



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA**

EDUARDA SANTOS DE SANTANA

**HIDROGÉIS A BASE DA ASSOCIAÇÃO DE *RHIZOPHORA MANGLE* E
ÁCIDO ASCÓRBICO: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÕES
CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA**

Recife

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

EDUARDA SANTOS DE SANTANA

HIDROGÉIS A BASE DA ASSOCIAÇÃO DE *RHIZOPHORA MANGLE* E
ÁCIDO ASCÓRBICO: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÕES
CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA

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

Área de concentração: Morfotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Leila Bastos Leal

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Santana, Eduarda Santos de

Hidrogéis a base da associação de *Rhizophora mangle* e ácido ascórbico: desenvolvimento e avaliações citotóxica e imunomoduladora / Eduarda Santos de Santana- 2019.

83 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

Coorientadora: Leila Bastos Leal

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Morfotecnologia. Recife, 2019.

Inclui referências e anexos

1. Fitoterápicos 2. Cicatrização 3. Hidrogel I. Vieira, Jeymesson
Raphael Cardoso (orient.) II. Leal, Leila Bastos (coorient.) III. Título

615.537

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-012

EDUARDA SANTOS DE SANTANA

**HIDROGÉIS A BASE DA ASSOCIAÇÃO DE *RHIZOPHORA MANGLE* E
ÁCIDO ASCÓRBICO: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÕES
CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA**

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

Aprovada em: 13/12/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ricardo Yara (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Elayne Karine Souto de Melo (Examinadora Externa)
Centro Universitário Maurício de Nassau

Dedico esta dissertação aos meus pais Manoel Santana e Cláudia Santana por sempre acreditarem nos meus sonhos, aos meus irmãos e amigos pelo estímulo na busca do conhecimento como também a todos os integrantes da Família Santana e professores da UFPE pelo apoio para realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me concedeu a oportunidade de ampliar meus conhecimentos, sempre me sustentando e guiando meus passos com sua imensa graça e amor.

Aos meus pais Manoel Santana e Cláudia Santana por todo apoio na realização dos meus sonhos com cuidado e amor, sem vocês as minhas conquistas não têm sentido.

Aos meus irmãos Cláudio, Felipe, Wanderson e Rafael por todo carinho e incentivo nessa jornada.

Aos membros da Família Santana representados por meus avós Manoel Santana e Maria Santana que se alegram comigo em momentos de alegria e são meu suporte em momentos difíceis.

Aos membros da Família Santos por todo carinho em especial aos meus avós *in memoriam* Ester Santos e Lino Santos que sempre me apoiaram.

Aos meus irmãos em Cristo (IBMR, 1^aIBBT e 2^aIBBT) que sempre colocaram minha vida em suas orações.

Ao Professor Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira, por guiar meus passos na vida acadêmica com sabedoria, paciência e rigidez ao mesmo tempo com imenso carinho.

À Professora Dr^a. Leila Bastos Leal pela orientação e oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho, como também pelo acolhimento em seu laboratório proporcionando novas experiências.

Aos integrantes do Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) Juliana, Asley, Thalita, Ana Rosa e Isabelle por todo apoio e experiências adquiridas nos dias de laboratório, tendo um agradecimento especial a Irla Barbosa e Luzia Abílio por colaborar em todas as etapas do projeto com dedicação e carinho.

À Professora Dr^a. Cristiane Moutinho Lagos de Melo e os integrantes do Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais (LAIA) por toda colaboração e conhecimento compartilhado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia que colaboraram para minha formação profissional.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia e do Departamento de Histologia e Embriologia (UFPE) que sempre foram solícitos durante o meu processo de formação.

Aos meus colegas da turma de 2018 da Pós-graduação em Morfotecnologia pelas alegrias diárias como também o conhecimento multiplicado durante todo o curso.

Às amigas que ganhei com a Pós-graduação Janayze Suéllen e Isabel Michely pelos momentos de alegria compartilhados e a parceria que tivemos em todo o curso como também a oportunidade de ganhar lindos e amorosos sobrinhos que são Miguel e Diego, que levarei por toda a vida.

Aos meus amigos e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

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

(Josué 1:9)

