



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

ANNELIESE GONÇALVES COSTA MARINHO

***RIZOPHORA MANGLE* E ÁCIDO TÂNICO:**

**UMA ASSOCIAÇÃO EM CREME PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS**

**Recife**

**2018**

**ANNELIESE GONÇALVES COSTA MARINHO**

***RIZOPHORA MANGLE* E ÁCIDO TÂNICO:  
UMA ASSOCIAÇÃO EM CREME PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS**

**Recife**

**2018**

ANNELIESE GONÇALVES COSTA MARINHO

***RIZOPHORA MANGLE* E ÁCIDO TÂNICO:  
UMA ASSOCIAÇÃO EM CREME PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS**

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

**Área de Concentração** :Morfotecnologia

**Orientador:** Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

**Coorientador(a):** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivone Antônia de Souza

**Recife**

**2018**

Catálogo na fonte  
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Marinho, Anneliese Gonçalves Costa

*Rizophora mangle* e ácido tânico: uma associação em creme para o tratamento de feridas / Anneliese Gonçalves Costa Marinho - 2018.

105 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Jeymesson Raphael Cardoso Vieira  
Coorientadora: Ivone Antônia de Souza  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em  
Morfotecnologia. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos

1. Cicatrização de feridas 2. *Risophora mangle* 3. Análise morfológica I. Vieira, Jeymesson Raphael Cardoso (orient.) II. Souza, Ivone Antônia de (coorient.) III. Título

615.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-074

ANNELIESE GONÇALVES COSTA MARINHO

***RIZOPHORA MANGLE* E ÁCIDO TÂNICO:  
UMA ASSOCIAÇÃO EM CREME PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS**

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

Aprovada em: 30/11/2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Ivone Antônia de Souza (orientadora)**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Eliete Cavalcanti da Silva ( Examinadora interna)**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Sandrine Maria de Arruda Lima ( Examinadora externa)**

*Dedico este trabalho a Deus ,por todas as graças alcançadas e aos meus familiares por me ajudarem a tornar esse sonho realidade.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida, pela sabedoria e força para concretização deste sonho. Agradeço imensamente pelas graças alcançadas ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, Fátima e Eliezer “In memoriam”, por sempre acreditarem no meu potencial e por terem contribuído para a construção do meu caráter e pelo amor e dedicação dados durante todo esse tempo. Não existem palavras para expressar a minha gratidão.

Ao meu esposo, Edson, por todo amor, paciência, apoio, compreensão que me ajudou e me aconselhou bastante durante os momentos de estresse. Você foi essencial nessa conquista, muito obrigada.

Aos Meus filhos, Felipe e Sarah pelo apoio, carinho e amor que sempre dispensam a mim sem medidas. Vocês me fazem muito feliz todos os dias.

Aos meus irmãos, Eliezer Júnior, Erick e Everson pelo apoio, amizade e carinho de sempre. Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador Jeymesson Vieira e à minha co-orientadora Ivone Souza, pela exemplar orientação, paciência, pela sinceridade, atenção e por todo o esforço e seriedade durante a orientação e correção deste trabalho, ajudando-me a conquistar mais essa etapa da minha vida. Vocês foram peças fundamentais para a realização desta pesquisa.

À Universidade Federal de Pernambuco, o Biotério do Departamento de Antibióticos CCS/UFPE, o Departamento de Histologia e Embriologia do CB/UFPE e o Laboratório de Cancerologia Experimental, por permitirem que eu realizasse esse sonho de conclusão do mestrado, pois possuem pessoas bem preparadas, equipamentos e materiais que viabilizaram o desenvolvimento do projeto.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, pela atenção dada e pelas aulas ministradas, que foram muito úteis para a concretização deste projeto.

Ao professor Danyel Perez, por toda disponibilidade e ajuda para o escaneamento das lâminas histológicas, que foi de extrema importância para a finalização desta pesquisa.

Agradeço carinhosamente a todos vocês, cada um foi extremamente importante para a concretização deste sonho, pois sem vocês não seria possível a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de mestrado, todos os outros colegas do PPGM, ao pessoal da secretaria do programa, bem como aos colegas de outros laboratórios por dividirem comigo momentos de alegrias e também momentos difíceis, e também disponibilidade em ajudar sempre que precisei. Obrigada! Foi muito bom contar com vocês!

Reconhece-o em todos os teus caminhos, e  
Ele endireitará as tuas veredas.

Provérbios 3: 6



## RESUMO

Os manguezais são áreas ricas em recursos economicamente importantes, explorados pela população costeira humana. *Rizophora mangle* (Rhizophoraceae) é uma das espécies encontradas em manguezais e utilizada na medicina popular para o tratamento da diarreia, cicatrização, antiinflamatória. O ácido tânico que também é um componente encontrado na natureza é popularmente utilizado como antioxidante, adstringente, bactericida, cicatrizante. Este trabalho teve como objetivo investigar a atividade antibacteriana da associação do extrato aquoso de folhas de *R. mangle* (EAF *Rm*) associado ao ácido tânico a 5%. Foi um estudo que induziu a ferida de primeira intenção a avaliar o potencial de cicatrização quando tratado com algumas drogas, tais como: NACL, creme de lannete a 4%, dexpanthenol a 5% e o creme de combinação descrito acima (EAF *Rm*). O material botânico foi coletado no manguezal da cidade de Itamaracá, distrito de Vila Velha no estado de Pernambuco, autorizado pelo Controle de Poluição Ambiental e Administração de Recursos Hídricos (CA DFRB nº 120 / 2014º). O extrato foi preparado por esmagamento de folhas frescas e a infusão foi preparada com água destilada (40 ° C por 10 minutos) e filtrada. Foi então removido para L101 da marca Liobrás. Após este procedimento, o resíduo do extrato seco foi armazenado a 5°C. O ácido tânico (250 g) foi obtido como pó solúvel em água com teor de ácido gálico (base seca) máx. 3,0% / Densidade 0,35 0,45 g / cm<sup>3</sup> / pH (1% em água) 3,0 4,0 / Solubilidade (20% em água). O creme foi produzido a 5% incorporado no extrato de *Rizophora mangle* ao ácido tânico. Vinte ratas wistar (*Rattus norvegicus*) foram selecionados em 8 semanas, os quais foram divididos em 5 grupos distintos. A indução de feridas cutâneas foi tratada e observada através de exame clínico, análise morfométrica e análise histomorfométrica. Após o procedimento, foi realizada análise morfométrica e histomorfométrica. Dentre os grupos avaliados, foi demonstrado que a associação do EAF *Rm* com ácido tânico a 5% apresentou um grau de retração e reepitelização com maior potencial de cicatrização quando comparado aos demais grupos. a importância da realização histomorfométrica na correlação com os achados encontrados. A associação de EAF *Rm* ao ácido tânico em creme a 5% apresentou atividades anti inflamatória e antibacteriana eficazes para o tratamento de feridas epidérmicas com graus de retração e reepitelização em alto potencial cicatrizante.

Palavras-chave: Análise Histomorfométrica. Análise Morfométrica . Poder Cicatrizante.  
*Rizophora mangle*.

## ABSTRACT

Mangroves are areas rich in economically important resources exploited by the human coastal population. *Rizophora mangle* (Rhizophoraceae) is one of the species found in mangroves and is used in folk medicine for the treatment of diarrhea, healing, anti-inflammatory. Tannic acid which is also a component found in nature is popularly used as antioxidant, astringent, bactericidal, cicatrization. This study aimed to investigate the antibacterial activity of the association of aqueous extract of leaves of *R.mangle* (EAFRm) associated with tannic acid to 5%. It was a study that induced the first-intention wound to evaluate the healing potential when treated with some drugs, such as: NaCl, 4% lannete cream, 5% dexpanthenol and the combination cream described above (EAFRm). The botanical material was collected in the Mangrove of the city of Itamaracá, Vila Velha district in the state of Pernambuco - Brazil, authorized by the Environmental Pollution Control and Water Resources Administration (CA DFRB No. 120 / 2014°). The extract was prepared by crushing fresh leaves and the infusion was prepared with distilled water (40 ° C for 10 minutes) and filtered. It was then removed to L101 from the Liobrás brand. After this procedure, the dried extract residue was stored at 5 ° C. Tannic acid (250 g) was obtained as water-soluble powder with gallic acid content (dry basis) Max. 3.0% / Density 0.35 0.45 g / cm<sup>3</sup> / pH (1% in water) 3, 0 4.0 / Solubility (20% in water). The cream was produced at 5% incorporated into the extract of *Rizophora mangle* to tannic acid. Twenty wistar rats (*Rattus norvegicus*) were selected at 8 weeks, which were divided into 5 distinct groups. The project was approved by the Ethics Committee. The induction of cutaneous wounds were treated and observed through clinical examination, morphometric analysis and histomorphometric analysis. After the procedure, morphometric and histomorphometric analysis was performed. Among the groups evaluated, it was demonstrated that the association of EAFRm with tannic acid at 5% showed a degree of retraction and reepithelization with a greater healing potential when compared to the other groups. the importance of the histomorphometric realization in the correlation with the found findings. The association of EAF Rm to tannic acid in 5% cream showed effective anti-inflammatory and antibacterial activities for the treatment of epidermal wounds with degrees of retraction and reepithelialization in high healing potential.

**Keywords:** Histomorphometric Analysis. Morphometric Analysis. *Rizophora mangle*. Wound Healing.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Mapa ilustrativo das áreas de mangue no Brasil e no Mundo.....	23
<b>Figura 2-</b> Cascata de Inflamação.....	27
<b>Figura 3-</b> Fases da Cicatrização.....	28
<b>Figura 4-</b> Gráfico de número de células em cada fase da cicatrização.....	29
<b>Figuras 5A, 5B,5C-</b> Ilustrações do mangue da Ilha de Itamaracá.....	40
<b>Figura 6-</b> Liofilizador.....	42
<b>Figura 7-</b> Creme.....	43
<b>Figura 8-</b> Análise morfométrica com utilização de paquímetro.....	46
<b>Figura 9A,9B,9C,9D-</b> Análise histomorfométrica com 10 dias.....	56
<b>Figura 10A,10B,10C,10D-</b> Análise histomorfométrica com 15 dias.....	60

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1-</b> Avaliação cicatricial.....	53
<b>Tabela 2-</b> Análise morfométrica.....	54
<b>Tabela 3-</b> Grau de percentual de reepitelização com 10 dias de tratado.....	59
<b>Tabela 4-</b> Grau de percentual de reepitelização com 15 dias.....	63

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-</b> Grau de percentual de reepitelização com 15 dias.....	55
<b>Gráfico 2-</b> Grau de retração do Grupo I em 5,10 e 15 dias .....	64
<b>Gráfico 3-</b> Grau de retração do Grupo II em 5,10 e 15 dias.....	65
<b>Gráfico 4-</b> Grau de retração do Grupo III em 5,10 e 15 dias.....	66
<b>Gráfico 5-</b> Grau de retração do Grupo IV em 5,10 e 15 dias.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

COX -1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
Cm <sup>2</sup>	Centr�metro quadrado
cm	Centímetro
EAF <i>R.mangle</i>	Extrato Aquoso de Folhas de <i>Rizophora mangle</i>
EGF	Fator de crescimento epidermal
GSH	Grupamentos sulfidrílicos
HSP-70	Chaperona-70
MEC	Matriz Extra Celular
�m	Micr�metro
NO	�xido nítrico
PGE2	Elevação dos níveis de prostaglandina 2
GR	Enzima glutathiona redutase
GPx	Enzima glutathiona peroxidase
LPO	Peroxidação lipídica
MPO	Enzima mieloperoxidase
PCNA	Antígeno de proliferação celular nuclear
SOD	Enzima superóxido dismutase



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
2.1 MANGUEZAL.....	22
2.2 CICATRIZAÇÃO.....	24
2.2.1 Etapas na resolução de uma ferida.....	30
2.2.2 Fase inflamatória.....	30
2.2.3 Fase de proliferação celular.....	32
2.2.4 Fase de formação do tecido conjuntivo.....	33
2.2.5 Fase de contração.....	34
2.2.6 Fase de remodelação.....	34
2.2.7 Fatores que influenciam a cicatrização de feridas.....	34
2.3 <i>Rizophora mangle</i> .....	35
2.4 <b>ÁCIDO TÂNICO.....</b>	<b>37</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	40
4.2 OBTENÇÃO DO ÁCIDO TÂNICO.....	41
4.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO.....	42
4.4 OBTENÇÃO DO CREME.....	43
4.5 ANIMAIS.....	44
4.5.1 Importância do placebo para a presente pesquisa.....	44
4.6 ASPECTOS BIOÉTICOS.....	44
4.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE.....	45
4.7.1 Análise morfométrica.....	46

4.8 REMOÇÃO DA CICATRIZ E ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	47
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
6 RESULTADOS.....	49
6.1 AVALIAÇÃO CICATRICIAL.....	52
6.2 ANÁLISES MORFOMÉTRICA E HISTOMORFOMÉTRICA.....	54
7 DISCUSSÃO.....	68
8 CONCLUSÃO.....	75
9 PERSPECTIVA.....	76
10 REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO A AUTORIZAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DE <i>R.mangle</i>	82
ANEXO B PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS.....	83
ANEXO C SUBMISSÃO DO ARTIGO PARA A REVISTA MIOC.....	84

## 1 INTRODUÇÃO

Nas costas equatoriais controladas pela maré, os manguezais são abundantes e apresentam grande importância ecológica e também econômica.

Os sedimentos, invertebrados bentônicos e vegetação estão intimamente relacionados no ambiente de mangue e interagem de forma harmônica, sendo desta forma essencial que sua plantação seja estudada de forma a conhecer sua relação com os outros seres vivos que se encontram neste ambiente e também sua importância para a comunidade que se utiliza dos recursos do manguezal seja de forma direta ou indireta.

(ABEYSINGHE, P.D., 2010).

A indústria de fitoterápicos no Brasil tem sido um desafio a ser vencido, pois representa uma excelente alternativa para a área de saúde por tratar-se de matéria prima de baixo custo, recurso renovável, acessibilidade para a população como um todo. Se faz necessário que haja cada vez mais estudos e pesquisas para que se conheçam os metabólitos secundários de plantas medicinais para que haja eficácia e segurança na sua aplicação como medicamento sem que coloque em risco a vida das pessoas que utilizam tais fitoterápicos (BRAS-FILHO, 1994). Os serviços farmacêuticos na atenção primária à saúde objetivam garantir uma atenção integral, contínua e compatível à saúde da população, sendo os medicamentos um dos elementos essenciais. Como parte do direito constitucional à saúde, os serviços farmacêuticos do Sistema Único de Saúde (SUS) compreendem atividades administrativas para garantir a disponibilidade adequada de medicamentos, sua qualidade e conservação, além de serviços de assistência, com foco na eficácia terapêutica e segurança (CAÑIGUERAL, et.al 2003).

Os compostos do metabolismo secundário são usualmente classificados de acordo com a sua rota biossintética. As principais famílias de moléculas geralmente consideradas são: os compostos fenólicos, terpênicos, esteróides, e os alcalóides. (HARBONE, 1999; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

A função dos compostos fenólicos está envolvida com a síntese das ligninas que são comuns a todas as plantas superiores, atrativos aos seres humanos devido ao odor, sabor e coloração agradáveis, mas também para outros animais, os quais são

atraídos para polinização ou dispersão de sementes. Além disso, esse grupo de compostos é importante para proteger as plantas contra os raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias (CROTEAU *et al.*, 2000). Os perfis fenólicos são propostos como importantes marcadores que podem se tornar uma ferramenta útil para o controle de qualidade da origem botânica de preparados medicinais à base de plantas, com base nas espécies analisadas(ÁVILA-REYES *et.al.*,2018)

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.No início da década de 1990,a Organização Mundial de Saúde OMS) divulgou que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos da saúde .

Ao longo do tempo têm sido registrados vários procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais.Apesar da grade evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX ,existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes,que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos .Estes motivos ,associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais ,contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento(JÚNIOR *et.al*,2005). No Brasil,as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas,propagadas por usuários ou comerciantes .Muitas vezes essas plantas são ,inclusive empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas.Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais,a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial.Isto,entretanto,não é verdade .A toxicidade de plantas é um problema sério de saúde pública .Os efeitos adversos dos fitomedicamentos ,possíveis adulterações e toxidez ,bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas ),ocorrem comumente(JÚNIOR *et.al*,2005).É por este motivo que este trabalho ressalta a importância da pesquisa em medicamentos fitoterápicos para que haja segurança na administração dos mesmos pela população de um modo geral.

A partir do conhecimento de que os metabólitos secundários dos vegetais estão diretamente relacionados com a sua defesa contra a herbivoria, são divididos em grupos específicos de acordo com a sua origem biossintética. São classificados em terpenos, fenóis e alcaloides. Dentre os fenóis, encontramos os taninos que neste estudo, apresentou-se como alvo de pesquisa.

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

Os taninos são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os dois principais hidrolisáveis são os galotaninos e os elagitaninos. Os condensados são conhecidos como protoantocianidinas. Algumas espécies de plantas podem conter até 50% de tanino em material jovem seco; e em geral a maior concentração ocorre nos caules. (CANNAS, 2008). Eles são conhecidos por suas atividades antimicrobianas, além de relatos de agirem sobre o metabolismo do ácido araquidônico em leucócitos com papéis importantes nas inflamações (OKUDA, 2005) e são utilizados em tratamentos que promovem a cicatrização de feridas (PERERA et al., 2001; OFORI-KWAKYE et al., 2011).

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

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

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

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

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

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MANGUEZAL

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

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

Trata-se, mundialmente, de um ambiente diferente do marinho e do terrestre. O manguezal compreende plantas de ocorrência única que produzem metabólitos secundários com características químicas particulares que ainda são pouco conhecidas, o que sugere a possibilidade de abrigarem novos compostos com atividade biológica e dar suporte ao surgimento de novas drogas tanto de origem natural, como semissintéticas ou servirem de base para a produção de drogas sintéticas (BANDARANAYAKE, 2002).

Provavelmente, não há outro grupo de plantas com adaptações morfológicas e fisiológicas altamente desenvolvido com tais condições extremas como as plantas que são encontradas nas áreas de mangue. Para prosperar nestes ambientes hostis, alterações nos seus processos fisiológicos ocorreram, resultando na síntese de novos compostos químicos. (BANDARANAYAKE, 1998; REYES; CISNEIROS-ZEVALLOS, 2003; EDREVA, et al., 2008).

Figura 1 Mapa Ilustrativo das áreas de mangue no Brasil e no Mundo



Fonte: BVMABF,2015

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

O estado de Pernambuco, devido a sua posição geográfica, apresenta uma das menores faixas litorâneas da costa brasileira. Uma área de 23.973 hectares é ocupada por mangue, e a maioria encontra-se localizado nos municípios de Goiana, Igarassu, Itamaracá e Itapissuma;



nas margens do Canal de Santa Cruz (7° 40' S e 7° 50' S de Latitude; 34° 50' e 34° 54' de Longitude) (BARROS, *et al.*, 2000).

## 2.2 CICATRIZAÇÃO

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

A cicatrização de feridas, pode comprometer parte ou todo o tecido e ocorrem de forma perfeita e coordenada eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e reconstituição dos tecidos. Esse processo dinâmico envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que são construídos de forma harmoniosa para que restauração tissular seja o mais perfeita possível (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003).

