.

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

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.

OLIVEIRA, A.C. *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 2009

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, V.; ZUCHETTO, M.; PAULA, C. S.; *et al.* Avaliação do potencial antioxidante frente à oxidação lipídica e da toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das frondes de *Dicksonia sellowiana*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.17, n.4, p.614-621, 2015.

PAGNANO, L. D. O. **O Análise da cicatrização na pele de coelhos após tratamentos de feridas com biomateriais associados à fração de proteína do látex natural da seringueira.** Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2009.

PARK, K.; AMANO, H.; ITO, Y.; *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) tyrosine kinase signaling facilitates granulation tissue formation with recruitment of VEGFR1+ cells from bone marrow. **Anatomical Science International**, v. 1, 2017.

PASQUA, I. C. Plantas Hortícolas Não Convencionais: Seus Potenciais nutraceuticos e medicinais. **Hortic. bras.** v. 2, p. 4061–4073, 2009.

PATWARDHAN, B., VAIDYA, A. B. D., CHORGHAD, M. Ayurveda and Natural Products Drug Discovery. **Current Science**. v. 86, p. 789-799, 2004.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. D.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO; *et al.* 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.; *et al.* Phenolic content and antioxidant capacity of four Cnidoscolus species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 20, p. 2310-2316, 2011.

PEREIRA, T. A. C. F. **Feridas Complexas: Classificação de Tecidos, Segmentação e Mensuração com o Classificador Optimum-Path Forest.** Dissertação (Mestrado) Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2018.

PINHO, M. V. T. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade farmacológica de extratos obtidos de Laguncularia racemosa e atividade inibitória sobre SPLA2**

extraída de *Bothrops jararacussu*. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2014.

PITZ, H. S.; PEREIRA, A.; BLASIUS, M. B.; *et al.* *In Vitro* Evaluation of the Antioxidant Activity and Wound Healing Properties of Jaboticaba (*Plinia peruviana*) Fruit Peel Hydroalcoholic Extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–6, 2016.

RABELO, A. S. OLIVEIRA, I. D., GUIMARÃES, A. G. *et al.*, “Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from *Remirea maritima* (Cyperaceae),” **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 145, pp. 11–17, 2013.

RANG, H.P. DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

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.

REDDY, P; AUDIPUDI, A. V. Physico-Phyto and Chromato Graphic Analysis of *Aviccinia alba* and *Laguncularia racemosa*. **IJPPR**. v. 8, n. 11, p. 1818–1822, 2016.

RENDÓN-SANDOVAL, F. J.; IBARRA-MANRÍQUEZ, G. El género *Combretum* (Combretaceae) en el occidente de México. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 89, n. 2, p. 340- 350, 2018.

ROCHETTI, A. L. **Caracterização dos efeitos antitumorais do guaraná sobre modelo murino de células tronco cancerosas**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, 2015.

RODRIGUES, C.; GAETA, H.; BELCHOR, M.; *et al.* Evaluation of potential thrombin inhibitors from the white mangrove (*Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn.). **Marine Drugs**, v. 13, n. 7, p. 4505–4519, 2015.

RODRIGUES, A. C. F.; DA COSTA, J. F.; SILVA, A. L.; *et al.* Atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade do extrato etanólico de *Senna obtusifolia*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n.6, p. 250 – 257, 2011.

ROGERO, S. O. *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.

ROSA, S.; CARVALHO, A.; MAIO, D. A importância do trabalho de campo para a Educação Ambiental: experiência realizada com alunos do ensino médio no ecossistema manguezal. **Rev. Eletrônica Mestr. Educ. Ambient.** v. 35, n. 1, p. 21-41, 2018.

SANTANA, M. A. N. **Avaliação do potencial cicatrizante de *Conocarpus erectus* sobre lesões cutâneas em ratos Wistar.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, 2017.

SANNIGRAHI, S.; MAZUDER, U.; PAL, D.; *et al.* Antioxidant potential of crude extract and different fractions of *Enhydra fluctuans* Lour. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 1, p. 75–82, 2010.

SANTOS, D. K. D. N.; DE ALMEIDA, V. S.; DE ARAUJO, D. R. C.; *et al.* Evaluation of cytotoxic, immunomodulatory and antibacterial activities of aqueous extract from leaves of *Conocarpus erectus* Linnaeus (Combretaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, p. 1- 10, 2018.

SARTORI, C. J. **Avaliação dos teores de compostos fenólicos nas cascas de *Anadenanthera peregrine* (angico-vermelho).** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2012.

SAXENA, G.; MCCUTCHEON, A. R.; FARMER, S.; *et al.* Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 42, n. 2, p. 95-99, 1994

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezal: Ecossistema que ultrapassa suas próprias fronteiras**. In: Congresso Nacional de Botânica, 53, Recife, p34-37. 2002.

SHI, C.; XU, M. J.; BAYER, M.; *et al.* Phenolic compounds and their anti-oxidative properties and protein kinase inhibition from the Chinese mangrove plant *Laguncularia racemosa*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 4, p. 435–442, 2010.

SEABRA, I. J.; DIAS, A. M. A.; BRAGA, M. E. M.; DE SOUSA, H. C. High pressure solvent extraction of maritime pine bark: Study of fractionation, solvent flow rate and solvent composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 62, p. 135-148, 2012.

SEEGER, M. A.; PALLER, A. S. The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 4, p. 213–224, 2015.