RESUMO

O desenvolvimento galênico de fitoterápicos tópicos tem sido objeto frequente de pesquisas, incluindo produtos com ação cicatrizante. Dentre o grande arsenal da flora brasileira, a *Rhizophora mangle* (*R. mangle*), apresenta, dentre seus fitoconstituintes, os polifenólicos, substâncias com conhecida ação cicatrizante e anti-inflamatória. O ácido ascórbico é um ativo fundamental na síntese de colágeno e elastina, atuando na reparação tecidual sendo neste trabalho associado ao extrato aquoso liofilizado da *R. mangle* com o intuito de estimular a ação cicatrizante. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e as avaliações citotóxica e imunomoduladora por citometria de fluxo de hidrogéis a base de *R. mangle* + Ácido Ascórbico. No estudo de pré-formulação foram testados três diferentes polímeros gelificantes, o polímero escolhido como base para o hidrogel foi avaliado quanto as características organolépticas, determinação de pH, reologia e espalhabilidade. No estudo pré-clínico de avaliação citotóxica os esplenócitos dos camundongos (10^6 células/poço) foram tratados com as formulações nas concentrações de 0,05%, 0,1% e 0,2% para a análise de viabilidade celular utilizando anexina V e iodeto de propídio. Em seguida com a concentração de 0,1% foi realizado o ensaio de proliferação celular com 5-(6)-Carboxyfluorescein-diacetate-N-succinimidyl-ester (CFSE), a medição dos níveis de citocinas nos sobrenadantes dos linfócitos pelo Cytometric Beads Matrix System (CBA) e avaliação da ativação e inibição de linfócitos também para o perfil imunológico. O polímero selecionado como base das formulações foi a goma xantana 1,5%, que se apresentaram homogêneas, cor alaranjada, superfície lisa, brilho intenso, translúcida, odor típico dos ativos, comportamento não-Newtoniano do tipo pseudoplástico e pH entre 5,0 e 5,3. O resultado da avaliação pré-clínica demonstrou o perfil não citotóxico, induzindo proliferação, ativação de subunidades de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e NK, além da produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-17 e TNF- α em esplenócitos estimulados. Os resultados sugerem que os hidrogéis a base de *R. mangle* + Ácido Ascórbico podem vir a ser preparações promissoras no processo de cicatrização de feridas.

Palavras-chaves: *Rhizophora mangle*. Ácido Ascórbico. Hidrogel. Cicatrização. Citotoxicidade. Fatores imunológicos.

ABSTRACT

Galenic development of topical herbal medicines has been the subject of frequent research, including products with healing action. Among the great arsenal of the Brazilian flora, *Rhizophora mangle* (*R. mangle*). Ascorbic acid is a fundamental active in the synthesis of collagen and elastin, acting in tissue repair being in this work associated with the freeze-dried aqueous extract of *R. mangle* with the purpose of stimulating the healing action. Object of this study, presents, among its phytoconstituents, the polyphenols, substances with known healing and anti-inflammatory action. Given the above, this study aimed to develop and evaluate cytotoxic and immunomodulatory flow cytometry of *R. mangle* + Ascorbic Acid hydrogels. In the preformulation study three different gelling polymers, the polymers chosen as the base for the hydrogel were tested followed by evaluation of organoleptic characteristics, pH determination, rheology and spreadability. In the preclinical cytotoxic evaluation study mouse splenocytes (10^6 cells / well) were treated with formulations at concentrations of 0,05%, 0,1% and 0,2% for cell viability analysis using annexin V and propidium iodide. Then at the concentration of 0,1% the cell proliferation assay was performed with 5- (6) - Carboxyfluorescein-diacetate-N-succinimidyl ester (CFSE), the measurement of cytokine levels in lymphocyte supernatants by the Cytometric Beads Matrix System. (CBA) and evaluation of lymphocyte activation and inhibition also for the immune profile. The polymer selected as the basis of the formulations was 1,5% xanthan gum, which were homogeneous, orange in color, smooth surface, intense gloss, typical odor of the actives, non-Newtonian pseudoplastic behavior and pH between 5,0 and 5,3. The result of the preclinical evaluation demonstrated the non-cytotoxic profile, inducing proliferation, activation of CD4⁺T, CD8⁺T and NK T lymphocyte subunits, as well as the production of IL-2, IL-4, IL-10, IL-17 and TNF- α in stimulated splenocytes. The results suggest that *R. mangle* + Ascorbic Acid hydrogels may be promising preparations in the wound healing process.

Keywords: *Rhizophora mangle*. Ascorbic acid. Hydrogels. Healing. Cytotoxicity. Immunological factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Manguezal distrito de Vila Velha, em Itamaracá-PE.....	23
Figura 2-	Morfologia da planta <i>Rhizophora mangle</i>	25
Figura 3-	Fluxograma do estudo.....	39
Figura 4-	Desenvolvimento dos hidrogéis com polímeros hidroxietilcelulose e Goma Xantana a base da associação entre o extrato aquoso de <i>Rhizophora mangle</i> e o Ácido Ascórbico.....	42
Figura 5-	Desenvolvimento dos hidrogéis com polímero Poloxamer 407 a base da associação entre o extrato aquoso de <i>Rhizophora mangle</i> e o Ácido Ascórbico.....	43
Figura 6-	Viscosímetro rotacional utilizado no teste de reologia com as formulações desenvolvidas.....	44
Figura 7-	Aparato utilizado no teste de espalhabilidade com as formulações desenvolvidas.....	45
Figura 8-	Formulações desenvolvidas com goma xantana 1,5% placebo (A) e incorporado com os ativos <i>R. mangle</i> e Ácido Ascórbico (B).....	52
Figura 9-	Reograma das formulações. F3(d, e, f, g): formulações com a associação de extrato de <i>R. mangle</i> e Ácido Ascórbico, F3(c): formulação com extrato de <i>R. mangle</i> e F3(a, b): placebo das formulações.....	53