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

Os processos de inflamação e cicatrização apresentam grande importância para a avaliação da evolução da ferida, uma vez que o tipo de procedimento adotado e a escolha do fármaco administrado na ferida para o tratamento da mesma, determinarão como a lesão irá se comportar na fase de reparação (CÂNDIDO, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2001).

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

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

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

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

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

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

Apesar do reparo tecidual ser uma evolução do próprio organismo para resolução da ferida, muitas necessitam de cuidados especiais para a cura adequada. Isso pode incluir tempo

e diferentes alternativas medicamentosas e cirúrgicas, dependendo da etiologia e das características da ferida (ARONS et al., 1992; DE MORAES et al., 1998; CURRIE et al., 2001; PETROIANU et al. 2001).

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

## CASCATA DE INFLAMAÇÃO

A figura 2 demonstra o processo da cascata de inflamação ou cascata do ácido araquidônico que consiste numa ação que desencadeia o aparecimento dos mastócitos para que haja produção dos mediadores inflamatórios

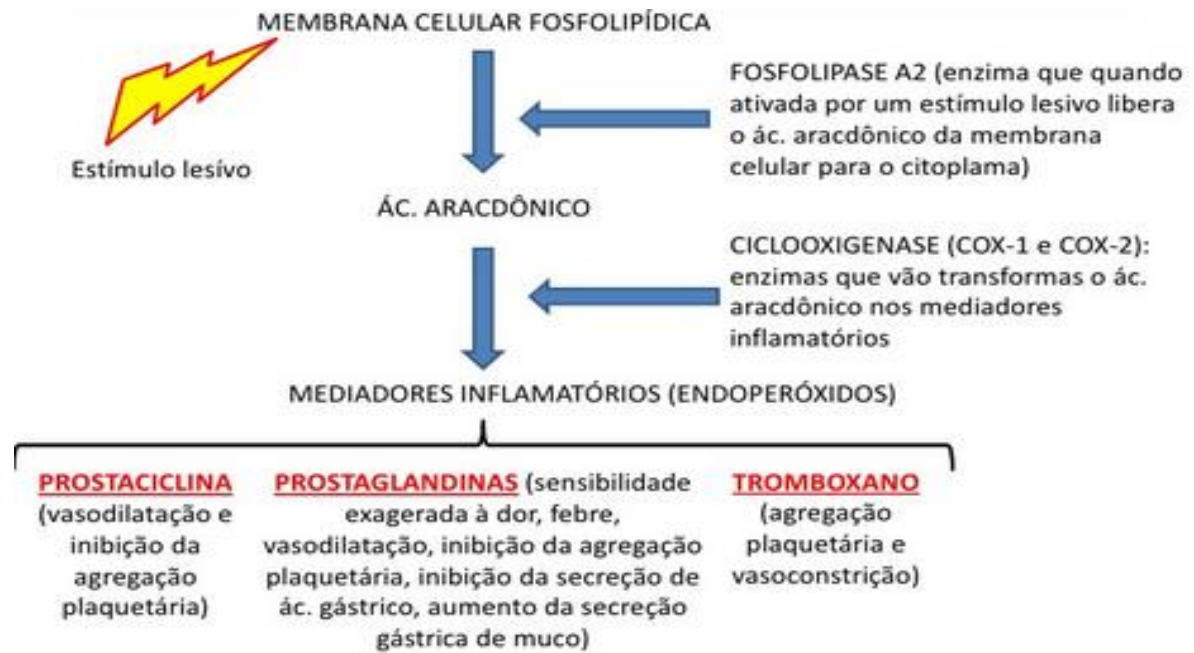


Figura 2 Cascata de Inflamação

Fonte: CAMPOS et al. 2007. **Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares: parte I.** Anais Brasileiro de Dermatologia. **78** (5), 525-542.

## FASES DA CICATRIZAÇÃO

A Figura 3 mostra as fases da cicatrização que vai desde a hemostasia até o processo cicatrizatório completo com a maturação do tecido



Figura 3: Fases da Cicatrização

**Fonte:** CAMPOS et al. 2007, MANDELBAUM, S.H., DI SANTIS, E.P., MANDELBAUM, M.H.S. (2003)  
**Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares: parte I.** Anais Brasileiro de Dermatologia. **78** (5), 525-542.

## GRÁFICO COM NÚMERO DE CÉLULAS EM CADA FASE DA CICATRIZAÇÃO

A Figura 4 mostra o gráfico que representa em cada fase da cicatrização a quantidade e o tipo de célula que aparece com maior frequência em cada fase da cicatrização

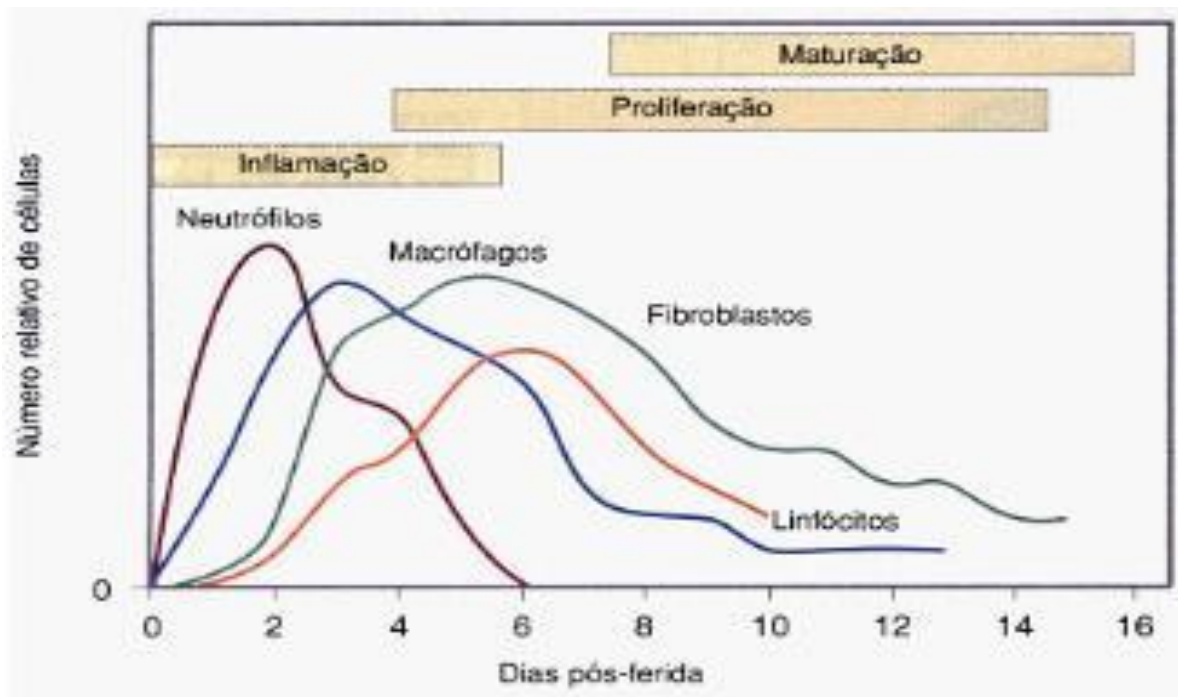


Figura 4 Gráfico de número de células em cada fase da cicatrização

**Fonte:**CAMPOS et al. 2007.**Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares: parte I.** Anais Brasileiro de Dermatologia. **78** (5), 525-542.

A ferida pode apresentar espessura parcial, cuja reparação dá-se por reepitelização, resultando em uma cicatriz quase imperceptível, como exemplo deste tipo de ferida, pode ser citada a dermoabrasão. A ferida de espessura total, em que demanda a formação de um tecido novo ou tecido de granulação, onde ocorre a cicatrização desde a derme total até o tecido subcutâneo. A epitelização, base da cicatrização nas feridas de espessura parcial, acontece apenas nas margens da ferida. No caso referido, a cicatriz é bem perceptível e saliente (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Os autores mencionados neste estudo enfatizam que o processo cicatricial depende de fatores diversos, como: Localização anatômica, tipo de tecido interessado para estudo, metodologia cirúrgica empregada. Outro fator relevante para o processo de cicatrização é a idade do indivíduo.

### 2.2.1 Etapas na Resolução de uma Ferida

A cicatrização de feridas envolve processos diversos. Através da indução de um processo inflamatório agudo pelo ferimento ocasionado, ocorre a regeneração de células parenquimatosas, a migração e a proliferação de tecidos parenquimatosos e conjuntivos, a síntese de proteínas da matriz extracelular, o remodelamento do tecido conjuntivo e dos componentes parenquimatosos, a colagenização e a aquisição de força da ferida. O processo inflamatório compreende três etapas: Inflamação, reparação e deposição de matriz extracelular e remodelação (WEISSMAN, 1992).

### 2.2.2 Fase Inflamatória

A inflamação apresenta quatro processos: Rubor, tumor, calor e dor e, segundo Virchow, ainda há um quinto sinal: A perda da função. A inflamação atua bloqueando, diluindo ou destruindo o seu agente agressor, substituindo o tecido agredido pela regeneração das células parenquimatosas nativas, bem como pelo preenchimento de tecido fibroblástico, reconstituindo e cicatrizando o tecido lesado (MAJNO, 1992). As células do tecido conjuntivo envolvidas na resposta inflamatória são os mastócitos, fibroblastos, macrófagos e linfócitos residentes. As células circulantes incluem neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas (KOHN, 1992).

A inflamação pode apresentar padrões agudos e crônicos. A inflamação aguda apresenta uma resposta imediata e inicial a um agente agressor com uma duração relativamente curta e apresenta características exsudativas de líquidos e de proteínas

plasmáticas e a migração de leucócitos e neutrófilos(COTRAN,KUMAR,COLLINNS,1993).Para que os leucócitos possam alcançar o interstício ,é preciso que haja adesão ao endotélio e transmigração ,conhecida como diapedese.As seletinas e as imunoglobulinas são receptores de adesão presentes no endotélio.As integrinas são moléculas encontradas nos leucócitos .Mediadores como histamina ,trombina e o fator de ativação plaquetário ,PAF),redistribuem as moléculas de adesão na superfície celular endotelial .As citocinas interleucina1 ,IL-1)e o fator de necrose tumoral ,TNF)ou caquexia induzem à síntese e à expressão de moléculas de adesão endotelial.Após atravessarem as junções edoteliais,os leucócitos têm que atravessar a membrana basal ,provavelmente com a secreção de collagenase para degradá-la.Após a diapedese ,os leucócitos emigram de tecidos para o local no qual existam substâncias quimiotáticas .Existem vários mediadores químicos endógenos.Os agentes endógenos mais comuns são os produtos bacterianos, (COTRAN;KUMAR;COLLINS,1993).

Durante o processo inflamatório agudo,ocorrem fenômenos vasculares que são caracterizados pela dilatação arteriolar e abertura de leitos capilares culminando para o aumento do fluxo sanguíneo rumo à região agredida .Este líquido extravascular,o exsudato é rico em proteínas(WEISSMAN,1992).Se por um lado ,a inflamação aguda se manifesta por alterações vasculares,edema e infiltração basicamente neutrofílica;a inflamação crônica apresenta longa duração,ocorrendo fenômenos como infiltração de células mononucleares que incluem macrófagos ,linfócitos e plasmócitos ,destruição tecidual ,proliferação de pequenos vasos sanguíneos e fibrose(MAJNO,1992).

A fase inflamatória inicia-se imediatamente após a injúria.Quando ocorre o ferimento,a lesão dos vasos produz como resposta do organismo frente a este evento ,a hemostasia que consiste em vasoconstricção e formação do coágulo que auxilia na aproximação das bordas lesionadas e na formação de uma matriz ,onde ingressam fibroblastos,células endoteliais e queratinócitos (HOM,1993).

A parada do sangramento precede a vasodilatação ,mediada por várias substâncias ,dentre as quais,histamina,serotonina,bradicinina,prostaglandinas e óxido nítrico que permitem um aumento do fluxo sanguíneo para a área do ferimento ,causando calor e



rubor, transportando desta forma mais nutrientes, células reparadoras e oxigênio para o interstício, aumentando a pressão osmótica. Como a vasodilatação aumenta a pressão hidrostática, ocorre uma fuga de líquidos para o meio extravascular. O conjunto destes fenômenos faz com que ocorra o edema local (MAJNO, 1992). Dois dias após a lesão, ocorre afluxo de neutrófilos para a ferida que apresenta tecido desvitalizado, coágulo, bactérias e proteínas séricas extravasadas. Os neutrófilos são responsáveis pelo debridamento das superfícies da ferida e de tecidos desvitalizados, fagocitose de partículas antigênicas e de corpos estranhos e liberação de grânulos para a rede de fibrina, provocando hidrólise enzimática da matriz extracelular. Estes eventos descritos anteriormente visam à promoção da limpeza da área lesada e o início da fase seguinte. Durante os dois ou três dias seguintes, as células que predominam são os macrófagos, já que têm função fagocitária e são provenientes da migração e diapedese dos monócitos circulantes ou são residentes do próprio tecido. Linfócitos também aparecem no local da lesão, porém em menor número e é provável que estejam relacionados aos processos inflamatórios crônicos (WITTE, BARBUL, 1997).

### 2.2.3 Fase de Proliferação Celular

A angiogênese, surgimento de novos vasos a fim de refazer as circulações locais para oxigenar e nutrir a ferida, diante da hipóxia e diminuição do Ph no centro da lesão, é caracterizada como evento fundamental para que os macrófagos façam uma interação com os tromboxanos e as prostaglandinas, produzindo o fator quimiotático, atraindo as células meso e endoteliais (WITTE, BARBUL, 2002; MAJNO, 1992).

Entre o segundo ou terceiro dia, após o trauma, começa a ocorrer a reparação tecidual conjuntiva a partir da migração e divisão das células endoteliais e a formação do tecido de granulação constituído por colágeno, fibronectina e ácido hialurônico, com uma densa infiltração de macrófagos, células endoteliais capilares e, principalmente, fibroblastos. As primeiras fibras de colágeno produzidas pelos fibroblastos surgem por volta do quarto ou quinto dia e o espaço da ferida é preenchido por feixes aleatórios que apresentam a função de dar origem a uma estrutura densa e consistente para unir os tecidos lesados de forma mais

firme e uniforme(MAJNO,1992)e por volta do décimo dia do pós-operatório ,ocorre o aparecimento de metade do número total de células para aquele local lesionado.

De duas a três semanas , ocorre uma diferenciação no tecido de granulação ,uma célula que possui características ultra-estruturais ,reduzindo a área cruenta da ferida e facilitado desta forma,a reepitelização(WITTE,BARBUL,1997;DORNELES,2000).

De grande importância,o processo de epitelização oferece ao organismo uma dupla proteção a partir do meio interno ,contra as perdas de fluidos ,eletrólitos e proteínas e impede também a penetração de agentes infecciosos na pele .A nível de pele,a epiderme,transforma-se numa camada mais espessa e as células basais que apresentam bordas ricas em fibroblastos e célula muscular lisa, denominada miofibroblasto, confere a capacidade contrátil do tecido que não se divide até que esta seja restaurada e ocorra a continuidade epidérmica.A migração celular está diretamente relacionada ao tipo de matriz ,tensão de oxigênio e presença ou não de infecção.

As células basais que ficam próximas à borda cortada da ferida continuam a se diferenciar e suas células-filhas achatam-se e migram sobre a matriz da ferida como uma lâmina.Essa proliferação celular ,iniciada após a migração ,é máxima entre 48 h e 72 h após a lesão .O estágio final de reepitelização é a maturação de células epidérmicas .Em torno do décimo dia ,ocorre o aparecimento do extrato córneo,que comumente ,é mais espesso que o da pele sem lesão(WITTE,BARBUL,1997;YOUNG,2001;WITTE,BARBUL,2002).

#### 2.2.4 Fase de Formação do Tecido Conjuntivo

A formação do tecido de granulação se inicia a partir do terceiro ou quarto dia após injúria tecidual e esta é mantida até que a reepitelização esteja completada .O fibroblasto produz o colágeno fibrilar sintetiza elastina,fibronectina,glicosaminoglicanas e proteases ,como a collagenase ,importante para o desbridamento e o remodelamento (VA WINKLE,1967).

A pele normal e uma cicatriz madura contém colágeno dos tipos I e III,com predomínio do tipo I .Contrariamente ,o tecido de granulação é amplamente composto por colágeno tipo III (GABBIANNI,LELOUS,BAILEY,1976 ).É sobre a fibronectina sintetizada pelos miofibroblastos que as fibras de colágeno tipo III repousarão.O colágeno tipo IV está

intimamente envolvido na fase de remodelação da cicatrização de feridas e no estabelecimento de uma junção dermoepidérmica funcional .O colágeno tipo VI é sintetizado por fibroblastos da pele e possui qualidades adesivas tissulares únicas (OLSEN et al.,1989).O colágeno tipo VII é de extrema importância o estabelecimento e na manutenção de uma junção dermoepidérmica funcional (MCGRATH,ISHIDA-YAMANO, O'GRADY,1993;BURGESON et al.1994).

#### 2.2.5 Fase de Contração

A contração da ferida é o processo pelo qual as feridas abertas fecham por movimento das margens em direção ao centro ,cerca de quatro dias após a interrupção da integridade da pele (WITTE,BARBUL,1997).A velocidade da contração da ferida não é a mesma em todos os pontos e o restabelecimento da integridade física não constitui um estímulo que faça cessar a contração .Descartou-se a ideia de que a desidratação do tecido seja responsável pela contração e que a síntese do colágeno e a contração da ferida poderiam ser os responsáveis pela aproximação e união das bordas da ferida.

O mecanismo de contração que diminui a lesão é gerado por forças celulares e elementos contráteis de fibroblastos e miofibroblastos com uma reorganização concomitante do citoesqueleto (COHEN,DIEGELMAN,LINDBLAD,1992 ).

#### 2.2.6 Fase de Remodelação

A remodelação da cicatriz se inicia normalmente em torno da terceira semana após a ocorrência do trauma e pode persistir por meses ou anos .Nesta fase ,se observam modificações no tecido conjuntivo,principalmente na matriz extracelular ,ocorrendo a metabolização do excesso de ligações mais estáveis entre as fibras protéicas que tem a função de promover uma maior resistência mecânica na parte lesionada. Este processo ocorre devido a ação de enzimas preteolíticas que metabolizam o excesso de ligações mais estáveis. Ocorre também nesta mesma área uma diminuição da vascularização (WITTE,BARBUL,1997;YOUNG,2001;DORELES,2000)

#### 2.2.7 Fatores que Influenciam a Cicatrização de Feridas

Os eventos que ocorrem próximos ou sobre a cicatrização de feridas ,como:Técnica cirúrgica,formação de hematomas,infecção ,reação de corpo estranho,condições de base

,drogas localização e dissecação podem ter grande influência no grau de cicatrização (SAARIALHO-KERE,CHANG,WELGUS,1992).

Durante a técnica cirúrgica ,a manipulação rude da pele por causa da inexperiência e do uso de instrumentação inapropriada podem levar à formação de crostas,descamação da pele ,desvitalização do tecido,aumento da reação inflamatória ao redor da ferida ,promovendo um local ideal para infecção bacteriana secundária .Por outro lado ,ferimentos fechados com material de sutura relativamente inapropriados podem levar à reação de corpo estranho ,inflamação persistente,necrose e infecção secundária(EVENSON,GREEVER,CRAWLEY,1965;BORGES,ALEXANDER,1978).