SHI, C.; XU, M. J.; BAYER, M.; *et al.* Phenolic compounds and their anti-oxidative properties and protein kinase inhibition from the Chinese mangrove plant *Laguncularia racemosa*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 4, p. 435–442, 2010.

SILVA, J. B. **Sensoriamento remoto aplicado ao estudo do ecossistema manguezal em pernambuco**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2012.

SILVA, L. L.; LOPES, P. F.; MONTEIRO, M. H.D.A.; *et al.* Importância do uso de plantas medicinais nos processos de xerose, fissuras e cicatrização na diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 827–835, 2015.

SILVA, J. M.; MARTINS, M. B. G.; CAVALHEIRO, A. J. Caracterização anatômica e perfil químico da lâmina foliar de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn, de manguezais impactados e não impactados do litoral de São Paulo. **Iheringia - Serie Botanica**, v. 65, n. 2, p. 123–132, 2010.

SILVA, M. B. D. S. **Estudo fitoquímico e biológico de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.f. (mangue branco)**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2003.

SINGH, M. R.; SARAF, S.; VYAS, A.; *et al.* Innovative approaches in wound healing: Trajectory and advances. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 202–212, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; *et al.* **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6° edição. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, p. 1102, 2010.

SOUZA, C. A.; DUARTE, L. F. A.; JOÃO, M. C. A.; PINHEIRO, M. A. A. 2018. Biodiversidade e conservação dos manguezais: importância bioecológica e econômica, Cap. 1: p. 16-56. In: PINHEIRO, M. A. A.; TALAMONI, A. C. B. (Org.). **Educação Ambiental sobre Manguezais**. São Vicente: UNESP, Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, 165 p, 2018.

SPALDING, M.; KAINUMA, M.; COLLINS, L. **World Atlas of Mangroves**. Earthcan, p. 319, 2010.

STACE, C.A. Combretaceae. Pp. 110-111, fig. 55, pl 15. In: N. Smith; S.A. Mori; A. Henderson; D.W. Stevenson & S.V. Heald (eds.). **Flowering Plants of the Neotropics**. United Kingdom, The New York Botanical Garden. Princenton University Press, 2004.

TALEKAR, Y. P.; APTE, K. G.; PAYGUDE, S. V.; *et al.* Studies on wound healing potential of polyherbal formulation using in vitro and in vivo assays. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 8, n. 2, p. 73–81, 2017.

TAN, F.; SHI, S.; ZHONG, Y.; GONG, X. & WANG, Y. Phylogenetic relationships of Combretaceae (Combretaceae) inferred from plastid, nuclear gene and spacer sequences. **Journal of Plant Research** **115**: 475-481. 2012.

TANG, W.; ZHENG, M.; ZHAO, X.; *et al.* Big geospatial data analytics for global mangrove biomass and carbon estimation. **Sustainability (Switzerland)**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.

TAZIMA, M. F. F.G S; VICENTE, Y. A. M. V.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina**, v. 41, n. 3, p. 255–260, 2008.

TSAKOVSKA, I.; PAJEVA, I.; AL SHARIF, M.; *et al.* Quantitative structure-skin permeability relationships. **Toxicology**, v. 387, n. March, p. 27–42, 2017.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, v. 2013, n. Table 1, 2013.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; Ian, M. Basic physiology of the skin. **Surgery**, v. 29, n. 10, p. 471–474, 2011.

VERRI, A. M.; MOURA, A. D. E. A.; MOURA, V. M. D. E. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. **Revista UNINGÁ Review**. v. 30, n.1, p.55-61, 2017.

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.

VIEIRA, T. G. **Avaliação do efeito cicatrizante de *Inga subnuda* e *Pseudopiptadenia contorta* em feridas cirúrgicas em coelhos**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2015.

VON LINSINGEN, L.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. Sinopse taxonômica da família Combretaceae R. Brown na Região Sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 3, p. 738–750, 2009.

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, p. 896, 2008.

ZEIGER, E; TAIZ, L. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 719, 2004.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P.E.; RICE-EVANS, Catherine. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 7, p. 838–849, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/UNICEF. *Primary health care: report of the International Conference on Primary Health Care*, Alma-Ata, URSS, 1978. Geneva,, p. 61., 1978.

XUE, D. Q.; WANG, J. D.; GUO, Y. W. A new sulphated nor-sesquiterpene from mangrove *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. F. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 10, n. 4, p. 319–321, 2008.

YAN, Wenxia; LIU, Hanping; DENG, Xiaoyuan; *et al.* Acellular dermal matrix scaffolds coated with connective tissue growth factor accelerate diabetic wound healing by increasing fibronectin through PKC signalling pathway. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 3, p. e1461–e1473, 2018.

ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351

fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 07 de junho de 2017.

Ofício nº 41/17

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

Para: **Prof.^a Terezinha Gonçalves da Silva**

Departamento de Antibióticos

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **23076.006034/2017-86**

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da atividade cicatrizante in vitro e in vivo do extrato hidroalcoólico de Laguncularia racemosa L.**”, registrada com o nº **23076.006034/2017-86**, sob a responsabilidade de **Prof.^a Terezinha 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 07/06/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril a novembro de 2017
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico
Nº de animais	96
Peso/Idade	200g-250g/ 60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Departamento de Ciências Farmacêuticas – CCS/UFPE

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584