- Figura 10-** Gráfico da espalhabilidade das formulações em função do peso (g) aplicado sobre as amostras. F3(d, e, f, g): formulações com a associação de extrato de R. mangle e Ácido Ascórbico, F3(c): formulação com extrato de R. mangle e F3(a, b): placebo das formulações..... 54
- Figura 11-** Viabilidade celular dos esplenócitos de camundongos tratados com as formulações desenvolvidas em diferentes concentrações dos ativos. As barras cinzas verticais representam indução a apoptose celular e as barras pretas verticais representam indução a necrose celular. As barras verticais representam a média do experimento em triplicata. #p<0.0001..... 55
- Figura 12-** Índice de proliferação promovido pelas formulações desenvolvidas em culturas de esplenócitos marcados com CFSE. As barras cinzas verticais representam culturas de monócitos tratados e as barras pretas verticais representam culturas de linfócitos tratados. As barras verticais representam a média do experimento em triplicata. #p<0.0001..... 55
- Figura 13-** Perfil da produção de citocinas IL-2 promovido pelas sete formulações desenvolvidas em culturas de esplenócitos de camundongos. A barra branca vertical representa culturas de controle (células + médias) e as barras pretas verticais representam culturas tratadas com as formulações desenvolvidas. As barras verticais representam a média do experimento em triplicata. #p<0.0001..... 56

- Figura 14-** Perfil da produção de citocinas IL-4 promovido pelas sete formulações desenvolvidas em culturas de esplenócitos de camundongos. A barra branca vertical representa culturas de controle (células + médias) e as barras pretas verticais representam culturas tratadas com as formulações desenvolvidas. As barras verticais representam a média do experimento realizado em triplicata. #p<0.0001..... 57
- Figura 15-** Perfil da produção de citocinas IL-10 promovido pelas sete formulações desenvolvidas em culturas de esplenócitos de camundongos. A barra branca vertical representa culturas de controle (células + médias) e as barras pretas verticais representam culturas tratadas com as formulações desenvolvidas. As barras verticais representam a média do experimento realizado em triplicata. #p<0.0001..... 57
- Figura 16-** Perfil da produção de citocinas TNF- α promovido pelas sete formulações desenvolvidas em culturas de esplenócitos de camundongos. A barra branca vertical representa culturas de controle (células + médias) e as barras pretas verticais representam culturas tratadas com as formulações desenvolvidas. As barras verticais representam a média do experimento realizado em triplicata. #p<0.0001..... 58
- Figura 17-** Perfil da produção de citocinas IL-17 promovido pelas sete formulações desenvolvidas em culturas de esplenócitos de camundongos. A barra branca vertical representa culturas de controle (células + médias) e as barras pretas verticais representam culturas tratadas com as formulações desenvolvidas. As barras verticais representam a média do experimento realizado em triplicata. #p<0.0001..... 58

Figura 18- Ensaio de proliferação, ativação e inibição *in vitro* induzidos por formulações a base da associação de extrato de *R. mangle* e Ácido Ascórbico em subconjuntos de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e NK. As barras verticais representam a média do experimento realizado em triplicata. #p<0.0001.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Exposição de diferentes curativos levando-se em conta seu mecanismo de ação e indicação para o determinado tipo de ferimento segundo Franco & Gonçalves (2008), Melo & Fernandes (2011) e Smaniotto et al., (2012).....	27
Tabela 2-	Composição das formulações contendo extrato das folhas de <i>R. mangle</i> e Ácido Ascórbico.....	41
Tabela 3-	Composição das formulações de goma xantana 1,5% contendo extrato das folhas de <i>R. mangle</i> e Ácido Ascórbico em diferentes concentrações.....	51
Tabela 4-	Valores médios de pH das formulações a base de <i>R. mangle</i> e Ácido Ascórbico.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Ascórbico
CBA	Cytometric Bead Array
CB	Centro de Biociências
°C	Grau Celsius
CEUA	Comissão ética no uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco
CFSE	5-(6)-éster-de-N-succinimidil-de-diacetato-de-carboxifluoresceína
CPqAM	Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
CO₂	Dióxido de Carbono
F1	Formulação um
F2	Formulação dois
F3	Formulação três
F4	Formulação quatro
F5	Formulação cinco
F6	Formulação seis
F7	Formulação sete
F8	Formulação oito
F9	Formulação nove
F10	Formulação dez
F3 (a)	Formulação três (a)
F3 (b)	Formulação três (b)
F3 (c)	Formulação três (c)
F3 (d)	Formulação três (d)
F3 (e)	Formulação três (e)
F3 (f)	Formulação três (f)
F3 (g)	Formulação três (g)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiacianato Fluoresceína
IFN-γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina um
IL-2	Interleucina dois
IL-4	Interleucina quatro