Finalmente, é essencial que o cirurgião escolha o instrumental cirúrgico que vai minimizar o dano da pele .As proteínas desnaturadas e os debris necróticos prolongam o estágio de inflamação na cicatrização de feridas .A cirurgia com o uso de bisturi minimiza o dano à pele e deve ser realizada sempre que possível (ANGEL,NARAYANA,SWARTZ,1986;YOUNG,2001). Infecção bacteriana da ferida é a causa local mais comum de uma cicatrização prolongada ,todas as feridas são contaminadas pós-operatoriamente pela flora bacteriana residente.

### 2.3 *Rizophora mangle*

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

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

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

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

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

Extratos de *R. mangle* L. possuem efeitos benéficos diversos sobre órgãos do sistema digestivo avaliados em trabalhos anteriores. De uso tradicional na medicina como antiulcerogênica, teve esta aplicação popular confirmada pelos estudos de DE-FARIA *et al.* (2012) por meio da elevação dos níveis de prostaglandina 2 (PGE<sub>2</sub>), “*up regulation*” da ciclooxygenase 2 (COX-2) e do fator de crescimento epidérmico (EGF). O resultado foi um efeito citoprotetor, antissecretório e cicatrizante sobre a mucosa gástrica o que coloca esta planta como uma possível opção terapêutica ao tratamento da úlcera gástrica e de baixa toxicidade.

A capacidade adstringente e de precipitação de proteínas resulta em inibição do trânsito intestinal e consequente atividade antidiarréica. Em sua composição, o extrato aquoso do caule revelou uma elevada composição de ácidos graxos de cadeia longa e insaturados, representados principalmente pelo ácido palmítico e ácido oléico (PERERA *et al.*, 2010).

Devido a estas e outras ações biológicas demonstradas tanto *in vitro* quanto *in vivo* torna-se necessário conhecer os efeitos toxicológicos desta planta para viabilizar suas aplicabilidades.

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

## 2.4 ÁCIDO TÂNICO

O ácido tânico tem em sua composição os taninos que são compostos polifenólicos capazes de construir estruturas químicas muito complexas. O ácido tânico, que tem uma fórmula química estimada  $C_{76}H_{52}O_{46}$ , é uma forma comercial de taninos. Há 300 anos, os egípcios extraíam esses compostos e os usavam como agentes de curtimento. Devido a sua capacidade de curtimento, esses compostos eram muito importantes em nível industrial e em curtumes. Embora hoje em dia sais e taninos sintéticos tenham adquirido maior importância contra os taninos extraídos de fontes naturais (MATAMALA, et al., 1994; HASLAM, 1996).

Nas últimas duas décadas, o isolamento e a determinação estrutural de muitos tipos de taninos, que também incluem taninos hidrolisáveis e condensáveis, foram possíveis usando técnicas como UV-visível, ressonância magnética nuclear (RMN de  $^1H$ , RMN de  $^{13}C$ ), espectroscopia de massa (ISAZA, et al., 2004; MEAGHER, et al., 2004) e em breve.

De acordo com suas diferenças estruturais entre muitas espécies de taninos, alguns pesquisadores têm utilizado esses compostos para diferentes aplicações dentro dos quais são encontrados como fungicidas, antibióticos e antioxidantes (SCHOFIELD, et al., 2001; LATTE e KOLODZIEJ, 2004).

A propriedade antioxidante dos taninos tem despertado interesse especial na área de corrosão, devido ao fato destes compostos poderem inibir a corrosão em metais quando estes são incorporados em revestimentos. Pode encontrar na literatura muitas pesquisas sobre

a inibição da corrosão utilizando ácido tânico ou taninos extraídos, isto é, de espécies de pinheiro, mimosa e acácia (JAÉN, et al., 2003; HERNES, et al., 2004).

O efeito antioxidante desses compostos de polifenóis é atribuído à sua ação quelante sobre os metais de transição e sua capacidade de anexar radicais livres através da síntese de estruturas menos reativas, como mostra Iglesias et al. (2001). Vale a pena mencionar que a extração de taninos da casca das árvores oferece um valor extra para as cascas, o que é considerado em muitos lugares como um desperdício. Mesmo quando a fórmula dos taninos varia entre as espécies arbóreas, os taninos apresentam estruturas similares às do ácido tânico, por isso a elucidação e comparação entre estes compostos é importante.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar o potencial cicatrizante da associação do extrato aquoso de folhas de *Rizophora mangle* e ácido tânico em creme a 5% no reparo tecidual de feridas cutâneas em ratos wistar.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

Descrever aspectos macroscópicos das feridas cutâneas nos grupos de animais submetidos ao soro fisiológico, dexpanenol a 5% em creme e extrato aquoso de *Rizophora mangle* associado ao ácido tânico a 5% em creme;

Analisar morfometricamente a área da cicatrização e calcular o grau de contração de feridas cirúrgicas em ratos wistar tratados com a associação do extrato aquoso de *Rizophora mangle* e ácido tânico em creme a 5%;

Analisar histomorfometricamente a reepitelização das feridas cutâneas em ratos wistar após a aplicação do extrato aquoso de *Rizophora mangle* e ácido tânico em creme a 5%.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas da *Rhizophora mangle* foram coletadas no mangue do município de Itamaracá-PE, distrito de Vila Velha com 7° 40' de latitude sul e 34° 50' longitude oeste (BARROS *et al.*, 2000). Uma exsicata foi identificada pela bióloga Marlene Barbosa e encontra-se no Herbário da UFPE sob número UFP. 69.655. A coleta foi autorizada pelo Companhia Pernambucana de Controle da Poluição Ambiental e de Administração de Recursos Hídricos sob número autorização CA DRFB N° 120/2014 (Anexo A).

A)



B)



C)



Fonte: Barros *et al.*, 2000.

Figuras 5 A ,5 B e 5 C Ilustrações do mangue da Ilha de Itamaracá .  
Fontes: BARROS , et al.2002

## 4.2 OBTENÇÃO DO ÁCIDO TÂNICO

A obtenção do ácido tânico (250g) foi realizada comercialmente em forma de pó hidrossolúvel com teor de ácido gálico (base seca) Max. 3,0%/ Densidade 0,35 0,45g/cm<sup>3</sup>/ pH (1% em água) 3,0 4,0/ Solubilidade (20% em água) .

#### 4.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO

O extrato aquoso de folhas de *Rizophora mangle* foi preparado por trituração de 1 quilo de folhas frescas ,colocadas para secagem e depois, submetidas à infusão com água destilada (40° C por 10 minutos), e filtrado. Em seguida, o solvente foi removido em liofilizador L101 da marca Liobrás (MCCLLOUD *et al.*, 1988; LEITE, 2003). Após a liofilização, o resíduo seco do extrato foi armazenado a 5°C.A liofilização foi realizada para que o pó fosse misturado ao pó de ácido tânico e misturados à base creme para a obtenção do mesmo.

Figura 6 Liofilizador utilizado na obtenção dos extratos de *R. mangle*



Figura 6 Liofilizador

Fonte: MCCLLOUD *et al.*, 1988; LEITE, 2003

#### 4.4 OBTENÇÃO DO CREME

O creme foi produzido a 5% em uma associação de *Rizophora mangle* (2,5%) ao ácido tânico (2,5%). com a utilização de papel manteiga até atingir 3g e vertido em gral de porcelana e solubilizado com água destilada e homogeneizado. O Ph foi aferido e mantido entre 5,5 e 6,5 sem adição de conservantes. O pH foi mantido no parâmetro descrito devido às características das substâncias envolvidas. Após o procedimento, o produto foi colocado em vaso para utilização da aplicação nas feridas.



Figura 7 Creme

## 4.5 ANIMAIS

Foram utilizadas vinte ratas fêmeas wistar (*Rattus norvegicus*) com idade de 8 semanas de vida, e peso de 250 e 300 gramas, divididas em 4 grupos de 5 animais cada, que foram divididas aleatoriamente em quatro grupos: Grupo G1 - tratadas com NaCl; Grupo G2 – tratadas com creme lanette a 4%; Grupo G3 – tratadas com dexpanthenol a 5%; Grupos G4 – tratadas com associação em creme de EAF *Rm* ao ácido tânico a 5%.

### 4.5.1 Importância do placebo para a presente pesquisa

O placebo é uma substância ou processo percebido como terapia, mas que não apresenta atividade biológica ou terapêutica para a doença em questão. O estudo feito nesta dissertação demonstrou que a submissão do grupo ao placebo, ocorreu uma cascata complexa de eventos bioquímicos que foi ativada por diversos estímulos sociais e que contribuíram para observação da cognição e do estado afetivo do grupo.

Para o presente estudo, o creme placebo, denominado lanette, apresenta-se composto de álcoois graxos, hidratante e emoliente de baixa oleosidade.

## 4.6 ASPECTOS BIOÉTICOS

Os métodos utilizados neste estudo, aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE com processo de número: 23076.027569/2017-91 segue a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

Os animais foram mantidos a  $24 \pm 2^\circ \text{C}$ , com umidade relativa 44 a 56% e ciclos de luz e escuro de 10 e 14 h, respectivamente, durante 1 semana antes e durante os experimentos. Os animais receberam dieta padrão (Labina purina®, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados no período da manhã de acordo com as diretrizes atuais para o cuidado dos animais de laboratório e as diretrizes éticas para a investigação de dor experimental em animais conscientes.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE

As ratas foram tratadas com creme a 5% associado de extrato aquoso de folhas de *Rizophora mangle* e ácido tânico .A lesão foi induzida na pele ,em seguida, demarcada e retirada com a utilização de um bisturi com lâmina estéril de nº 15 até a fáscia muscular.Os animais foram previamente anestesiados com uma associação de ketamina 10 mg/kg de peso corpóreo e xilazina 1 mg/kg de peso corpóreo e após anestesia foi realizada tricotomia na região dorsal em área de 4 cm<sup>2</sup> para a demarcação .Foi retirado um fragmento cutâneo com 2 cm de diâmetro no centro da área tricotomizada até a exposição da fáscia muscular dorsal. Para esta etapa do estudo,foram utilizados 20 ratas wistar com 8 semanas ,da mesma linha reprodutiva e com massa média entre 250 e 300 gramas,divididos ao acaso em 4 grupos de 5 animais cada : - Grupo I foi controle negativo e tratado com soro fisiológico a 0,9% durante 5 dias.Este mesmo grupo foi submetido a novo procedimento de retirada da pele para avaliação morfo e histomorfométrica da área,como também seu grau de cicatrização com indução de ferida no 5º,10º e 15º dias.; Grupo II foi chamado controle positivo , tratado com placebo creme .Este mesmo grupo II foi submetido a novo processo de retirada da pele para avaliação morfo e histomorfométrica da área,como também seu grau de cicatrização com indução de ferida no 5º,10º e 15º dias; Grupo III e padrão com dexpantenol a 5% em creme ;Grupo IV ,tratado com associação em creme dos dois compostos já citados anteriormente.

A via de administração utilizada foi intra muscular. Após a anestesia, realizou-se a pesagem dos animais em balança analógica e subsequentemente a tricotomia na região dorsal em área de aproximadamente 4 cm<sup>2</sup>.

Procedeu-se à antissepsia com clorexidine a 2% e confecção de ferida cirúrgica, de aproximadamente 485 mm<sup>2</sup>, com a utilização de bisturi com lâmina estéril número 15 até a exposição da fáscia muscular dorsal.

#### 4.7.1 Análise morfométrica

O processo de cicatrização foi avaliado através da mensuração por paquímetro universal da marca Digimess, dos tamanhos da ferida cirúrgica antes da utilização das substâncias, valores iniciais de comprimento e largura; e a avaliação final da cicatriz no 5º, 10º e 15º dia de pós-operatório. Para avaliação das áreas da ferida foi utilizada equação  $A = b \times h$ . Onde: A representa a área em  $\text{cm}^2$ , b o comprimento, e h a altura ou largura. O grau de contração expresso em percentual foi mensurado pela equação proposta por Ramsey et al. (1995):  $100 \times (W_o - W_i) / W_o = \% \text{ de contração}$  Onde  $W_o$  é a área inicial da ferida e  $W_i$  é a área final



Figura 8. Análise morfométrica com utilização de paquímetro.

#### 4.8 REMOÇÃO DA CICATRIZ E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Ao final de cada período no 10º e 15º dias, realizou-se nova intervenção cirúrgica com remoção da camada cicatrizada com margem de 1 cm de pele em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do animal, e colocadas em solução tamponada de formol a 10%. Após fixação as amostras foram processadas em técnica histológica convencional. As amostras foram emblocadas em parafina e cortadas com o auxílio de um micrótomo com espessura de 4µm, e as preparações, coradas em hematoxilina / eosina alcoólica foram analisadas em microscopia de luz e as imagens foram digitalizadas. Todas as lesões passaram por avaliações microscópicas, onde foram verificados os seguintes parâmetros: edema, hiperemia e presença de exsudato (MARTINS, et.al., 2003). Ao fim dos experimentos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. As seções histológicas foram microfotografadas em *scanner* de lâmina *Pannoramic Viewer* (3DHISTECH). A aferição da distância entre os epitélios na cicatrização – durante processo de reepitelização – foi realizada através do *software Pannoramic Viewer* versão 1.15.4 ano 2014.



## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através das medidas de estatística descritiva: média, erro padrão da média ou desvio padrão e mediana e inferencialmente através dos testes estatísticos: Sigma (versão: 2.23.03)

Foram utilizados os testes de Wilcoxon e Mann-Witney na comparação entre grupos, concentrações ou locais da planta; pareado na comparação da avaliação inicial das áreas com as demais avaliações, e na avaliação da distância de reepitelização. No caso de diferenças significativas pelo teste Mann-Witney) foram aplicados teste de comparações múltiplas .

Ressalta-se que a escolha do teste de Mann-Witney foi devido à variabilidade baixa e o teste de Wilcoxon pareado devido a menor variabilidade.

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

## 6 RESULTADOS

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

Foram utilizadas preparação a base de taninos em feridas cutâneas. Esta película deve estar relacionada ao complexo formado por taninos não hidrolisáveis com proteínas, o qual pode exercer uma ação protetora isolando a ferida do ambiente. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos que observaram uma película vermelha escura cobrindo as feridas de cisto pilonidal nos pacientes tratados com o extrato de caule de *R. mangle* L. Não houve infecções secundárias no local, as feridas estavam secas durante todo o processo de avaliação clínica. Outra hipótese é que ação antibacteriana dos taninos diminuam o risco de infecção, evitando o retardo da cicatrização. De acordo com outros estudos anteriores, o extrato aquoso do caule da *R. mangle* L. com demonstração de propriedades antibacterianas atribuindo a ação aos constituintes polifenólicos presentes no extrato.

Estudos fitoquímicos de extratos do caule da *R. mangle* L. evidenciaram a presença de taninos; que reforçaram que os mesmos influenciam na fisiologia das células da epiderme através das suas propriedades farmacológicas, aumentando a proliferação celular.

Os resultados da avaliação das áreas das feridas cirúrgicas no 10º dia de pós-operatório mostraram uma redução superior dos grupos II e III com significativo nível de retração, quando comparados ao grupo I. Foi no grupo IV que houve maior grau de contração em relação ao quinto dia entre os animais do mesmo grupo e de outros grupos. No décimo dia o grau de retração da ferida operatória alcançou 68,27% em relação ao primeiro dia de indução. Enquanto que nos grupos I, II e III foram 26,75%, 20,0% e 52,82%, respectivamente, em relação ao primeiro dia de indução da ferida. No 15º dia, houve um grau satisfatório de contração em todos os grupos estudados. A granulação foi positiva, mas em

relação ao percentual de contração das feridas cutâneas, houve maior retração no grupo IV, tanto em relação aos demais grupos quanto em dias anteriores. A retração do grupo IV do décimo quinto dia alcançou 99%. No exame clínico foi evidenciado diferentes características entre os 4 grupos. No grupo I, houve secreções purulentas em dois animais com resolução espontânea durante o processo cicatricial. No grupo, ocorreu a formação de tecido de granulação e crosta em todos os animais. No final do 15º dia, a pequena crosta estava presente na maioria dos ratos.

As feridas dos grupos III e IV mostraram crostas e tecido de granulação nos animais. O grupo III revelou uma uniformidade em seu aspecto, sem secreções purulentas nas feridas operatórias, e regularmente, apresentaram uma boa cicatriz macroscópica. Neste estudo, a análise morfométrica de feridas cirúrgicas através de áreas da 5ª, 10ª e 15ª lesões pós-operatórias ficou demonstrado na Tabela 2. No 5º dia, os três grupos tiveram uma redução da área da ferida, mas sem diferença estatística significativa. No décimo dia de pós-operatório, os grupos II e III foram semelhantes quando comparados ao grupo I. Enquanto que no 15º dia próspero, a medida da área final no grupo II foi maior que nos demais grupos. O grupo IV mostrou-se muito mais eficaz em sua cicatrização em todos os dias de avaliação com relação aos demais grupos.

Estes resultados corroboram com os estudos pré-clínicos anteriores que atestaram a ação cicatricial de extratos de *Rizophora mangle* em feridas cutâneas abertas de ratos com redução das áreas no 5º dia de pós-operatório.

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

Contudo, as feridas abertas apresentaram padrões clínicos diferentes das feridas incisais e tratadas. Embora os processos morfológicos e químicos básicos, que atuam na ferida

fechada, sejam os mesmos nas feridas abertas em cicatrização, a contração tornou-se um aspecto importante nas feridas abertas, e a epitelização assume um papel proeminente. Os dois processos parecem ser independentes. A contração é favorecida nos locais onde a pele é mais frouxa e móvel, como a pele do tronco. A mobilidade cutânea depende da direção das “linhas de Langer”, que é determinada pela disposição do sistema fibrilar da pele, sobretudo das fibras elásticas. A distensão máxima acontece em direção transversal às linhas de Langer, motivo pelo qual a contração ocorre nesta direção. Portanto, sugerimos que o resultado das áreas finais ocorreram pelo formato da ferida cirúrgica com aumento da força de tensão na terceira fase da cicatrização. Para a produção das feridas de forma quadrada ou retangular, a pele foi incidida no sentido longitudinal e transversal, determinando aumento da área, devido à distensão provocada pela incisão transversal às linhas de Langer.

Apesar do vasto uso popular da *R. mangle* L., os estudos correlacionando com poder cicatrizante sempre utilizaram os extratos provenientes do caule, porém a população geral usa infusões das folhas pela facilidade de coleta. Nosso estudo, utilizou o extrato da folha com veículo creme a fim de avaliar seu potencial e corroborar com uso popular.

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

No 15º dia de pós-operatório, todos os animais tratados com EAF *R.mangle* associado ao ácido tânico a 5% em creme apresentaram reepitelização completa, com significância estatística quando comparado aos grupos I e II, corroborando com os estudos científicos que sugerem que o extrato desta planta possui efeitos cicatrizantes.

A associação utilizada mostrou-se bem positiva, pois mostrou que a cicatrização utilizando apenas a *Rizophora mangle* realizada em outros estudos apresenta cicatrização a

partir do 5º dia de tratamento, enquanto que a EAF *Rm* associada ao ácido tânico em creme a 5% já apresentou o início da cicatrização a partir do 3º dia de tratamento, mostrando, inclusive um menor período para ocorrer a contração e a reepitelização das feridas cutâneas do Grupo IV.

### 6.1 AVALIAÇÃO CICATRICIAL

Através da tabela 1, observamos o grau de contração a partir do 5º dia de tratamento, mas de acordo com a substância tratada já se observa o aspecto da ferida.

Tabela 1 Os resultados da avaliação das áreas das feridas cirúrgicas no 10º dia de pós-operatório mostraram uma redução superior dos grupos II e III quando comparados ao grupo I. Em relação ao grupo III houve um significativo nível de retração, mas foi no grupo IV que apresentou maior grau de contração em relação ao quinto dia entre os animais do mesmo grupo e também em relação aos de outros grupos. No décimo dia o grau de retração da ferida operatória alcançou 68,27% em relação ao primeiro dia de indução da lesão; enquanto nos grupos I, II e III foram 26,75%, 20,0% e 52,82%, respectivamente, em relação ao primeiro dia de indução da ferida. No 15º dia, houve um grau satisfatório de contração em todos os grupos estudados. A granulação foi positiva, mas em relação ao percentual de contração, houve maior retração no grupo IV, tanto em relação aos demais grupos em relação aos dias anteriores. A retração do grupo IV do décimo quinto dia alcançou 99%. No grupo I, houve secreções purulentas em dois animais com resolução espontânea durante o processo cicatricial. No grupo II, ocorreu a formação de tecido de granulação e crosta em todos os animais. No final do 15º dia, a pequena crosta ainda se encontrava visível na maior parte delas.

As feridas dos grupos mostraram crostas e tecido de granulação nos animais. O grupo III revelou uma uniformidade, sem secreções purulentas nas feridas operatórias, e regularmente, uma boa cicatriz macroscópica. Neste estudo, a análise morfométrica através de áreas da 5ª, 10ª e 15ª lesões pós-operatórias ficou demonstrado na Tabela 2. No 5º dia, os três grupos tiveram uma redução da área da ferida, mas sem diferença estatisticamente significativa. No décimo dia de pós-operatório, os grupos II e III foram semelhantes quando comparados ao grupo I. No 15º dia próspero, a medida da área final do grupo II foi maior que dos demais. O grupo IV evidenciou maior eficácia quanto à cicatrização durante o período de avaliação frente aos demais grupos.

A tabela 1 a seguir, evidencia o grau de contração das feridas entre os diferentes grupos avaliados e entre os períodos observados:

















GRUPO	1DD	5DD	10DD	15DD
NACL				
PLACEBO				
DEXPANTENOL 5%				
<i>Emangite</i> (Ácido tânico a 5% creme				

Tabela 1 Avaliação cicatricial

## 6.2 ANÁLISES MORFOMÉTRICA E HISTOMORFOMÉTRICA

A tabela 2 abaixo mostra a média e o desvio padrão nos períodos de 5,10 e 15 dias, como também seu percentual de contração e seu valor de significância; cada período analisado e também seu valor de significância nestes mesmos períodos de análise.

Período de Avaliação				
	solução salina NACL)	Placebo Creme Iannete a 4%)	Dexpantenol a 5%	<i>Rhizophora mangle</i> + Ácido tânico a 5%
	(n = 5)	(n = 5)	(n = 5)	(n = 5)
Após a cirurgia	Média + Desvio Padrão	Média + Desvio Padrão	Média + Desvio Padrão	Média + Desvio Padrão
Inicial	4 cm <sup>2</sup> ± 0,00	4 cm <sup>2</sup> ± 0,00	4 cm <sup>2</sup> ± 0,00	4 cm <sup>2</sup> ± 0,00
5 dias	3,624 cm <sup>2</sup> ± 3,570 cm <sup>2</sup>	3,43 cm <sup>2</sup> ± 3,45 cm <sup>2</sup>	2,669 cm <sup>2</sup> ± 2,673 cm <sup>2</sup>	2,203 cm <sup>2</sup> ± 2,160 cm <sup>2</sup>
% contração com 5 dias	9.40%	14.25%	33.27%	44.92%
p	p<0,03	p<0,03	p<0,03	p<0,03
10 dias	1,070 cm <sup>2</sup> ± 0,921 cm <sup>2</sup>	3,188 cm <sup>2</sup> ± 3,115 cm <sup>2</sup>	1,887 cm <sup>2</sup> ± 1,741 cm <sup>2</sup>	1,269 cm <sup>2</sup> ± 1,288 cm <sup>2</sup>
% contração com 10 dias	26.75%	20.30%	52.82%	68.27%
p	p<0,05	p<0,02	p<0,02	p<0,02
15 dias	0,418 cm <sup>2</sup> ± 0,381 cm <sup>2</sup>	1,040 cm <sup>2</sup> ± 0,912 cm <sup>2</sup>	0,15 cm <sup>2</sup> ± 0,16 cm <sup>2</sup>	0,020 cm <sup>2</sup> ± 0,018 cm <sup>2</sup>
% contração com 15 dias	89.55%	74%	96.25%	99.50%
p	p<0,05	p<0,08	p<0,05	p<0,05

Diferença significativa  $\leq 5\%$ .

Através do teste de Mann-Whitney para comparações entre os grupos em cada tempo de avaliação com comparações do referido teste. Através do teste de Mann-Whitney para comparações entre os tempos de avaliação em cada grupo.

Tabela 2 Análise morfométrica

### ANÁLISE MORFOMÉTRICA:

Percentual de contração morfométrica de forma quantitativa em 5,10 e 15 dias de análise de acordo com o grupo e o tempo de avaliação após o procedimento cirúrgico *in vivo*.

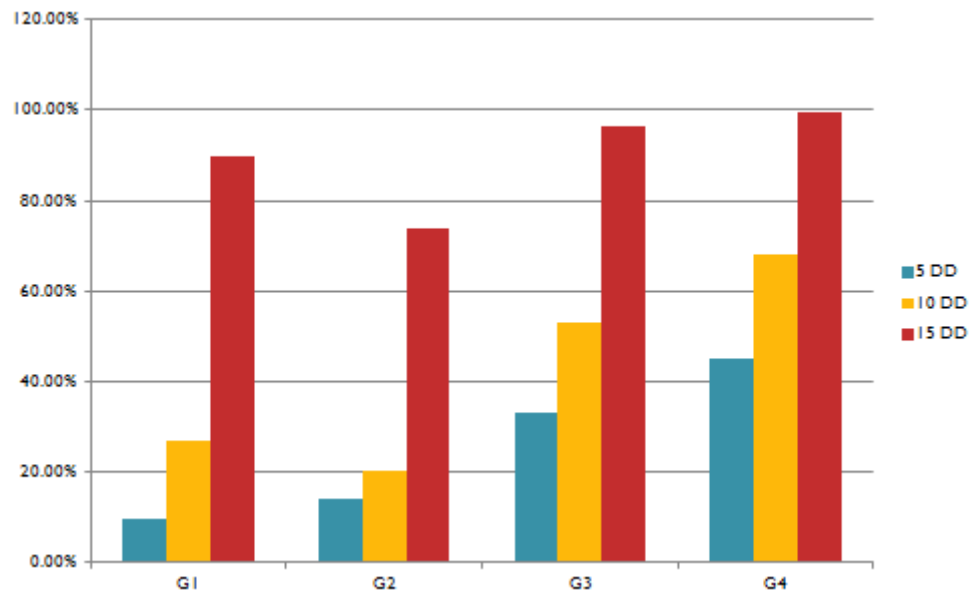


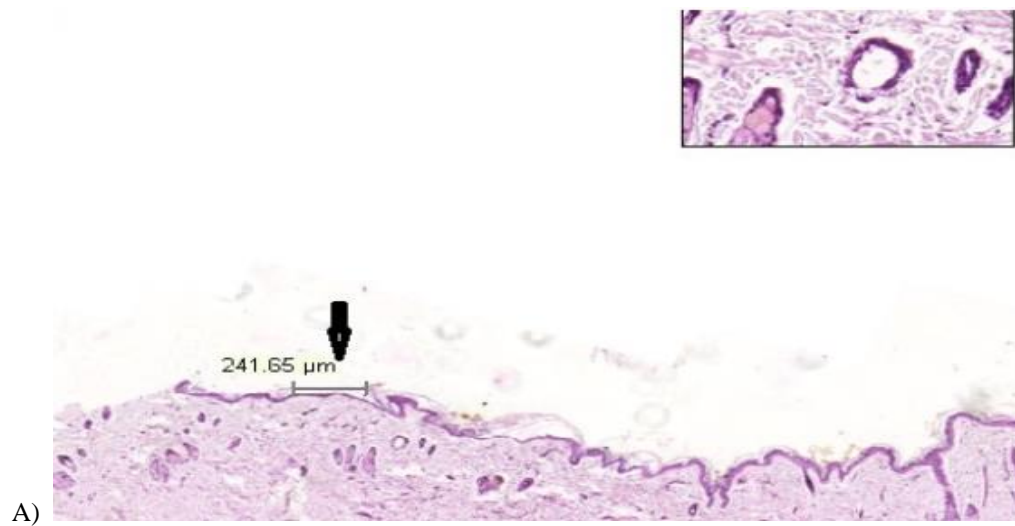
Gráfico1 Grau de percentual de contração

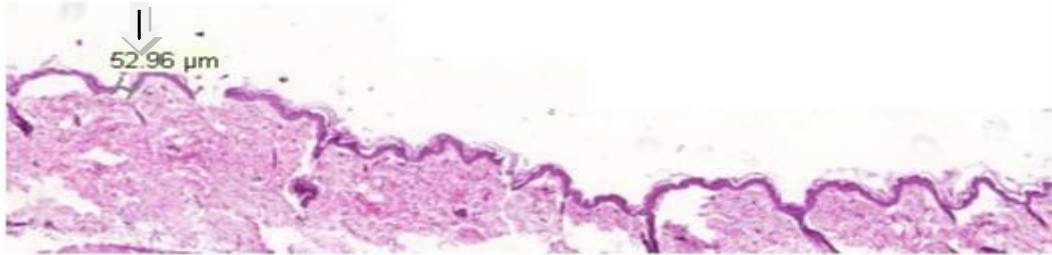
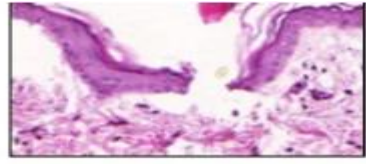
Mostra os períodos de 5,10 e 15 dias ,mostrado seu grau de contração nas áreas de cicatrização



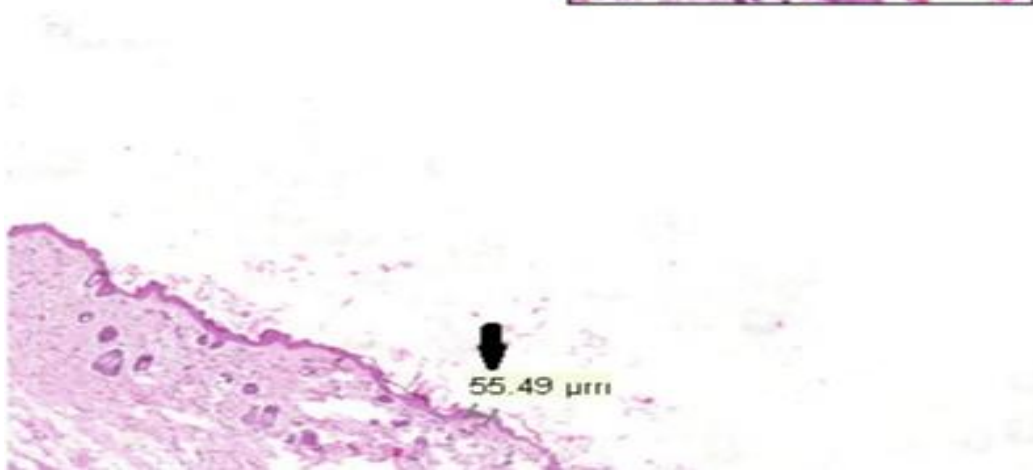
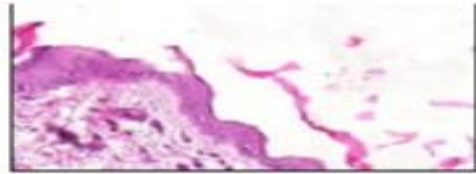
### ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA COM 10 DIAS

Figura 9 Secções histológicas de pele dorsal de ratos mostrando grupo controle negativo com NACL (a), grupo tratado com placebo –creme lannete a 4% (b) , tratado com dexpanthenol a 5% (c) e medicado com Associação de EAF *R.magle* ao ácido tânico a 5% (d). Todas as imagens mostram o grau de reepitelização após 10 dias de tratamento: Distância entre os epitélios( a e b) e reepitelização satisfatória(c e d). Coloração HE. Aumento 2x.





B)



C)

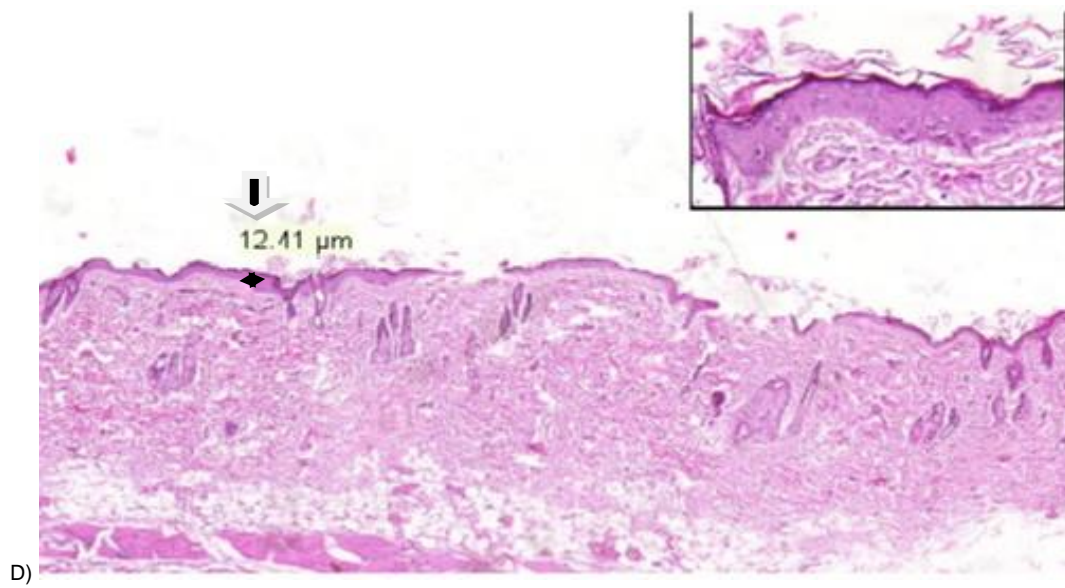


Figura 9: Análise histomorfométrica com 10 dias

### TABELA DE TRATAMENTO COM 10 DIAS

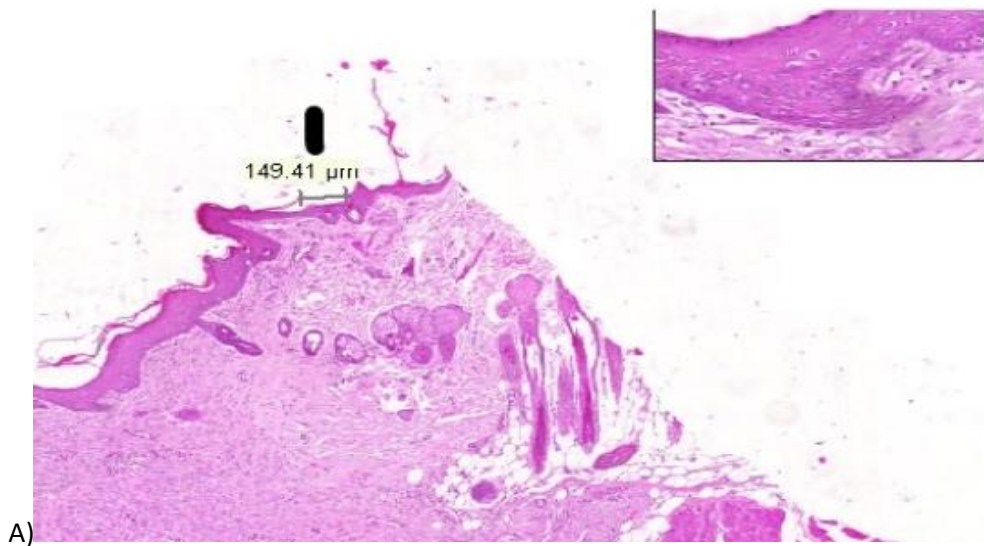
Tabela 3 Tratamento com 10 dias de reepitelização em percentual das feridas de acordo com a substância tratada e mostrado também o grau de significância dos três primeiros grupos em relação ao grupo tratado com a Associação de EAF *R.mangle* ao ácido tânico a 5%.