IL-5	Interleucina cinco
IL-6	Interleucina seis
IL-10	Interleucina dez
IL-17	Interleucina dezessete
IP	Iodeto de Propídio
LAIA	Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais
LIKA	Laboratório de Imunologia de Keizo Asami
NUDFAC	Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético
NK	Natural Killer
O₂	Oxigênio
PS	Fosfatidilserina
<i>R. mangle</i>	<i>Rhizophora mangle</i>
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute -1640
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TPP	Techno Plastic Products
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	19
2 INTRODUÇÃO.....	20
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1 MANGUEZAL.....	23
3.2 <i>RHIZOPHORA MANGLE</i> L.....	24
3.3 ÁCIDO ASCÓRBICO.....	26
3.4 CURATIVOS PARA O TRATAMENTO CLÍNICO DAS FERIDAS.....	27
3.5 POLÍMEROS.....	29
3.5.1 <i>Goma xantana</i>	29
3.5.2 <i>Hidroxietilcelulose</i>	29
3.5.3 <i>Poloxamer 407</i>	30
3.6 DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO FARMACÊUTICA DAS PREPARAÇÕES TÓPICAS.....	30
3.6.1 <i>Desenvolvimento</i>	30
3.6.2 <i>Características organolépticas</i>	31
3.6.3 <i>Determinação do pH</i>	31
3.6.4 <i>Reologia</i>	31
3.7 CITOTOXICIDADE.....	32
3.8 RESPOSTA IMUNE.....	34
4 OBJETIVOS.....	37
4.1 OBJETIVO GERAL.....	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5 METODOLOGIA.....	38
5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	39
5.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	40
5.3 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	40
5.3.1 <i>Material Botânico</i>	40
5.3.2 <i>Desenvolvimento dos Hidrogéis</i>	40
5.3.2.1 <i>Obtenção dos Hidrogéis</i>	41
5.3.3 <i>Avaliação Farmacêutica</i>	43
5.3.3.1 <i>Caracterização Organoléptica</i>	43
5.3.3.2 <i>Determinações do pH</i>	43
5.3.3.3 <i>Reologia</i>	44

5.3.3.4 <i>Determinação da espalhabilidade</i>	44
5.4 ENSAIOS CITOTÓXICO	45
5.4.1 Casuística.....	45
5.4.1.1 <i>Critérios de inclusão</i>	45
5.4.1.2 <i>Critérios de exclusão</i>	45
5.4.2 <i>Animais</i>	45
5.4.3 <i>Obtenção dos esplenócitos</i>	46
5.4.4 <i>Análise da viabilidade celular</i>	46
5.4.5 <i>Ensaio de proliferação usando coloração com 5(6) éster de N-succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE)</i>	47
5.5 ENSAIOS IMUNOMODULADOR.....	47
5.5.1 <i>Medição da produção de citocinas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA)</i>	47
5.5.2 <i>Ensaio de imunofenotipagem de linfócitos</i>	48
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.1 RESULTADOS.....	51
6.1.1 <i>Obtenção e Desenvolvimento dos Hidrogéis</i>	51
6.1.2 <i>Avaliação Farmacêutica</i>	51
6.1.2.1 <i>Caracterização Organoléptica</i>	51
6.1.2.2 <i>Determinações do pH</i>	52
6.1.2.3 <i>Reologia</i>	52
6.1.2.4 <i>Determinação da espalhabilidade</i>	53
6.1.2.5 <i>Avaliação da atividade Citotóxica</i>	54
6.1.4 <i>Avaliação da atividade imunomoduladora</i>	56
6.2 DISCUSSÃO.....	60
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	65
7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
7.2 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL	81
ANEXO B- AUTORIZAÇÃO DE COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO	82

1 APRESENTAÇÃO

Tratamentos alternativos ou complementares para auxiliar o processo de cicatrização de feridas estão ampliando-se nos últimos 10 anos. O uso de extratos de plantas no desenvolvimento de fitoterápicos tem sido tema de estudos com frequência. Porém a associação de compostos naturais e sintéticos para o desenvolvimento de novas formulações cicatrizantes pouco são encontradas na literatura. Esta dissertação contribui o conhecimento vigente no que concerne ao desenvolvimento de hidrogéis a base da associação do extrato de *Rhizophora mangle* L. e ácido ascórbico como tratamento terapêutico alternativo para reparação tecidual.

O estudo em questão teve como finalidade o desenvolvimento de hidrogéis com efeito cicatrizante a base da associação do extrato de *Rhizophora mangle* L. (*R. mangle*) e ácido ascórbico, avaliando as características organolépticas, pH, viscosidade, espalhabilidade, características citotóxicas e possível atividade imunomoduladora em esplenócitos de camundongos *in vitro*. A presente dissertação tem como tema: “Hidrogéis a base da associação de *Rhizophora mangle* e ácido ascórbico: desenvolvimento e avaliações citotóxica e imunomoduladora”, tendo artigo original com o título: “Association of *Rhizophora mangle* and ascorbic acid in hydrogels: cytotoxic and immunomodulatory evaluations”.