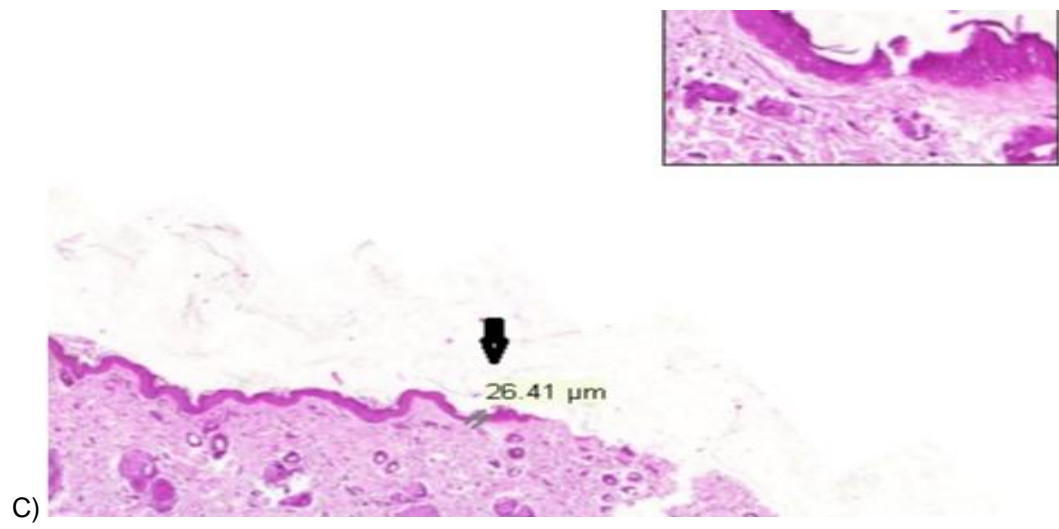
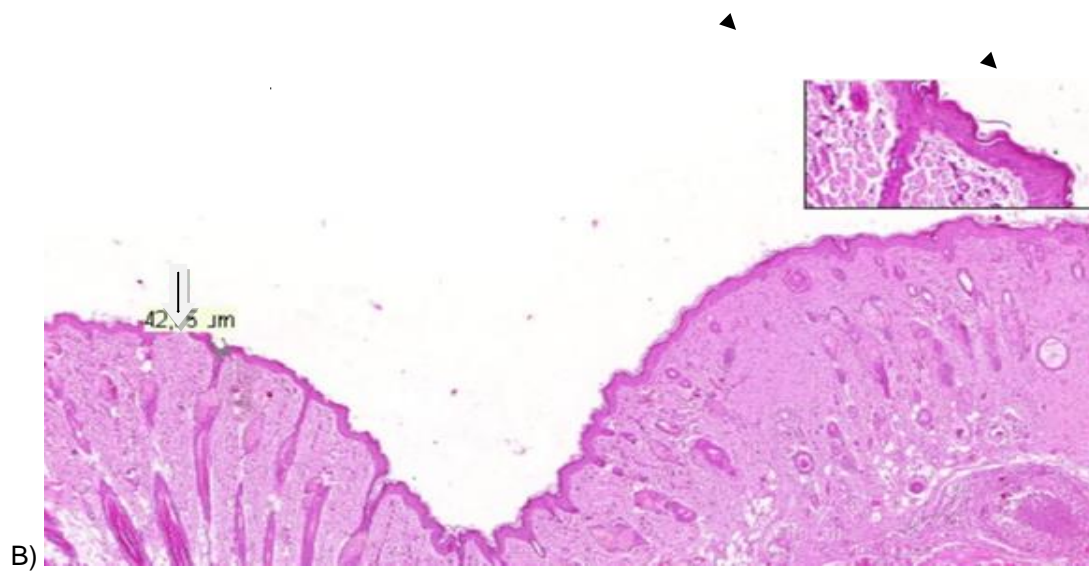
Pacientes	Reepitelização G1 %	Reepitelização G2 %	Reepitelização G3 %	Reepitelização G4 %	p G4 X G3	p G4XG2	p G4XG1
CM	36,78	34,81	58,97	67,98	P<0,03	p<0,05	p<0,01
RM	34,60	38,81	71,42	67,20	P<0,03	p<0,05	p<0,01
LM	24,50	45,53	49,25	82,73	P<0,03	p<0,05	p<0,01
CR	29,86	58,57	54,84	37,46	P<0,03	p<0,05	p<0,01
CRL	35,64	44,24	56,55	41,80	P<0,03	p<0,05	p<0,01
MÉDIA	32,28	20,96	29,63	54,74	P<0,03	p<0,05	p<0,01

Tabela 3 Grau de percentual de reepitelização em 10 dias de tratamento

### ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA COM 15 DIAS

Figura 10 Secções histológicas de pele dorsal de ratos mostrando grupo controle negativo com NACL (a), tratado com Placebo-creme Iannete a 4% (b), grupo controle padrão com Dexpanthenol a 5% (c) e o grupo tratado com a Associação de EAF *R.mangle* ao ácido tânico a 5% (d). Todas as imagens mostram o grau de reepitelização após 15 dias de tratamento: Distância entre os epitélios (a,b e c) e reepitelização total (d) Coloração HE. Aumento 2x.





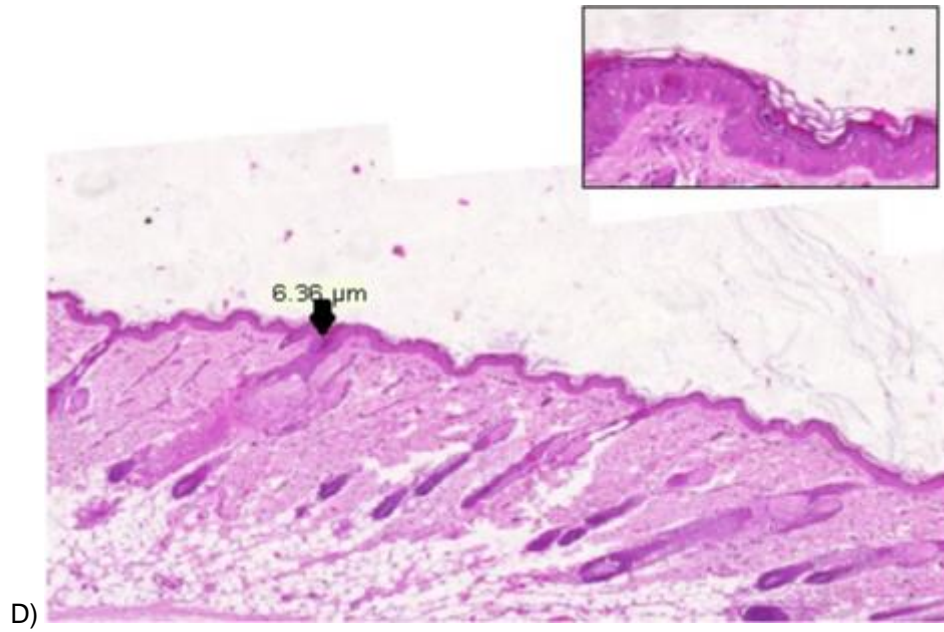


Figura 10 Análise histomorfométrica com 15 dias

### TABELA DE TRATAMENTO COM 15 DIAS

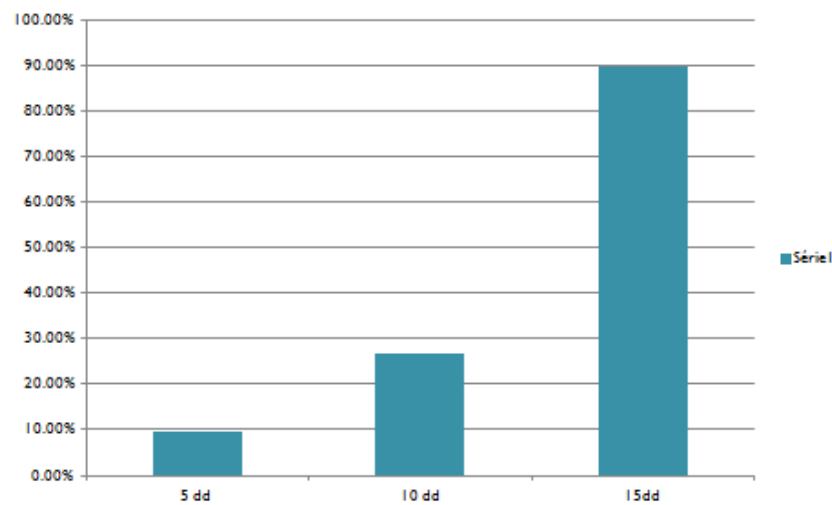
Tabela 4 Tratamento com 15 dias de reepitelização em percentual das feridas de acordo com a substância tratada e mostrando também o grau de significância dos três primeiros grupos em relação ao grupo tratado com a Associação de EAF *R.mangle* ao ácido tânico a 5%.

Pacientes	Reepitelização G1 %	Reepitelização G2 %	Reepitelização G3 %	Reepitelização G4 %	p G4 X G3	p G4XG2	p G4XG1
CM	60.86	68,47	84,02	96,66	P<0,01	P<0,01	P<0,01
RM	77.32	65,96	84,26	92,45	P<0,01	P<0,01	P<0,01
LM	66.37	66,97	84,90	95,77	P<0,01	P<0,01	P<0,01
CR	64.78	64,39	86,59	96,53	P<0,01	P<0,01	P<0,01
CRL	64.46	64,39	85,51	97,96	P<0,01	P<0,01	P<0,01
MÉDIA	66.75	66,13	85,05	95,87	P<0,01	P<0,01	P<0,01

Tabela 4 Grau de percentual de reepitelização em 15 dd de tratamento



Gráfico 2 Este gráfico mostra o grau de retração do Grupo I em 5,10 e15 dias ,demonstrando que nos dois primeiros períodos houve uma contração baixa com relação aos demais grupos e no último período apresentou uma contração satisfatória devido à resposta fisiológica dos animais.



Grau de Retração em percentual do Grupo G1 em 5 ,10 e 15 dias

Gráfico 3 Este gráfico demonstra que no grupo II, ocorreu a formação de tecido de granulação e crosta em todos os animais em tempo normal de cicatrização de acordo com a resposta fisiológica do indivíduo.

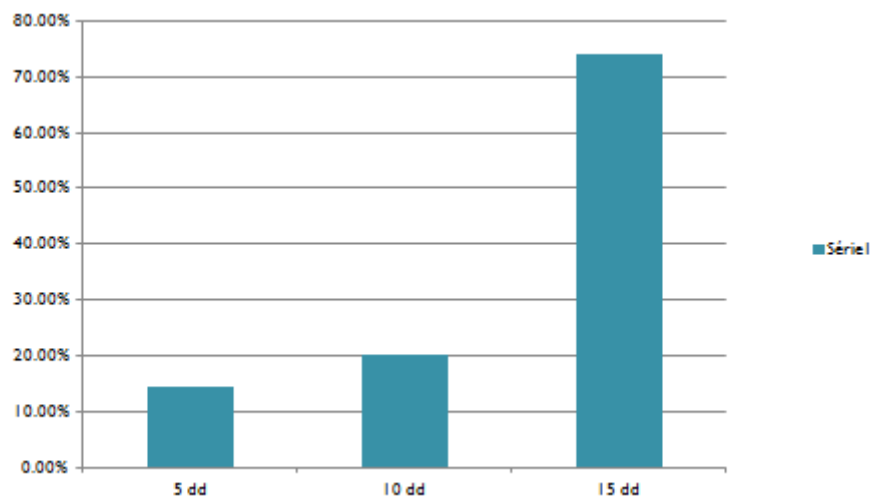


Gráfico 3 Grau de Retração em Percentual do G2 em 5 ,10 e 15 dias

Gráfico 4 Grau de retração do grupo III revelou uma uniformidade progressiva na cicatrização dos animais tratados com o dexpantenol a 5%

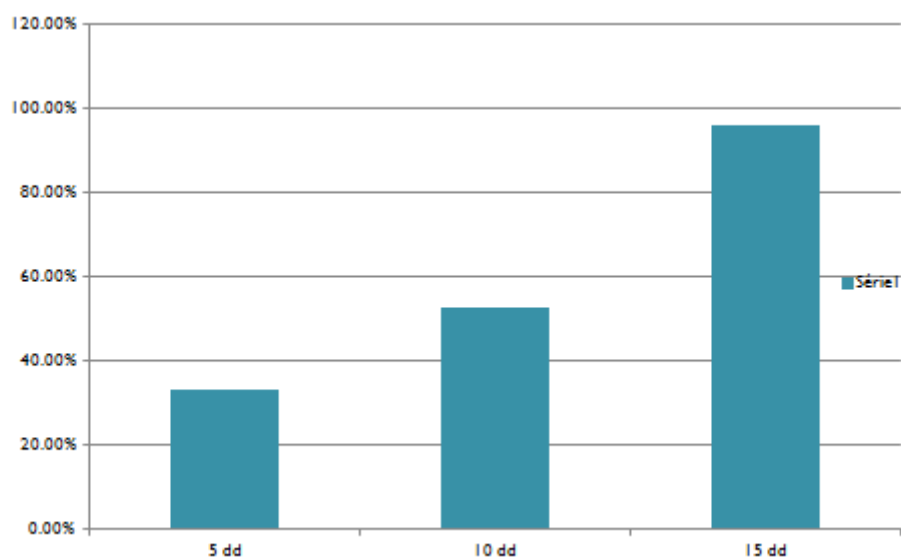


Gráfico 4: Grau de Retração em Percentual do G3 em 5, 10 e 15 dias

Gráfico 5 Este gráfico evidencia a eficácia da contração de feridas com o grupo tratado com a associação em creme ,demonstrado a eficácia na cicatrização de feridas em menor tempo que os demais grupos tratados com outras substâncias no mesmo período de avaliação.

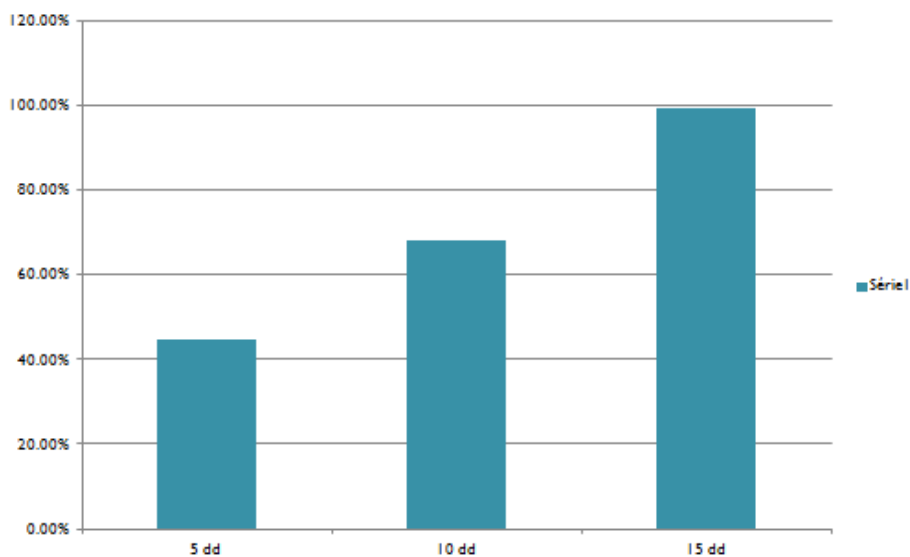


Gráfico 5 Grau de Retração em Percentual do G4 em 5,10 e 15 dias

## 7 DISCUSSÃO

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico, interativo e iniciado em resposta a uma injúria (GUO e DIPIETRO, 2010), cujo objetivo é restaurar a continuidade anatômica e funcional do tecido, sendo essencial para a manutenção da integridade do organismo (BARBUL, 1990; BROUGHTON, et al., 2006; THORNTON, et al., 1997). Dessa forma, um grande número de investigações e estudos clínicos têm sido realizado com o intuito de melhorar o processo cicatricial das feridas (GÁL, et al., 2009) e consequentemente a qualidade de vida das pessoas. Este é o primeiro estudo que aborda o potencial terapêutico em relação à cicatrização da associação de *Rizophora mangle* ao ácido tânico em base creme a 5%. É importante salientar que o gênero *Rizophora* possui constituintes químicos que podem apresentar diversas propriedades farmacológicas, como os alcaloides, taninos, flavonóides, saponinas e triterpenos (ABEYSINGHE, 2010; GHANI, 1998; VADLAPUDI, 2012), que contribuem para a ação medicamentosa desta planta.

Na avaliação das feridas cirúrgicas, o grupo I apresentou secreções purulentas durante os primeiros três dias de tratamento. No grupo IV, a formação de tecido de granulação e crosta ocorreu em todos os animais em um período de 2-3 dias. Araújo (2015) estudando feridas cirúrgicas em camundongos tratados com *R. mangle* em creme revelou que o grupo tratado com *R. Mangle* apresentou feridas uniformes e não infectadas quando comparado aos grupos tratados com solução de NaCl e dexpanthenol que apresentaram tecido de granulação com ferida infecciosa.

O gênero *Rhizophora* possui certas substâncias presentes no extrato, como taninos e polifenóis (BANDARANAYAKE, 2002), que são capazes de interagir com estruturas peptídicas formando grandes aglomerados, o que explicaria a formação do filme protetor. Este filme deve estar relacionado ao complexo formado por taninos não hidrolizáveis com proteínas, que podem exercer uma ação protetora ao isolar a ferida do meio ambiente (FERNANDEZ, et al. 2002, PERERA, et al. 2010). FERNANDEZ, et al. (2002) mostraram resultados semelhantes e observaram um filme vermelho escuro cobrindo as feridas do cisto pilonidal nos pacientes tratados com o extrato do caule de *R. mangle* L. Não houve infecções secundárias no local; as feridas estavam secas durante todo o processo de avaliação clínica Perera et al. A avaliação da atividade anti-ulcerogênica do extrato de *Rizophora*

*mangle* L. mostrou a presença de uma camada espessa aderente à mucosa gástrica, sugerindo uma barreira física com propriedades gastroprotetoras semelhantes às observadas em feridas cutâneas.

Outra hipótese é que a ação antibacteriana dos taninos reduz o risco de infecção da ferida, evitando o retardo da cicatrização. Melchor et al. estudou o extrato aquoso do caule de *Rhizophora mangle* L. demonstrando propriedades antibacterianas atribuindo a ação aos constituintes polifenólicos presentes no extrato. Estudos fitoquímicos de extratos de caule de *R.mangle* L. mostraram a presença de taninos. Bueno et al reforçaram que os taninos influenciam a fisiologia das células da pele através de suas propriedades farmacológicas, aumentando a proliferação celular.

Os resultados da avaliação das áreas das feridas cirúrgicas no 10º dia de pós-operatório mostraram uma redução superior nos grupos III e IV quando comparados aos grupos I e II. Em relação à inspeção das feridas operatórias este período, foi observado que o grupo do soro fisiológico e do creme lannete apresentaram crostas e tecido de granulação com processos infecciosos das feridas durante os primeiros dias do período do estudo. O grupo III ,tratado com dexpanntenol demonstrou uma bom processo de cicatrização e processo de contração satisfatório.Entretanto, o grupo IV de associação da Rizophora mangle ao ácido tânico em creme a 5% apresentou crostas e cicatriz sem infecção da ferida cirúrgica. Estes resultados podem ser explicados por diferentes mecanismos de ação dos compostos secundários presentes na planta,como flavonoides e taninos, que são conhecidos por possuírem propriedades antimicrobianas e antioxidantes (OFORI-KWAKYE, et al., 2011). Nesse sentido, SANTOS et.al (2010) mostraram que o extrato aquoso da folha apresentou atividade antibacteriana in vivo, a qual pode contribuir para a ação cicatrizante desta associação , diminuindo o risco de infeção da lesão, que é a causa mais provável de retardo na cicatrização de feridas (LEAPER, et al., 2015).A análise morfométrica revelou que a média das áreas da ferida diminuiu com aprogressão do tempo de avaliação em todos os grupos estudados.

Esses resultados corroboram com os estudos pré-clínicos de SÁNCHEZ, et al. (2009), que estudaram a ação cicatricial de extratos de *Rhizophora mangle* L. em feridas cutâneas abertas de ratos com redução das áreas no 5º dia de pós-operatório. Em todos os grupos, no 15º dia de pós-operatório, houve redução das áreas da ferida. No entanto, feridas abertas apresentaram aspectos clínicos diferentes de feridas incisadas e suturadas. Embora os

processos básicos morfológicos e químicos que atuam na ferida fechada sejam os mesmos na cicatrização de feridas abertas, a contração se torna um aspecto importante em feridas abertas, e a epitelização desempenha um papel proeminente (Coelho et al, 1999). Os dois processos parecem ser independentes (MADDEN & AREM, 1991).

De acordo com BUENO, et. al (2014), os taninos influenciam na fisiologia das células da pele através das suas propriedades farmacológicas, aumentando a proliferação celular. Sendo assim, o resultado do presente trabalho sugere uma ação mitogênica do extrato de EAF *R.mangle* por possuir este composto.

Na análise histomorfométrica demonstrou que a média da distância entre os epitélios da ferida cirúrgica foi mais elevada no grupo do soro fisiológico e no grupo do creme lannete após 10 dias, apresentando diferença estatística com os demais grupos; outra média que mostrou-se satisfatória foi o grupo tratado com dexpanthenol a 5% em creme ,porém ,a menor média foi observada no grupo que utilizou a associação da *Rizophora mangle* ao ácido tânico em creme a 5% . O creme de dexpanthenol é amplamente utilizado, pois indica melhorias na cicatrização de feridas (HEISE, et al., 2012; OGUZ, et al., 2015; ULGER, et al., 2014), visto que penetra facilmente na pele em concentrações locais elevadas. Os efeitos mais significativos de formulações contendo dexpanthenol incluem a estimulação da epitelização, granulação e o alívio de prurido (EBNER, et al., 2002). Todavia, na avaliação após 15 dias de tratamento, todos os 5 animais medicados com a associação da *Rizophora mangle* ao ácido tânico em creme a 5% indicaram reepitelização completa das feridas. Isso pode ser atribuído à presença dos taninos nesta planta, pois eles contribuem para formação de uma camada protetora sobre a pele e as mucosas, atuando em processos inflamatórios, causando uma reestruturação do epitélio e a neovascularização (SIMÕES et al., 2010). Esta película pode exercer uma ação protetora,isolando a ferida do ambiente, acelerando significativamente a reparação tecidual no grupo tratado com o creme de EAF *R.m*.Observou-se também, no presente estudo, que houve um aumento na quantidade de fibroblastos no grupo de EAF *R.m* associado ao ácido tânico a 5% em creme, com diferença estatística, em comparação aos demais grupos estudados e avaliados no intervalo de 15 dias. ULGER, et al. (2014) acreditam que a melhora na taxa de cicatrização de feridas é devido ao aumento da proliferação de fibroblastos, bem como de uma epitelização acelerada. Além disso, vários outros estudos mostram a importância dos fibroblastos no processo cicatricial (DAS, 2013;

DIEGELMANN e EVANS, 2004; EBNER et al., 2002; KHOSHNEVISZADEH, et al, 2014; SONMEZ, et al, 2015). Sugere-se que esta atividade estimuladora de fibroblastos da derme no grupo da planta estudada é devido à presença de taninos hidrolisáveis (BUENO, et al., 2014).

Na análise histomorfométrica ficou demonstrado a nossa pesquisa que a média da distância entre os epitélios da ferida cirúrgica foi mais elevada no grupo do soro fisiológico após 10 dias, com diferença estatística aos demais grupos. A maior média observada no grupo IV, estatisticamente significativa foi o do dexpanthenol a 5% e com a Associação de EAF *R.mangle* ao ácido tânico. O creme de dexpanthenol a 5% é amplamente utilizado, pois indica melhorias na cicatrização de feridas (HEISE, et al., 2012; OGUZ, et al., 2015; ULGER, et al., 2014), visto que penetra facilmente na pele em concentrações locais elevadas. Os efeitos mais significativos de formulações com dexpanthenol a 5% incluem a estimulação da epitelização, granulação e o alívio de prurido (EBNER, et al., 2002). Todavia, na avaliação após 15 dias de tratamento, todos os 5 animais tratados com o creme a 5% associado EAF *R.mangle* e ácido tânico indicaram reepitelização completa das feridas. Isso pode ser atribuído à presença dos taninos nesta planta, pois eles contribuem para formação de uma camada protetora sobre a pele e as mucosas, que atua em processos inflamatórios, causa uma reestruturação do epitélio e a neovascularização (SIMÕES, et al., 2010). Esta película pode exercer uma ação protetora que isola a ferida do ambiente e acelera significativamente a reparação tecidual no grupo tratado com o creme a 5% de Associação de EAF *R.mangle*.

Observou-se também, no presente estudo, que houve um aumento na quantidade de fibroblastos no grupo de Associação de EAF *R.mangle*, com diferença estatística, em comparação aos demais no intervalo de 15 dias. ULGER, et al. (2014) acreditam que a melhora na taxa de cicatrização de feridas é devido ao aumento da proliferação de fibroblastos, bem como de uma epitelização acelerada. Além disso, vários outros estudos mostraram a importância dos fibroblastos no processo cicatricial (DAS, 2013; DIEGELMANN e EVANS, 2004; EBNER, et al., 2002; KHOSHNEVISZADEH, et al, 2014; SONMEZ, et al, 2015). Sugere-se que esta atividade estimuladora de fibroblastos da derme no grupo da planta estudada é devido à presença de taninos hidrolisáveis (BUENO, et al., 2014).

Em nosso estudo, houve diferença estatística em relação à contração de feridas cirúrgicas no 15º dia. A contração das feridas e a reepitelização foram eficazes em diversos processos de tratamento e cicatrização de feridas. Este estudo utilizou extrato aquoso de



folhas de *R. mangle* associado ao ácido tânico em creme a 5% ,corroborando com os achados de eficácia no uso de hortaliças para a produção de fitoterápicos a partir da medicina popular.

Portanto, ressalta-se a importância da histomorfometria nos estudos, visto que somente a partir da análise microscópica foi possível avaliar o grau de reepitelização da ferida, demonstrado nos grupos que utilizaram creme de dexpanthenol a 5% e de Associação de EAF *R.mangle* ao ácido tânico foram bem superiores ao do soro fisiológico e ao creme lannete a 4%, pois obtiveram um processo cicatricial mais rápido e eficiente. De todos os grupos analisados o que obteve os melhores resultados de cicatrização foi o de Associação de EAF *R.mangle* ao ácido tânico em creme a 5%. Contudo, são necessários estudos mais aprofundados que comprovem o potencial cicatrizante desta planta, além de pesquisar outras atividades terapêuticas que esta espécie possa apresentar.

Os resultados do presente estudo mostraram que o uso tópico do EAF. *R. mangle* associado ao ácido tânico a 5% em creme apresentam efeito significativo na reepitelização de feridas cirúrgicas em ratas. Partindo do princípio que a cicatrização é um processo dinâmico e multifatorial, este estudo evidenciou a importância da realização da histomorfometria na correlação com os achados morfométricos. Contudo, o isolamento de componente (s) da planta responsável(is) pela influência positiva no processo de reparação de tecidos deve ser realizado. A avaliação histomorfométrica do uso tópico do EAF. *R. mangle* associado ao ácido tânico a 5% em creme apresentou efeito significativo na reepitelização de feridas cirúrgicas em ratas com fechamento completo entres os epitélios e ausência macroscópica de infecções. A análise morfométrica no 15º dia do experimento não mostrou diferenças estatísticas entre a cicatriz dos animais tratados com creme lannete a 4% e soro fisiológico . Já a avaliação morfométrica no 15º dia do experimento nos grupos tratados com dexpanthenol a 5% e no EAF *R.mangle*. associado ao ácido tânico a 5% em creme mostrou diferenças estatísticas significativas quando comparadas aos animais tratados com soro fisiológico e creme lannete a 4%.

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

A associação entre o ácido tânico e a *Rhizophora mangle* demonstrou que as duas substâncias se potencializam reciprocamente por se tratarem de fármacos que apresentam taninos, substância essencial para a cicatrização de feridas.

A aplicação tópica do creme de folhas de *Rhizophora mangle* associadas com ácido tânico em creme a 5% diminuiu a área da ferida, estimulou a reepitelização e aumentou o número de fibroblastos, exibindo uma ação cicatrizante nas lesões cutâneas em ratas mais eficiente do que o creme de dexpanthenol a 5%. Portanto, com a realização de novas pesquisas, este vegetal pode ser uma opção terapêutica alternativa no processo de reparação tecidual, trazendo vários benefícios à população.

Os mediadores bioquímicos de ação curta são a histamina e serotonina e as mais duradouras são a leucotaxina, bradicinina e prostaglandina. Os novos vasos formam-se a partir de brotos endoteliais sólidos, que migram no sentido da periferia para o centro da ferida, sobre a malha de fibrina depositada no leito da ferida. A neo-angiogênese é responsável não apenas pela nutrição do tecido, com uma demanda metabólica maior, como também pelo aumento do porte de células, como macrófagos e fibroblastos, para o local da ferida. Após o trauma, células mesenquimais normalmente quiescentes e esparsas no tecido normal, são transformadas em fibroblastos e atraídas para o local inflamatório, onde se dividem e produzem os componentes da matriz extracelular. O fibroblasto só aparece no sítio da lesão a partir do 3º dia, quando os leucócitos polimorfonucleares já fizeram seu papel higienizador da área traumatizada. A função primordial dos fibroblastos é sintetizar colágeno ainda na fase celular da inflamação (TAZIMA, et.al.2008).

Este estudo demonstrou que a espécie *R.mangle* é uma das mais importantes fontes de taninos apresentando propriedades anti inflamatória, bactericida, antiulcerogênica e antioxidante. Este vegetal mostrou-se capaz de sequestrar radicais livres, atuar sobre compostos (GSH) e enzimas antioxidantes (GR, GPx e SOD) e pró oxidantes (MPO e LPO) definindo sua atividade antioxidante. A atividade antiulcerogênica além de ser mediada pela própria ação antioxidante é dependente de GSH e NO, envolve a participação de PGE2, COX-2, EGF, PCNA, HSP-70, além do aumento da produção de muco aderido e propriedades anti-secretoras. Por apresentar taninos em sua estrutura química, a *R.mangle* ajudaram no processo de cura de feridas, e do processo inflamatório através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele danificada, que favorece abaixo

desta, a ocorrência do processo de cicatrização (reestruturação do epitélio e formação vasos), onde uma camada tanino-proteína seria responsável por proteger a lesão e garantir melhor cicatrização (Haslam, 1996). O estudo também mostrou que a associação *do* vegetal ao ácido tânico em creme a 5% aplicado topicamente diminuiu a área da ferida de primeira intenção e estimulou a reepitelização .Aumentou também o número de fibroblastos ,exibindo desta forma uma ação cicatrizante nas lesões cutâneas em ratas ,mostrando-se mais eficiente e eficaz do que o grupo tratado com o dexpantenol ,mostrando que esta associação apresenta um meioterapêutico alternativo na cicatrização de feridas epidérmicas, trazendo vários benefícios à população.

## 8 CONCLUSÃO

A associação do pó de extrato aquoso de folhas de *Rizophora mangle* e ácido tânico a 5% mostrou um potencial cicatrizante satisfatório no reparo tecidual de feridas cutâneas em ratas wistar.

De acordo com os aspectos macroscópicos das feridas cutâneas dos animais submetidos a tratamento de acordo com a substância e separados por grupos: Grupo I, Grupo II, Grupo III, Grupo IV, constatou-se que o grupo IV apresentou um maior índice de cicatrização em menor tempo em relação aos demais;

A análise morfométrica dos grupos tratados com seus fármacos distintos, demonstrou que área de cicatrização e o período de granulação das feridas são menores nos grupos tratados com dexpanthenol a 5% e o grupo tratado com a associação;

A análise histomorfométrica comprovou que o grupo tratado com a associação apresentou um grau de reepitelização superior aos demais grupos tratados com outros fármacos.

No período de cicatrização, além do grau de contração e do percentual de reepitelização devido à resposta inflamatória foi observada a migração sequencial celular viabilizando a regeneração da ferida.

Foram observadas a fibroplasia e a neo – angiogênese na área com lesão induzida, demonstrando que a síntese de colágeno e a reepitelização foram satisfatórias. O Grupo IV que foi tratado com a associação do EAF *Rm* com o ácido tânico em creme a 5 %, mostrou que o processo de cicatrização iniciou a partir do 3º dia da administração do fármaco nas feridas epidérmicas.

## 9 PERSPECTIVA

Este estudo proporcionou o levantamento de muitos dados acerca do que já foi estudado sobre as atividades farmacológicas de *R. mangle*, os resultados corroboram muitos dos trabalhos anteriores. Os compostos presentes em *R. mangle* são importantes sob vários pontos de vista, tanto a química quanto a farmacologia desses compostos são objetos de novas investigações (HASLAM,E. 2007).

Entendo que ainda há necessidade de maior investigação química para garantir ou não a presença de outras moléculas que poderão contribuir para o tratamento de outras afecções. Além do mais, o conhecimento exato das moléculas presentes nas folhas de *R. mangle* pode colaborar para padronização de métodos de isolamento desses compostos, e sendo este método eficaz, poder-se-á avaliar o potencial farmacológico de cada uma dessas moléculas isoladamente (FARIA,F.M.2009).Sendo assim, a continuidade do estudo desses compostos pode ser promissora, pois possuem atividades biológicas importantes.Através de estudos de parâmetros farmacocinéticos destes compostos, assim, poderemos ter maior conhecimento suas propriedades biológicas e fornecer mais informações a cerca dos taninos e suas aplicações farmacológicas.

## REFERÊNCIAS

- ABEYSINGHE, P.D., 2010. Antibacterial Activity of some Medicinal Mangroves against Antibiotic Resistant Pathogenic Bacteria. *Indian J. Pharm. Sci.* 72, 167-172. M. (1977) Manual de Cirurgia, Barcelona: Científicomédica, 3-14
- ARONS, J.A., WAINWRIGHT, D.J., JORDON, R.E. (1992) The surgical applications and applications of cultured human epidermis: a comprehensive review. *Surgery*. 111(1), 4-11
- Aspectos Nutricionais de Fitatos e Taninos, acesso em 05 de outubro de 2016
- ÁVILA-REYES, J. A. et al. 2018. Compostos fenólicos das folhas de dez espécies selvagem de Verbenaceae como antioxidantes e quimiomarcadores específicos. *78(1): 98-107*
- BALSEV, H. 1996. Juncaceae. *Flora Neotropica Monograph* 68:167pp. New York Botanical Garden, Nova York
- BARRETO, R.C. 1997. Levantamento das espécies de Commelinaceae R.Br. nativas do Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. São Paulo
- BALBINO, C.A., PEREIRA, L.M., CURI, R. (2005) Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 41, n. 1, jan./mar., 27-51
- BANDARANAYAKE, W.M. (2002) Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetlands Ecology and Management*, 10, 421–52
- BERENGUER, B., et.al. (2006) Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. *Journal of Ethnopharmacology*. 103, 194–200
- BIRO, K., et.al. (2003) Efficacy of dexpanthenol in skin protection against irritation: a double-blind, placebo-controlled study. *Contact Dermatitis*, 49, 80–84
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos, Brasília, p. 148, 2006

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS

Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos, Brasília, p. 148, 2009

BRAS-FILHO, R. Química de Produtos Naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. Química Nova, v.17.n.5, p.405-445,1994

BUENO,F.G. et.al.(2014) Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. Fitoterapia 99, 252–260

CAÑIGUERAL,S.; DELLACASSA,E.; BANDONI,A.L. (2003) Plantas Medicinales y Fitoterapia: Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo

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

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

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

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

DAS, K., 2013. Wound healing potential of aqueous crude extract of *Stevia rebaudiana* in mice. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 23, 351-357

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

DE-FARIA, F. M. ,et.al. (2012) Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. Journal of Ethnopharmacology. 139, 234– 243

- DE ARMAS, E., SARRACENT, Y., MARRERO, E., FERNÁNDEZ, O., BRANFORD-WHITE, C., (2005). Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract (RMABE) in the treatment of aphthous ulcers: a pilot study. *Current Medical Research and Opinion* 21,1711–1715
- DE-FARIA, F.M., et.al.(2009) Role of SOD in the protection of *Rhizophora mangle* on gastric injury induced by ethanol, ischaemia–reperfusion and acetic acid in rats. *Planta Medica*. 75, 1071
- DIEGELMANN, R.F., EVANS, M.C., 2004. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.* 9, 283-289
- EbaH (Rede social acadêmica) - Informações gerais e propriedades dos taninos
- EbaH (Rede social acadêmica) - Usos farmacológicos e industriais; *Acta Farm. Bonaerense* 22 (3): 265-78 (2003)
- EBNER, F.,et.al.(2002) Topical use of dexpanthenol in skin disorders. *Am. J. Clin. Dermatol.* 3, 427- 433
- FALCÃO, S.C., EVÊNCIO NETO, J., COELHO, A.R.B. (2008) Incorporation by host tissue of two biomaterials used as repair of defects produced in abdominal wall of rats. *Acta. cir. bras.* 23 (1), 78-83
- FARIA,F.M. (2009) Determinação dos Mecanismos de ação Envolvidos nas Atividades Antiulcerogênica e Antioxidantes de *Rizophora mangle* L.
- FERNANDEZ, O., CAPDEVILA, J.Z., DALLA, G., MELCHOR, G. (2002) Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. *Fitoterapia*. 73, 564–568
- GIRALDI, M., HANAZAKI, N. (2010) Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. *Acta bot. bras.* 24 (2), 395-406
- HASLAM,E.(2007) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59: 205-215, 1996



HASLAM,E. (2007) Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime.

Phytochemistry, 68: 2713-2721

HEISE, R., SKAZIK,et.al. ( 2012) Dexpanthenol Modulates Gene Expression in Skin Wound Healing in vivo. Skin Pharmacol Physiol, 25, 241–248

HOUGHTON, P.J.,et.al. (2005) In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example.Journal of Ethnopharmacology, 22, 100-107

KHOSHNEVISZADEH, M.,et.al.(2014). Topical Simvastatin Enhances Tissue Regeneration in Full-thickness Skin wounds in rat models. Iran. J. Pharm. Res. 13,263-269

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

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

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

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

ULGER, B.V.,et.al.(2014). Comparing the effects of nebivolol and dexpanthenol on wound healing: anexperimental study. Int. Wound. J. 1-5

SIMÕES,C.M.O.,et.al.(2010). Farmacognosia: da Planta ao Medicamento, sexta ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC


SONMEZ E., et.al.(2015). The efficacy of absorbable polysaccharide haemostats in wound healing. Blood Coagul. Fibrinolysis. 26, 50-53

TAZIMA, M.F.G.S , VICENTE Y. A.M.V.A.V., MORIYA, T.(2008). Biologia Da Ferida E Cicatrização. 41(3): 259-64

ULGER, B.V.,et.al.(2014). Comparing the effects of nebivolol and dexpanthenol on wound healing: anexperimental study. Int. Wound. J. 1-5

## ANEXO A

AUTORIZAÇÃO DO CPRH PARA UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DE *R.mangle*

**CPRH** Agência  
Estadual de  
Meio Ambiente  GOVERNO DE PERNAMBUCO

CA DRFB N° 120/2014 24 de outubro de 2014.

Ao Senhor  
**JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA**

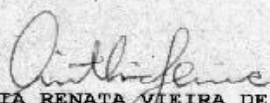
Prezado Senhor,

Cumprimentando Vossa Senhoria, nos reportamos ao Processo CPRH n° 013520/2014, referente ao requerimento para realização de atividades de pesquisa na APA de Santa Cruz e na APA Estuarina de Santa Cruz, sendo o local de coleta às margens do Canal de Santa Cruz e Rio Paripe, próximo a Vila Velha, Ilha de Itamaracá PE.