2 INTRODUÇÃO

O tratamento de feridas inclui métodos clínicos e cirúrgicos, sendo o curativo um dos tratamentos clínicos mais frequentemente utilizados (FRANCO & GONÇALVES, 2008). Um vasto arsenal terapêutico composto por curativos passivos ou com princípios ativos é capaz de auxiliar na reparação tecidual em diversas situações, como alginato, carvão ativado, placas de prata, matriz de colágeno, matriz de celulose, filme transparente e hidrogel (SMANIOTTO et al., 2012). Dentre eles os hidrogéis estão recebendo uma atenção cada vez maior devido a sua capacidade de manter uma grande quantidade de água na sua estrutura, biocompatibilidade e propriedades como a permeabilidade a materiais metabólicos (BARRETO et al., 2018). O desenvolvimento de hidrogéis consiste em um planejamento de uma variedade de polímeros como goma xantana, hidroxietilcelulose e poloxamer 407 que formam redes tridimensionais que podem intumescer em meio aquoso ou fluido biológico e reter uma grande quantidade de água na sua estrutura sem se dissolver (DUMORTIER et al., 2006; MOHSIN & SHAIKH, 2017).

Nos últimos dez anos o uso de compostos para a bioprospecção de fitoterápicos como os das plantas do manguezal *Rhizophora mangle*, *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Conocarpus erectus* ou de produtos contendo fármacos sintéticos como o ácido ascórbico, tornaram-se um campo promissor na área da saúde e biotecnologia (BURKE, 2007; ARAÚJO, 2015; REGALO et al., 2016; LOPES et al., 2019). Resaltando que, o uso de compostos associados para o desenvolvimento de novas formulações cicatrizantes é uma prática importante para novos tratamentos terapêuticos alternativo no processo da reparação tecidual (FRANCO & GONÇALVES, 2008).

Ativos naturais estão sendo usados com frequência nos últimos anos como recurso terapêutico. Pesquisas quanto aos compostos encontrados nas plantas do manguezal vem ampliando-se no cenário científico, dentre essas plantas, encontramos a *Rhizophora mangle* (REGALADO et al., 2016). Suas propriedades farmacológicas devem-se à presença dos compostos secundários como polifenólicos entre eles ácido fenólico p-cumárico, ácido quínico, ácidos gálicos, elágico e clorogénico, gentisalaldeído, pelargonina, catequina e epicatequina; que apresentam atividades biológicas contribuindo com melhora na cicatrização de feridas, efeito antioxidante, anti-inflamatório e promotor de neoangiogênese (OLIVEIRA, 2018; OFORI-KWAKYE et al., 2011).

Quanto aos ativos sintéticos o ácido ascórbico, popularmente conhecido como vitamina C, é uma das vitaminas mais requisitadas em produtos tópicos de cuidados com a pele, pois permite alcançar níveis da vitamina que não seriam possíveis com a ingestão diária por meio de alimentos ou suplementação oral (AQUINO & FELIPE, 2014). O mesmo apresenta atuação fundamental na síntese de colágeno e elastina, como também promover condições favoráveis para a reparação tecidual, o que configura o seu uso tópico uma estratégia terapêutica importante para acelerar a cicatrização em feridas (PESSOA, 2014).

A existência crescente de pessoas com a integridade da pele prejudicada, vem sendo um sério problema de saúde pública para o Brasil, devido à dificuldade de tratamento, onerando os gastos públicos, além de trazer prejuízo pessoal, social, psicológico e econômico (SILVA et al., 2017). O processo de cicatrização de feridas começou a ser entendido em maior amplitude, existindo ainda a necessidade de novos estudos mediante a avaliação de seus mecanismos, medidas preventivas e curativas mais eficientes (CAMPOS et al., 2007). Esses aspectos incentivam o desenvolvimento de novas formulações associando substâncias que proporcionem presteza ao processo cicatricial.

Estudos relacionados às propriedades farmacológicas do extrato das folhas de *Rhizophora mangle* e o Ácido Ascórbico são encontrados com facilidade quando o ponto central da pesquisa é a reparação tecidual, porém sua associação como base para formulações cicatrizantes nunca foi objeto de pesquisa. Este trabalho trará informações a respeito de propriedades bioativas da associação do extrato aquoso das folhas de *R. mangle* e o Ácido Ascórbico em hidrogéis, estabelecendo um polímero compatível com ambos os ativos, como também sua avaliação, além da capacidade de ativar células imunológicas a realizar seus mecanismos efetores sem induzir morte celular, bem como se o mesmo apresenta atividade citotóxica sobre células isoladas de baço de camundongos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 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 (SCHAEFFER-NOVELLI & CINTRÓN, 1990). 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, retenção de sedimentos, substâncias químicas e matéria orgânica (EWEL et al., 1998) (Figura 1).

Figura 1- Manguezal distrito de Vila Velha, em Itamaracá-PE.