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

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

Atenciosamente,

  
**CINTHIA RENATA VIEIRA DE LIMA**  
Diretoria de Recursos Florestais e Biodiversidade

## ANEXO B

## PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Pernambuco  
 Centro de Biociências  
 Av. Prof. Moraes Cardoso, s/n  
 50070-910 / Recife - PE - Brasil  
 Fone: (81) 3342-1000  
 e-mail: ufpe.br

Recife, 30 de agosto de 2018

Ofício nº 71/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
 Para: **Prof. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira**  
 Centro de Biociências  
 Departamento de Histologia e Embriologia  
 Universidade Federal de Pernambuco  
 Processo nº 23076.027569/2017-91

Certificamos que a proposta intitulada **"Avaliação do potencial cicatrizante da associação do extrato aquoso de *Rizophora mangle* e ácido tânico a 5% no reparo tecidual de feridas cutâneas em ratos wistar"**, Registrada com o nº0038/2018 sob a responsabilidade de **Prof. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira** 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 6.881, 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 29/08/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2018 a 01/12/2018
Espécie/linhagem/raça	Rato isogênico
Nº de animais	60
Peso/idade	8-12 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Bioterio do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami- (Lika)

## ANEXO C

### SUBMISSÃO DO ARTIGO PARA A REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Dear Dr.(a) Marinho:

Your manuscript entitled "Rizophora mangle and tannic acid: An association in cream to wound healing." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Your manuscript ID is MIOC-2018-0490.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Sincerely,  
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz  
[memorias@fiocruz.br](mailto:memorias@fiocruz.br)

**Dear Anneliese Marinho,**

This is a reminder that you need to verify your primary email address before you can begin adding information such as your affiliation, biography, or keywords manually to your ORCID record. Click the following link and sign into your ORCID record to verify your email address. If you can't click on the link, copy and paste it into your browser's address bar:

<https://orcid.org/verify-email/S1EyMm0ybTlrSEY1WTRmaTdkc1BudFpgQIRBU3F1SE5RNkg1OGxIRll0aVhhbGUwa3RNVWm9MbVdJUEVSLy91UA>

Your 16-digit ORCID identifier is 0000-0001-8237-7714, and your full ORCID iD and the link to your public record is <https://orcid.org/0000-0001-8237-7714> (primary email address: [annelisecosta7@gmail.com](mailto:annelisecosta7@gmail.com)).

If you did not add this email address to your ORCID record, please contact us immediately by replying to this email.

DID YOU KNOW? The ORCID Registry is always evolving. Stay up-to-date on the latest at our blog: <https://orcid.org/blog>

If you have any questions or need help, visit <https://orcid.org/help> or contact us at <https://orcid.org/help/contact-us>

Warm Regards,  
The ORCID Team  
<https://orcid.org/>

***Rizophora mangle* and tannic acid: An association in cream to wound healing.**

**Anneliese Gonçalves Costa Marinho<sup>1</sup>, Leila Bastos Leal<sup>2</sup>, Otacílio Antunes Santana<sup>3</sup>, Sandrine Maria de Arruda Lima<sup>4</sup>, Ana Rosa Brissant de Andrade<sup>5</sup>, Eduarda Santos de Santana<sup>6</sup>, Luzia Abília da Silva<sup>7</sup> Ivone Antônia de Sousa<sup>8</sup>, Jeymesson Raphael Cardoso Vieira<sup>9</sup>**

<sup>1</sup> Mestranda do Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife, PE, Brasil

<sup>6,7,9</sup> Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE- Recife, PE, Brasil

<sup>2,5,8</sup> Departamento de Farmácia do Centro de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Biofísica e Radiobiologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife, PE, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Antibióticos do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife, PE, Brasil.

**BACKGROUND** The treatment of epidermal wounds is important in public health as they show several forms according to their etiological agent.

**OBJECTIVE** This study evaluates the influence of aqueous extract of *Rizophora mangle* leaves associated with 5% of tannic acid in cream (RmAt in cream) in wound healing.

**METHODS** The healing activity was evaluated using 20 rats, divided into four groups (n=5) treated during 5, 10 and 15 days: solution of sodium chloride at 0.9% (Group I), Lannete in cream (Group II), dexpanthenol in cream at 5% (Group III) and RmAt in cream at 5% (Group IV) applied to the dorsal region previously shaved and injured. The

initial and final wound measurements were determined to evaluate the healing activity in the different groups.

**FINDINGS** Although tissue repair is an evolution of the body itself to resolve the wound, many need special care for proper healing . Medicinal plants, such as *Rhizophora mangle* L., have a traditional use for wound healing and its association with tannic acid has potentiated the healing of epidermal wounds. This study aimed to evaluate the healing potential of the aqueous extract of *R. mangle* L. Leaves associated with tannic acid in cream at 5% in surgical wounds of rats through morphometric and histomorphometric studies of the wounds, as well as to macroscopically evaluate the evolution in relation to the controls. Wistar rats (n=20) were submitted to surgical wound and divided into 4 groups (negative control, placebo, standard and treated), which received daily, cutaneous application of a saline solution at 0.9%, 4% lanette cream, dexpanthenol at 5 % in cream and cream of *R. mangle* L. leaf extract at 5%, respectively. They were submitted to euthanasia on the 5th, 10th and 15th days. The treated group showed uniform wounds and no infection, but the morphometric analysis showed no difference on the 15th day between the three groups due to the rectangular shape of the initial wound. On the tenth day, macroscopically it was observed that the degree of contraction in groups I and II did not present great differences between the individuals of the same group with respect to the fifth day. In relation to group I, group II showed a decrease in contraction of the surgical wound on the tenth day. Group II presented a percentage of 20.30%, whereas group I presented in this same period a degree of retraction of 26.75%, found that saline acts positively in several processes such as contact lens sanitization; burns; prepared for microscopy in laboratories; hygienization of the treated area and is also indicated in the replacement of liquids and electrolytes on several occasions, such as hemorrhagic conditions (PIRES ,J.,Uninove,2010). In relation to group III there was a significant retraction level of the wound, but it was in group IV that there was a greater degree of contraction with respect to the fifth day between the animals of the same group and also with respect to the animals of other groups. On the tenth day the degree of retraction of the surgical wound of the tenth day reached 68.27% with respect to the first day of wound induction, while in the groups I, II and III were 26.75%, 20.0% and 52.82%, respectively, relative

to the first day of wound induction. on the 15th day, there was a satisfactory degree of contraction in all the studied groups. The granulation was positive, but in relation to the percentage of contraction of the cutaneous wounds, there was a greater retraction in group IV, both in relation to the other groups in relation to the previous days. The retraction of the wounds of group IV of the fifteenth day, reached 99%. In the clinical examination of the surgical wounds, different characteristics among the 4 groups were evidenced. In subgroup I, there were purulent secretions in two animals with spontaneous resolution during the healing process. In the subgroup the formation of granulation and crust tissue occurred in all animals. At the end of the 15th day, small crust was present in most rats.

The wounds of the subgroups showed crusts and granulation tissue in the animals. Group III revealed a uniformity of wound appearance, with no purulent secretions in operative wounds, and on a regular basis, presenting a good macroscopic scar. In this study, the morphometric analysis of surgical wounds through areas of the 5th, 10th and 15th postoperative lesions is shown in Table on the 5th day, the three groups had a reduction of the wound area, but without significant statistical difference. On the 10th postoperative day, the groups II, III and IV were similar when compared to group I. On the 15th postoperative day, the measurement of the final area in group II was higher than the other groups.

**CONCLUSIONS** The present study showed that topical use of *Rhizophora mangle* leaves associated with tannic acid in cream at 5% has a significant effect on reepithelialization of surgical wounds in rats, assuming that healing is a dynamic and multifactorial process. This study evidences the importance of performing histomorphometry in the correlation with morphometric findings

**Key words:** Histomorphometric Analysis. Morphometric Analysis. *Rizophora mangle*. Tannic Acid. Wound Healing .



## INTRODUCTION

On the equatorial coasts dominated by tide, mangroves are abundant and are of great ecological and economic importance. The sediments, benthic invertebrates and vegetation are closely related in the mangrove environment and interact in an integrated way, so it is essential that their plantation be studied in order to know its relation with the other living beings living in this environment and also its importance for the community that uses the mangrove resources either directly or indirectly (CASTRO & FERREIRA, 2001). As we know that the industry of herbal and medicinal plants in Brazil is a challenge that needs to be overcome, because it represents an excellent alternative for the health area because it is a raw material of low cost, renewable resource, accessibility to the population as a whole and, therefore, there is a need for more and more studies and research to know the secondary metabolites of medicinal plants so that there is efficacy and safety in its application as a medicine without endangering the life of people using such herbal medicines. (FERNANDEZ, et.al 2002). *Rhizophora mangle* is one of five species of the genus *Rhizophora* and has wound healing due to its content of secondary metabolites such as tannins that are polyphenols of molecular weights between 500 and 3000 units of atomic mass. Tannins can form strong complexes with proteins and other macromolecules. (GIRALDI & HANAZAKI, 2010). They can be hydrolyzed and condensed and present several functions as: Inhibit the process of putrefaction in animal skin, have astringent action, are soluble in water, alcohol and ketone. Because they present antioxidant activity and drought of free radicals, they present diverse pharmacological applications like antidiarrheals, antiseptics, hemostatics, protectors, re-epilatory and healing (OLIVEIRA, 2006). The plants have primary and secondary metabolisms. As the primary metabolism of plants, we find cellulose, lignin, proteins, lipids, sugars and other essential substances to perform their vital functions. In the secondary metabolism of plants we find chemically diverse substances that are not even important secondary metabolites for the growth and reproduction of plants, have important functions, such as defense against pathogenic microorganisms, insects and herbivorous animals (Awadh et al. 2001). The main secondary metabolites of plants are phenolic compounds (tannins, phytoestrogens and coumarins); nitrogen toxins (alkaloids, cyanogenic glycosides, glucosinolates, toxic amino acids, lecithins and protease inhibitors); terpenes

(sesquiterpene lactones, cardiac glycosides, saponins); and polyacetylene hydrocarbons and oxalates (Neto et al. 2006). The *Rizophora mangle* popularly known as red mangrove is presented as a primary source of carbon in the mangrove dominated habitat (MARRERO, et al. 2006). In this work the healing activity of the aqueous extract of *Rizophora mangle* associated with tannic acid 5% in cream base was investigated.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

The *Rhizophora mangle* leaves were collected in mangrove area in Itamaracá, located on the Northern coast of the State of Pernambuco. A voucher specimen was deposited at herbarium of the Center of Biosciences in Federal University of Pernambuco (UFPE) Brazil under number 23076.025194 / 2012-10.

### Preparation of the aqueous extract

The aqueous extract of *Rizophora mangle* leaves was prepared by crushing 1 kg of fresh leaves and they were infused with distilled water (40° C for 10 minutes) and filtered. Two liters of water were used for one kg of the leaf extract of *Rizophora mangle*. The solvent was removed in Liofil L101 lyophilizer (MCCLOUD, et al., 1988; LEITE, 2003). After lyophilization, the dried extract residue was stored at 5° C.

### Tannic acid

Tannic acid (250g) was commercially available as a water-soluble powder with gallic acid content (dry basis) Max. 3.0% / Density 0.35 0.45g / cm<sup>3</sup> / pH (1% in water) 3, 4.0 / Solubility (20% in water).

### Preparation of cream

The cream was produced at 5% in a combination of *Rhizophora mangle* and tannic acid. The cream was performed in a concentration of 5% (2.5% of aqueous extract of *R. mangle* and 2.5% of tannic acid). The aqueous extract of *R. mangle* leaves associated with tannic acid was weighed in a digital analytical balance (Shimadzu trademark ATY 224) using the paper until it reached 3g and poured into porcelain grains. It was solubilized with distilled water and homogenized in a watch glass and the anionic emulsion was weighed until reaching

60 grams in gral containing the previously solubilized *R. mangle* extract and homogenized until total solubilization. The pH was measured and maintained between 5.5 and 6.5. It was packed in plastic pot composing the aqueous extract of *R. mangle* leaves associated with tannic acid in cream at 5% (RmAt in cream).

### **Experimental animals**

Twenty female wistar rats, from the same reproductive line, aged 8 to 12 weeks, from the Federal University of Pernambuco - Brazil, were randomly divided into four groups of 5 animals: I (solution of sodium chloride at 0.9%), II (Lannete in cream) III (dexpantenol 5%) and IV (RmAt in cream at 5%). It was approved in the Bioethics Committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco (UFPE) - Brazil under number 23076.027569/2017- 91. The animals were maintained at  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , with relative humidity 44 to 56% and light and dark cycles of 10 and 14 h, respectively, for 1 week before and during the experiments. The animals received standard diet (Labina purina®, Brazil) and water *ad libitum*. All experiments were performed in the morning in accordance with current guidelines for laboratory animal care and ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals. The amount applied on each wound was 10 mL.

### **Wound healing activity**

The animals were previously weighed and anesthetized with ketamine hydrochloride (10 mg/kg Ketamin®), xylazine hydrochloride (0.5 mg/kg, Anasedan®) and 0.9% saline solution, associated in the same syringe and administered intramuscularly. Each rat was subjected to the demarcation of the area to wound induction with subsequent trichotomy in the dorsal region and positioned on the operating table in prone position. After asepsis of the dorsal region with 70% alcohol, the induction of a square wound with about  $4\text{cm}^2$  wide was conducted in the rat skin. The skin fragment was removed from the center of the shaved area to display the dorsal muscular fascia, using a 15 scalpel. After surgery, the rats were subjected to the corresponding treatment. The application was performed daily, once a day. Moreover, the aspect of the wound was described during the research in different groups. On the 5th day, the measurement was performed on the wound area (length and width) using a pachymeter, without removing the skin fragment. After 10 and 15 days, the animals were anesthetized as

described above, and using a scalpel 15 surgical fragments were removed with a margin of 1cm around the lesion to the dorsal musculature of the animal for the histomorphometric analysis. The removed tissue was placed in formalin at 10% for 24 hours at room temperature and processed for light microscopy. After the fragments collection procedure, the animals were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber. Initial and final measurements for each wound in different groups and periods were performed for the morphometric analysis using a Digimess universal pachymeter to calculate the rate of the wound healing. It was used the degree of contraction expressed in percentage by the equation proposed by Ramsey et al. (1995), where Wo is the initial area and Wi is the final area: % of contraction =  $(W_o - W_i)/W_o \times 100$

TABLE I

The table below shows the mean and standard deviation at the 5,10 and 15 day periods, as well as their contraction percentage and their significance value

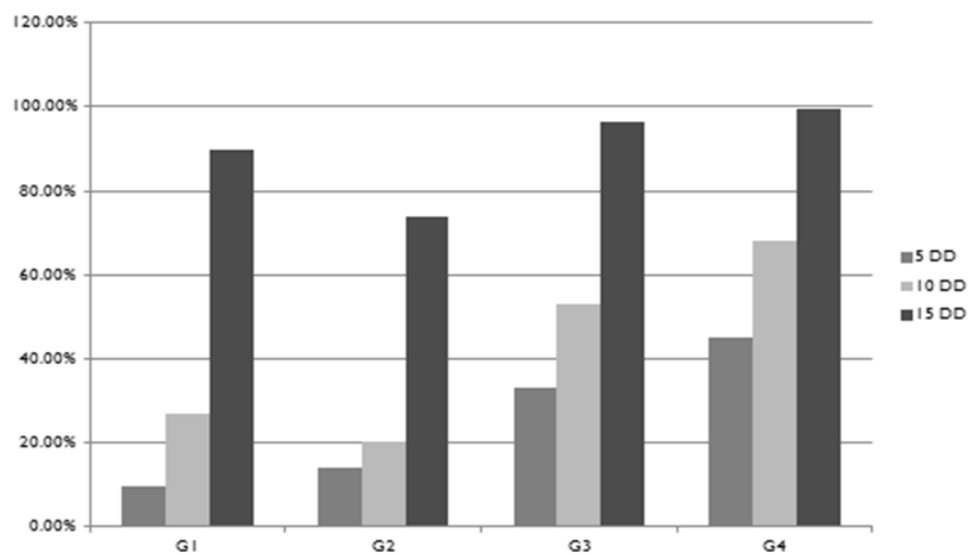
Evaluation period	saline solution (NACL)	placebo-Lannete cream at 4%	Dexpanthenol at 5%	Association of Rizophora mangle to tannic acid in cream at 5%
After surgery	(n=5) mean $\pm$ standard deviation	(n=5) mean $\pm$ standard deviation	(n=5) mean $\pm$ standard deviation	(n=5) mean $\pm$ standard deviation
initial	4cm <sup>2</sup> $\pm$ 0,00	4cm <sup>2</sup> $\pm$ 0,00	4cm <sup>2</sup> $\pm$ 0,00	4cm <sup>2</sup> $\pm$ 0,00
5 days	3,624 cm <sup>2</sup> $\pm$ 3,570 cm <sup>2</sup>	3,43cm <sup>2</sup> $\pm$ 3,45cm <sup>2</sup>	2,669cm <sup>2</sup> $\pm$ 2,673cm <sup>2</sup>	2,203cm <sup>2</sup> $\pm$ 2,160cm <sup>2</sup>
%Contraction with 5 days	9,40%	14,25%	33,27%	44,93%
P	p<0,03	p<0,03	p<0,03	p<0,03
10 days	1,070cm <sup>2</sup> $\pm$ 0,921cm <sup>2</sup>	3,188cm <sup>2</sup> $\pm$ 3,115cm <sup>2</sup>	1,887cm <sup>2</sup> $\pm$ 1,741cm <sup>2</sup>	1,269cm <sup>2</sup> $\pm$ 1,288cm <sup>2</sup>
%Contraction with 10 days	26,75%	20,30%	52,82%	68,27%
P	p<0,05	p<0,02	p<0,02	p<0,02
15 days	0,418cm <sup>2</sup> $\pm$ 0,381cm <sup>2</sup>	1,040cm <sup>2</sup> $\pm$ 0,912cm <sup>2</sup>	0,15cm <sup>2</sup> $\pm$ 0,16cm <sup>2</sup>	0,020cm <sup>2</sup> $\pm$ 0,018cm <sup>2</sup>
%Contraction with 15 days	89,55%	74%	96,25%	99,5%
P	p<0,05	p<0,08	p<0,05	p<0,05

The table shows the mean and standard deviation in the evaluated days, their contraction percentage for each analyzed period and also their significance value in the same periods of analysis. Significant difference  $\leq 5\%$ .

Through the Mann-Whitney test for comparisons between groups at each evaluation time with comparisons of said test. Through the Mann-Whitney test for comparisons between the times of evaluation in each group.

#### MORPHOMETRIC ANALYSIS

Graph 1 below shows the percentage of morphometric contraction quantitatively in 5,10 and 15 days of analysis according to the group and the time of evaluation after the surgical procedure in vivo.



Graph 1: Shows the periods of 5,10 and 15 days, showing its degree of contraction in the areas of healing

## HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS

**Analysis of reepithelialization of Groups G1, G2, G3 and G4 in 10 days:**

Patients	Reepithelialization G1 %	Reepithelialization G2 %	Reepithelialization G3 %	Reepithelializati on G4 %	p G4 X G3	p G4XG2	p G4XG1
CM	36,78	34,81	58,97	67,98	P<0,03	p<0,05	p<0,01
RM	34,60	38,81	71,42	67,20	P<0,03	p<0,05	p<0,01
LM	24,50	45,53	49,25	82,73	P<0,03	p<0,05	p<0,01
CR	29,86	58,57	54,84	37,46	P<0,03	p<0,05	p<0,01
CRL	35,64	44,24	56,55	41,80	P<0,03	p<0,05	p<0,01
MEAN	32,28	20,96	29,63	54,74	P<0,03	p<0,05	p<0,01

Table 2 Treatment with 10 days of re-epithelization in percentage of wounds according to the treated substance and also shown the degree of significance of the first three groups in relation to the group treated with the Association of EAF *R.mangle* to tannic acid at 5%.

### Analysis of reepithelialization of Groups G1, G2, G3 and G4 in 15 days

Patients	Reepithelialization G1 %	Reepithelialization G2 %	Reepithelialization G3 %	Reepithelialization n G4 %	p G4 X G3	p G4XG2	p G4XG1
CM	60.86	68,47	84,02	96,66	P<0,01	P<0,01	P<0,01
RM	77.32	65,96	84,26	92,45	P<0,01	P<0,01	P<0,01
LM	66.37	66,97	84,90	95,77	P<0,01	P<0,01	P<0,01
CR	64.78	64,39	86,59	96,53	P<0,01	P<0,01	P<0,01
CRL	64.46	64,39	85,51	97,96	P<0,01	P<0,01	P<0,01
MEAN	66.75	66,13	85,05	95,87	P<0,01	P<0,01	P<0,01

Table 3 15-day re-epithelization treatment in percentages of wounds according to the treated substance and also shown the degree of significance of the first three groups in relation to the group treated with the EAF Association R.mangle to 5% tannic acid.



## STATISTIC ANALYSIS

The data were analyzed through descriptive statistical measures: mean, standard error of the mean or standard deviation and median and inferentially by statistical tests:

MANN - WHITEY in the comparison between groups, and paired t-Student in the comparison of the initial evaluation with the other evaluations. In the case of significant differences by the test MANN –WHITNEY multiple comparisons test was applied.

The margin of error used in the statistical test decisions was 5%. The statistical program used to enter the data and obtain the statistical calculations was the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) in version 21.

## RESULTS

In the clinical examination of the surgical wounds, different characteristics among the 4 groups were evidenced. In group I, there were purulent secretions during the first three days of treatment in three animals with spontaneous resolution during the healing process. In group II there was no retraction of the wound in a timely manner, and in the first two days there was secretion in all the animals. In group III the formation of granulation and crust tissue occurred in all animals in a period of 3-4 days. In group IV the formation of granulation and crust tissue occurred in all animals in a period of 2-3 days. In the fourth day, significant retraction of a clean wound was observed and on the fifth day, hairs on the dorsal region grew with an excellent macroscopic aspects.

The areas of wounds were measured and the percentage of contraction were calculated for the wound healing evaluation (Table I). In 5, 10 and 15 days of treatment there was a significant statistical difference between the groups ( $p < 0.005$ ). Group IV showed the major degree of contraction comparing to the others. After 5 days of the first induction of the wound, it was observed that there was retraction in all the groups studied, but group IV showed a greater potential of cicatrization than the others and the beginning of cicatrization happened before the other groups. the group I treated with NaCl presented purulent secretion the first three days after wound induction. From the fourth day, according to macroscopic observation the wound was still hyperemic. On the fifth day, an aspect of retraction of the wound began to appear. group II treated with placebo, namely 4% lanette cream presented non-specific secretion, but without purging

and the level of wound contraction was higher than group I from the third day. At the end of the fifth day it was observed macroscopically a greater level of retraction of the wound in relation to the group I. Groups III and IV were the groups that presented a higher percentage of worsening in all treated animals. Group III, treated with 5% dexpanthenol presented satisfactory contraction and there was also no secretion in any of the animals treated with this substance, however group IV treated with a combination of rizophora mangle leaf extract cream and 5% tannic acid had a much higher contraction level in all groups, with a retraction of the wound up to 44%. The treated group showed uniform wounds and no infection, but the morphometric analysis showed no difference on the 15th day between the three groups due to the rectangular shape of the initial wound. On the tenth day, macroscopically it was observed that the degree of contraction in groups I and II did not present great differences between the individuals of the same group with respect to the fifth day. In relation to group I, group II showed a decrease in contraction of the surgical wound on the tenth day. Group II presented a percentage of 20.30%, whereas group I presented in this same period a degree of retraction of 26.75%, found that saline acts positively in several processes such as contact lens sanitization; burns; prepared for microscopy in laboratories; hygienization of the treated area and is also indicated in the replacement of liquids and electrolytes on several occasions, such as hemorrhagic conditions (Pires,J.,Uninove,2010).

In relation to group III there was a significant retraction level of the wound, but it was in group IV that there was a greater degree of contraction with respect to the fifth day between the animals of the same group and also with respect to the animals of other groups. On the tenth day the degree of retraction of the surgical wound of the tenth day reached 68.27% with respect to the first day of wound induction, while in the groups I, II and III were 26.75%, 20.0% and 52.82%, respectively, relative to the first day of wound induction. on the 15th day, there was a satisfactory degree of contraction in all the studied groups. The granulation was positive, but in relation to the percentage of contraction of the cutaneous wounds, there was a greater retraction in group IV, both in relation to the other groups in relation to the previous days. The retraction of the wounds of group IV of the fifteenth day, reached 99%.

Figure 3: shows the degree of contraction between the different groups in 5, 10 and 15 days in percentagGroup IV showed a major wound healing activity with 99.5%

of contraction in 15 days. Degree of contraction of group III was similar to the group IV.

## DISCUSSION

In clinical examination of the surgical wounds, group I showed purulent secretions during the first three days of treatment. In group IV the formation of granulation and crust tissue occurred in all animals in a period of 2-3 days. ARAÚJO (2015) studying surgical wounds in mice treated with *R. mangle* in cream revealed that the group treated with *R. Mangle* in cream showed uniform and uninfected wounds when compared to the groups treated with NaCl solution and dexpanthenol which showed granulation tissue with infectious wound processes during the study period. The *Rhizophora* genus has certain substances present in the extract, such as tannins and polyphenols (BANDARANAYAKE, 2002), which are capable of interacting with peptide structures forming large clusters, which would explain the formation of the protective film. This film must be related to the complex formed by non hydrolyzable tannins with proteins, which can exert a protective action by isolating the wound from the environment (FERNANDEZ et al. 2002, PERERA et al. 2010). FERNANDEZ, et al. (2002) showed similar results and observed a dark red film covering the pilonidal cyst wounds in the patients treated with the *R. mangle* L. stem extract. There were no secondary infections at the site; the wounds were dry throughout the clinical evaluation process. PERERA, et al. evaluating the anti-ulcerogenic activity of *Rizhophora mangle* L. extract showed the presence of a thick layer adherent to the gastric mucosa suggesting a physical barrier with gastroprotective properties similar to those observed in cutaneous wounds. Another hypothesis is that the antibacterial action of the tannins reduces the risk of wound infection, avoiding the delay of the cicatrization. MELCHOR, et al. studied the aqueous extract of the stem of *Rhizophora mangle* L. demonstrating antibacterial properties attributing the action to the polyphenolic constituents present in the extract. Phytochemical studies of *R. mangle* L. stem extracts showed the presence of tannins. BUENO, et al reinforced that tannins influence the physiology of skin cells through their pharmacological properties, increasing cell proliferation. The results of the evaluation of the areas of surgical wounds on the 10th postoperative day showed a superior reduction on groups III and IV when compared to groups I and II. These results corroborate with the pre-clinical studies of Sánchez et al. (2009), who studied the cicatricial action of extracts of *Rhizophora mangle* L. on open cutaneous wounds of rats with

reduction of the areas on the 5th postoperative day. In all groups on the 15th postoperative day, there was reduction of wound areas. However, open wounds show different clinical problems from incised and sutured wounds. Although the basic morphological and chemical processes that act on the closed wound are the same in open wound healing, contraction becomes an important aspect in open wounds, and epithelization plays a prominent role (COELHO, et al, 1999). The two processes seem to be independent (MADDEN & AREM, 1991). The two processes seem to be independent The contraction of the wound is favored in places where the skin is more loose and mobile, such as the skin of the trunk (RAMSEY, et al., 1995). Skin mobility depends on the direction of the "Langer lines", which is determined by the arrangement of the skin fibrillar system, especially elastic fibers. The maximum distension occurs transverse to the Langer lines, which is why the contraction of the wound occurs in this direction (ALGOWER, 1977). In our study, there was a statistical difference regarding to the contraction of surgical wounds on the 15th day. The contraction of the wounds and the reepithelization are effective in miscellaneous processes of treatment and healing of wounds. This study used aqueous extract of *R. mangle* leaves associated with tannic acid in cream corroborating with the findings of efficacy in the use of vegetables to produce phytotherapies from the folk medicine. In accordance with the tables below, the percentage of retraction with the animals of the treated group with the association of *Rizophora mangle* and 5% tannic acid, show that the cream presents a score of wound healing in less than those of the most. In the comparison of the group of animals treated with 5% dexpanthenol and that are presenting a good healing with a value of similar significance to group IV, the healing period of group IV is less than any other group studied. Histomorphometric analysis showed that the mean distance between the epithelia of the surgical wound was higher in the saline group after 10 days, presenting a statistical difference with the other groups, presenting the highest mean observed in the group, presented a statistically significant difference with dexpanthenol to 5% and to the 5% cream of EAF *R.mangle* Association to tannic acid. In addition, it is important to note that the use of dexpanthenol in the treatment of skin lesions has been reported in several studies, high. The most significant effects of formulations containing 5% dexpanthenol include stimulation of epithelization, granulation and relief of pruritus (EBNER, et al., 2002). However, in the evaluation after 15 days of treatment, all 5 animals medicated with the 5% cream of *R.mangle* EAF Association associated with tannic acid indicated complete re-epithelialization of the

wounds. This can be attributed to the presence of tannins in this plant, since they contribute to the formation of a protective layer on the skin and mucous membranes, acting on inflammatory processes, causing a restructuring of the epithelium and neovascularization (SIMÕES, et al., 2010). This film can exert a protective action by isolating the wound from the environment, significantly accelerating tissue repair in the group treated with the 5% EAF *R.mangle* Association cream. It was also observed in the present study that there was an increase in the amount of fibroblasts in the *R.mangle* EAF Association group, with statistical difference, compared to the others in the 15 day interval. ULGER, et al. (2014) believe that the improvement in the rate of wound healing is due to increased proliferation of fibroblasts as well as accelerated epithelization. In addition, several other studies show the importance of fibroblasts in the cicatricial process (DIEGELMANN and EVANS, 2004; EBNER, et al., 2002; KHOSHNEVISZAEH, et al., 2004; SONMEZ, et al., 2015). It is suggested that this stimulating activity of dermis fibroblasts in the group of the plant studied is due to the presence of hydrolyzable tannins (BUENO, et al., 2014). In our study, there was statistical difference in relation to the contraction of surgical wounds on the 15th day. Wound contraction and reepithelialization are effective in various wound healing and wound healing processes. This study used aqueous extract of leaves of *R. mangle* associated with tannic acid in cream at 5%, corroborating with the findings of efficacy in the use of vegetables for the production of herbal medicines from popular medicine. Therefore, the importance of histomorphometry in the studies is emphasized, since only from the microscopic analysis it was possible to evaluate the degree of reepithelialization of the wound, showing that the groups that used 5% dexpanthenol cream and the Association of EAF *R.mangle* to 5% tannic acid in cream were far superior to that of saline and 4% lannete cream, as they obtained a faster and more efficient cicatricial process. Of all the analyzed groups, the one that obtained the best healing results was the Association of EAF *R.mangle* to tannic acid in cream at 5%. However, further studies are needed to prove the healing potential of this plant, as well as to investigate other therapeutic activities that this species may present.

## CONCLUSION

The results of the present study show that topical use of association of EAF. *R. mangle* with tannic acid at 5% in cream has a significant effect on reepithelialization of surgical wounds in rats. Assuming that healing is a dynamic and multifactorial process, this study evidences the importance of performing histomorphometry in the correlation with morphometric findings. However, the isolation of plant component(s) responsible for the positive influence on the tissue repair process should be performed.

The isolation of the plant component (s) responsible for the positive influence on the tissue repair process should be performed.

The association between tannic acid and *Rhizophora mangle* has shown that one potentiates the action of the other because they are tannin drugs, essential for the healing of wounds.

Topical application of *Rhizophora mangle* leaf cream associated with tannic acid in 5% cream reduced the area of the wound, stimulated reepithelialization and increased the number of fibroblasts, exhibiting a healing action in the cutaneous lesions in rats more efficient than the cream of 5% dexpanthenol.

The association between tannic acid and *Rhizophora mangle* has shown that one potentiates the action of the other because they are tannin drugs, essential for the healing of wounds.

Topical application of *Rhizophora mangle* leaf cream associated with tannic acid in 5% cream reduced the area of the wound, stimulated reepithelialization and increased the number of fibroblasts, exhibiting a healing action in the cutaneous lesions in rats more efficient than the cream of 5% dexpanthenol. Therefore, with the accomplishment of new researches, this plant can be an alternative therapeutic means in the process of tissue repair, bringing several benefits to the population

## REFERENCES

ALGOWER, M. (1977) Manual de Cirurgia, Barcelona: Científicomédica;3-14.

ARONS, J.A., WAINWRIGHT, D.J., JORDON, R.E. (1992) The surgical applications and implications of cultured human epidermis: a comprehensive review. *Surgery*. **111**(1); 4-11

- BALBINO, C.A., PEREIRA, L.M., CURI, R. (2005) Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol **41**, n. 1, jan./mar.; 27-51
- BANDARANAYAKE, W.M. (2002) Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetlands Ecology and Management*, **10**; 421–52
- BERENGUER, B., et.al. (2006) Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. *Journal of Ethnopharmacology*. **103**; 194–200
- BIRO, K., THACI, D., OCHSENDORF, F.R., KAUFMANN, R., BOEHCKE, W.H. (2003) Efficacy of dexpanthenol in skin protection against irritation: a double-blind, placebo-controlled study. *Contact Dermatitis*, **49**; 80–84
- BUENO, F.G., et.al. (2014) Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Fitoterapia* **99**; 252–260
- CHEN, Z.P, CAI, Y., PHILLIPSON, J.D., (1994). Studies on the Anti-Tumour, Anti-Bacterial, and Wound-Healing Properties of Dragon's Blood. *Planta Med*, **60**; 541-545
- CLARK, R.A.F. (1996) Wound repair: overview and general considerations. In: Clark, R.A.F. (Ed.). *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum Press, 3-50
- CURRIE, L.J., SHARPE, JR., MARTIN, R. (2001) The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast Reconstr Surg*. **108**(6);1713-1726
- COELHO, M.C.O., REZENDE, C.M.F., TENÓRIO, A.P.M. (1999) Contraction of wound after cover with temporary skin substitutes. *Ciência Rural*, **29** (2); 297-303
- DE MORAES, A.,M., ANNICHINO-BIZACHI, J.M., ROSSI, A.B.R. (1998) Use of autologous fibrin glue in dermatologic surgery. *Rev Paul Med* **116**; 1747-1752
- DEALEY, C. (1996) Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras. Coordenação e revisão de Rúbia Aparecida Lacerda; tradução Eliane Kanner. São Paulo: Atheneu, p. 1 – 25

DE ARMAS, et.al. (2005) Efficacy of *Rhizophora mangle* Aqueous Bark Extract (RmABE) in the treatment of aphthous ulcers: a pilot study. Current Medical Research and Opinion **21**;1711–1715

DE ARMAS, et.al. (2005) Efficacy of *Rhizophora mangle* Aqueous Bark Extract (RmABE) in the treatment of aphthous ulcers: a pilot study. Current Medical Research and Opinion **21**;1711–1715

DE-FARIA,et.al.(2009) Role of SOD in the protection of *Rhizophora mangle* on gastric injury induced by ethanol, ischaemia–reperfusion and acetic acid in rats. Planta Medica. **75**; 1071

DE-FARIA, et.al.(2012) Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. Journal of Ethnopharmacology. **139**; 234– 243

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

FERNANDEZ, O.,et.al. (2002) Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. Fitoterapia. **73**; 564–568

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

HEISE, R.,et.al. ( 2012) Dexpanthenol Modulates Gene Expression in Skin Wound Healing in vivo. Skin Pharmacol Physiol, **25**; 241–248

HOUGHTON, P.J.,et.al.(2005) In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example.Journal of Ethnopharmacology, **22**; 100-107

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

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



- MADDEN, J., AREM, A. (1991) A cicatrização das feridas. Aspectos biológicos e clínicos. In: SABISTON, D. Tratado de Cirurgia. 14 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;156-168
- MANDELBAUM, S.H., DI SANTIS, E.P.,MANDELBAUM, M.H.S. (2003) Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares: parte I. Anais Brasileiro de Dermatologia. **78** (5); 525-542
- MARRERO, E. ,et.al. (2006) COX-2 and sPLA2 inhibitory activity of aqueous extract and polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). Fitoterapia. **77**; 313–315
- MCCLOUD, T.,et.al. (1988) Extraction of Bioactive Molecules from plants . Proceedings of the International Congress on Natural Products Research, Park City, UT;17–21
- MEDEIROS, M.F.T., FONSECA, V.S., ANDREATA, R.H.P. (2004) Plantas medicinais e seus usos pelos sitiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. Acta bot. bras. **18** (2); 391-399
- MELCHOR, G., et.al. (2001) Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* Bark. Fitoterapia. **72**; 689-691
- MIRANDA, L.T.G.S.(2001) Uso da tintura de arnica em feridas cutâneas abertas em ratos. [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo
- OFORI-KWAKYE, K., KWAPONG, A.A., BAYOR, M.T. (2011) Wound healing potential of methanol extract of *Spathodea campanulata* stem bark formulated into a topical preparation. Afr J Tradit Complement Altern Med, **8** (3); 218-223
- PERERA. L.M.S., Ruedas, D., Gómez, B.C. (2001) Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. Journal of Ethnopharmacology, **77**; 1–3
- PERERRA, L.M.S ,et.al.(2010) Pharmacological and toxicological evaluation of *Rhizophora mangle* L., as a potential antiulcerogenic drug: Chemical composition of active extract. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. **2** (4); 56-63

- PETROIANU, A., SILVA, A.A., MELO, M.A.B. (2001) Comparação entre cola biológica e sutura em cicatrização de pele. *Rev Col Bras Cir* **28**;249-253
- PINTO, E.P.P., AMOROZO, M.C.M., FURLAN, A. (2006) Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil. *Acta bot. bras.* **20** (4); 751-762
- REVATHI, P., SENTHINATH, T. J., THIRUMALAIKOLUNDUSUBRAMANIAN , P. and PRABHU, N. (2013) Medicinal Properties of Mangrove Plants – an overview. *International Journal of Bioassays*. 02 (**12**): 1596-1600
- ROIG, J.T. (1988) Plantas medicinales, aromaticas y venenosas de Cuba. Editorial Científica y Técnica. La Havana-Cuba. **164**; 606-607
- RAMSEY, D.T.,et.al.(1995) Effects of three occlusive dressing materials on healing of full thickness skin wounds in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.**56**, n.7; 941-949
- SÁNCHEZ, J.,et.al. (2006) Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. *Fitoterapia* **77**; 141–143
- SÁNCHEZ, J.,et.al. (2009) Propiedades antioxidantes de *Rhizophora mangle* (L.) y su relación con el proceso de curación de heridas en ratas. *Rev. Salud Anim*, **31** (3); 170-175
- STOZKOWSKA, W., PIEKOS, R. (2004) Investigation of some topical formulations containing dexpanthenol. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **61** (6); 433-437
- TSUCHIYA, H.,et.al.(1996) Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. **50**; 27-34