Fonte: AUTORA

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 (BRASIL, 2009). Pernambuco, apresenta uma área de 23.973 hectares ocupada por mangue, e a maioria encontra-se localizada nos municípios de Goiana, Igarassu, Itamaracá e Itapissuma; nas margens do Canal de Santa Cruz ($7^{\circ} 40' S$ e $7^{\circ} 50' S$ de Latitude; $34^{\circ} 50'$ e $34^{\circ} 54'$ de Longitude) (BARROS et al., 2000). A flora dos manguezais é composta por halófitas, cujas espécies são adaptadas a ambientes salinos, com pouco oxigênio e frequentemente inundados pelas marés (REGALO et al., 2016).

Segundo Bandaranayake (2002) esse ecossistema compreende plantas de ocorrência única que produzem metabólitos com características químicas particulares que ainda são pouco conhecidas, o que sugere a possibilidade de abrigarem novos compostos com atividades biológicas dando suporte ao surgimento de novas drogas tanto de origem natural, como semissintéticas. As propriedades farmacológicas das plantas dependem dos seus compostos secundários. Estes aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas (PEREIRA & CARDOSO, 2012).

As florestas de mangue do litoral brasileiro são compostas basicamente por uma camada externa formada em sua maior parte por *Rhizophora mangle* (mangue vermelho), em menor proporção encontra-se a *Avicennia schaueriana* (mangue preto ou siriúba) e *Laguncularia racemosa* (mangue branco). A vegetação de transição com a terra firme é formada por *Conocarpus erectus* (mangue botão). Esse tipo de vegetação apresenta uma rica fonte de fitoconstituintes como triterpenos, saponinas, taninos, alcaloides e flavonoides (SCHAEFFER-NOVELLI & CINTRÓN, 1990; BANDARANAYAKE, 2002).

3.2 RHIZOPHORA MANGLE L.

A família *Rhizophoraceae* possui distribuição pantropical com 16 gêneros e cerca de 150 espécies. No Brasil é encontrada no litoral tendo a ocorrência de 4 gêneros e cerca de 15 espécies, dentre elas a *Rhizophora mangle* L. conhecida popularmente como “Mangue-Vermelho”, “Candapuva”, “Guaraparaíba”, “Mangue Garobeira”, “Mangue de Espeto”, “Mangue de Pendão”, “Mangue Preto”, “Mangue Sapateiro”, “Paxiubarana” e “Mangue Verdadeiro”, principalmente no nordeste brasileiro; sendo conhecida mundialmente como “Mangle Rojo”, “Mangle Colorado” e “Red Mangrove” (SOUZA & LORENZI, 2008; REGALADO et al., 2016).

R. mangle é abundante na paisagem dos manguezais possuindo caráter arbóreo com folhas simples e adaptações fisiológicas notáveis frente aos substratos anaeróbicos típicos do habitat, os rizóforos (MENEZES, 2006) (Figura 2). Tais estruturas radiculares são específicas para sustentação, diversos ramos que emergem do caule projetando-se em várias direções rumo ao solo, bifurcando progressivamente até se fixarem, sendo uma das características mais

marcantes desta espécie (REGALADO et al., 2016). Trata-se de uma planta onde folha, caule, raízes e frutos apresentam variados usos na medicina popular cuja preparação envolve maceração, chá ou cinzas em água (ALMEIDA, 2017).

Figura 2- Morfologia da planta *Rhizophora mangle*.



Fonte: AUTORA

As propriedades farmacológicas desta planta devem-se à presença dos compostos secundários contidos na mesma, tendo fundamental importância na sobrevivência da espécie em relação a patógenos do ambiente (PERREIRA & CARDOSO, 2012). Os polifenólicos descritos nos trabalhos de Regalado et al., (2016) e Oliveira (2018) como ácido fenólico p-cumárico, ácido quínico, ácidos gálicos, elágico e clorogénico, gentisalaldeído, pelargonina, catequina e epicatequina; são responsáveis por atividades biológicas encontradas na medicina tradicional como em úlceras gástricas (PERERA et al., 2010; DE-FARIA et al., 2012), anti-inflamatória (MARRERO et al., 2006), cicatrização de feridas cutâneas, antioxidante (SÁNCHEZ et al., 2006), antidiarréico (WENDEL et al., 2013) antibiótico (MELCHOR et al., 2001), como também promotor de neoangiogênese (OFORI-KWAKYE et al., 2011).

Na literatura são encontrados estudos que avaliam a incorporação do extrato de *Rhizophora mangle* em diferentes veículos de liberação de princípio ativo. Em seu trabalho Roger (2011) avaliou a estabilidade de gel tópico com o intuito de tratamento de feridas e

queimaduras, enquanto Rivero (2015) e Araújo (2015) avaliaram cremes com incorporação do extrato de *R. mangle* nas concentrações de 50% e 5% respectivamente para o tratamento de feridas cutâneas e queimaduras. O extrato da *R. mangle* também foi associado em biomaterial no trabalho de Oliveira (2018) com filmes substitutos de pele para retalhos cutâneos isquêmicos.

3.3 ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico (AA) foi isolado e caracterizado primeiramente por Szent-Gyorgyi em 1928. Em 1933, Hirst e Haworth, anunciaram a estrutura química da vitamina C e sugeriram, em conjunto com Szent-Gyorgyi, a mudança do nome para ácido ascórbico; no mesmo ano de 1933, Reichstein e colaboradores publicam as sínteses do ácido D-ascórbico e L-ascórbico que, ainda hoje formam a base para a produção industrial da vitamina C (SHAPIRO & SALIOU, 2001).

Os seres humanos são incapazes de sintetizar o AA, a partir da glicose, devido à deficiência da L-gulonono-g-lactona oxidase, enzima envolvida na síntese do AA. Desta forma, é necessário adquiri-la na dieta alimentar (MAIA et al., 2001). O ácido ascórbico participa dos processos celulares de oxirredução, previne o escorbuto, é importante na defesa do organismo contra infecções e fundamental na integridade das paredes dos vasos sanguíneos. É essencial para a formação das fibras colágenas existentes em praticamente todos os tecidos do corpo humano (AZULAY et al., 2003; PESSOA, 2014).

A sua aplicação em produtos farmacêuticos com intuito de reparação tecidual é vantajosa, uma vez que possibilita níveis que não seriam possíveis alcançar com a ingestão de frutas ou suplementação oral, contudo esta precisa de ter alguns requisitos para ter uma aplicação tópica efetiva, tais como concentração suficiente e ser estável (BURKE, 2007). As preparações tópicas de Ácido Ascórbico são populares e podem ser formuladas em formas solúveis em água ou lipídios (MAIA, 2002).

Os primeiros estudos do uso tópico do Ácido Ascórbico, foram em animais, no ano de 1967, utilizando creme de fosfato de ácido ascórbico a 3% avaliando à sua absorção através da epiderme até a camada basal (IMAI et al., 1967). Voluntários que aplicaram Ácido Ascórbico tópica a 5% durante seis meses, comparada com placebo, demonstraram uma

melhoria clínica, histológica e estrutural significativas (RISCUTA, 2016). Foi também avaliado o efeito da Ácido Ascórbico a 10%, aplicando-se na metade da face de 10 voluntários desta vitamina durante 12 semanas, demonstrando melhoria clínica e formação de colágeno no exame histopatológico (BAGATIN, 2008).

3.4 CURATIVOS PARA O TRATAMENTO CLÍNICO DAS FERIDAS

O tratamento das feridas inclui métodos clínicos e cirúrgicos e o curativo é o tratamento clínico mais frequentemente utilizado para auxiliar a reparação tecidual (CHUNG & GLORI, 2009). Sua escolha depende de fatores intrínsecos e extrínsecos; sendo um tratamento dinâmico e dependente, a cada momento, da evolução das fases de cicatrização (FRANCO & GONÇALVES, 2008) encontrando inúmeras opções de curativos existentes no mercado.

Segundo Smaniotto et al., (2012) podem ser denominados curativos somente as coberturas ou aqueles que levem ao leito algum princípio ativo; os curativos inteligentes e biológicos são classificados como substitutos cutâneos, pois sua ação é provavelmente mais dependente da substituição da derme degradada nessas feridas. Para uma cicatrização adequada é necessário conhecer as coberturas disponíveis no mercado, tal como sua composição, mecanismo de ação, indicação, advertências, modo de usar e intervalo de troca como pode ser visto alguns exemplos na tabela 1.

Tabela 1- Exposição de diferentes curativos levando-se em conta seu mecanismo de ação e indicação para o determinado tipo de ferimento segundo Franco & Gonçalves (2008), Melo & Fernandes (2011) e Smaniotto et al., (2012).

Curativo	Mecanismo de Ação	Indicações
Filme Transparente	Cobertura impermeável à água e micro-organismos; manutenção do leito úmido; possibilita menor número de trocas de curativo.	Visibilidade do leito, feridas superficiais sem exsudato; áreas doadoras de enxertos.

Pomadas ou Óleos	Promove a quimiotaxia e a angiogênese, mantém o meio úmido e acelera o processo de granulação tecidual.	Prevenção de úlceras de pressão, feridas abertas superficiais com ou sem infecção.
Alginato de Cálcio	Tem alta capacidade de absorção, resulta na formação de um gel que mantém o meio úmido para a cicatrização e induz a hemostasia.	Feridas abertas, altamente exsudativas com ou sem infecção, até a redução do exsudato.
Hidrocolóides	Estimula a angiogênese e o desbridamento autolítico. Acelera o processo de granulação tecidual.	Feridas abertas não infectadas, com leve a moderada exsudação.
Carvão Ativado Com Prata	O carvão ativado adsorve o exsudato e diminui o odor; a prata exerce função bacteriostática.	Feridas fétidas, exsudativas e infectadas.
Curativo à Vácuo	Pressão negativa, contínua ou intermitente, que estimula vascularização, granulação e retração da ferida.	Feridas agudas e crônicas, extensas e/ou de difícil resolução. Sobre enxertos cutâneos.
Hidrogel	Mantém ambiente úmido, possibilitando, liquidação de materiais necróticos.	Queimaduras e feridas com tecidos desvitalizados.

Dentre os curativos citados na tabela 1 os hidrogéis são formados por uma variedade de polímeros como goma xantana, hidroxietilcelulose e poloxamer 407, os polímeros formam uma rede tridimensional que podem intumescer em meio aquoso ou fluido biológico e reter uma grande quantidade de água na sua estrutura sem se dissolver, estabelecendo assim uma das principais características de um hidrogel (KHURMA et al., 2006; DUMORTIER et al., 2006; MOHSIN & SHAIKH, 2017). Além do grau de intumescimento, a cinética de adsorção, permeabilidade do soluto e hidratação no local da ferida, são fatores importantes para a atuação no processo de reparação tecidual, apresentando-se assim uma alternativa para a cicatrização de feridas no cenário farmacêutico e biotecnológico (SMANIOTTO et al., 2012).

3.5 POLÍMEROS

3.5.1 *Goma xantana*

A goma xantana é um polissacarídeo natural produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* ocupando um espaço marcante tanto nos mercados farmacêutico e alimentício, assim como nas indústrias petrolífera e têxtil (SUTHERLAND, 2002). Isto se deve a suas propriedades reológicas que são: alto grau de pseudoplasticidade, mesmo em baixas concentrações; alta viscosidade; estabilidade em soluções alcalinas e ácidas como também resistência à degradação em altas temperaturas (BORGES & VENDRUSCOLO, 2008). Os aspectos toxicológicos e de segurança deste polímero para aplicações em produtos alimentícios e farmacêuticos foram amplamente estudados; a xantana é um produto atóxico, não promove sensibilização e não causa irritação na pele e nos olhos (GARCIA-OCHOA et al., 2000). Vendrusculo et al., (2013) descreveram a preparação de comprimidos utilizando-se somente xantana e também associada à galactomana extraída de sementes de *Mimosa scrabella* como matrizes para liberação controlada de teofilina, mostrando que a xantana possui um efeito de sustentação maior na liberação de teofilina que as matrizes de galactomana isoladamente ou da mistura dos dois materiais.

3.5.2 *Hidroxietilcelulose* (NATROSOL®)

A hidroxietilcelulose é um polímero derivado da celulose, conhecido comercialmente como NATROSOL®, com sua composição em pó capaz de formar gel quando em contato com água e não é considerado perigoso (MARTINS et al., 2008). Este gel é utilizado no mercado farmacêutico com frequência pela tolerância em pH ácido, levando em consideração que quando exposto em pH extremos podem causar alteração na viscosidade (CHIROLI et al., 2013). Pelas características citadas o natrosol foi utilizado dentre outros polímeros por Santos et al., (2017) no estudo de pré-formulação para o desenvolvimento de de uma formulação para região dos olhos com extrato padronizado de café verde.

3.5.3 Poloxamer 407

O Poloxamer 407 é o copolímero mais utilizado para obtenção de sistemas termossensíveis, existindo aproximadamente mais de 30 tipos de poloxâmeros comercialmente disponível com uma ampla gama de composição e pesos moleculares que variam no intervalo de 1.100-14.000 Da, sendo o P407 um dos mais estudado na literatura (GIULIANO et al., 2018). O polímero é solúvel em água fria (4-8°C), e apresenta transição sol-gel com aquecimento, esse polímero forma hidrogéis caracterizados pela capacidade de transportar uma quantidade significativa de um medicamento (PEREIRA et al., 2013). Esses hidrogéis foram utilizados para muitas aplicações farmacêuticas diferentes, incluindo formulações parentéricas. Oftalmológicas, retais e tópicas (JEONG et al., 2002).

3.6 DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO FARMACÊUTICA DAS PREPARAÇÕES TÓPICAS

3.6.1 Desenvolvimento

O desenvolvimento de novas formulações no mercado farmacêutico e biotecnológico tem se dado de maneira crescente e para obtenção do sucesso terapêutico, a formulação farmacêutica deve-se apresentar estável, o que torna a avaliação de sua estabilidade um fator fundamental (AQUINO & FELIPE, 2014). As alterações que ocorrem com a formulação podem ser extrínsecas, ou seja, relacionadas a fatores externos aos quais o produto está exposto e intrínsecas, relacionadas à natureza das formulações e, sobretudo, à interação de seus ingredientes entre si (ISAAC et al., 2008). Em seu estudo Aquino & Felipe (2014) avaliaram a estabilidade de diferentes formulações de vitamina C, observado a necessidade de uso de antioxidante e armazenamento adequado das mesmas para melhor estabilidade. Enquanto Roger et al., (2011) avaliou a estabilidade de gel de *Rhizophora mangle* L. observando características organolépticas, pH, reologia, apresentando estabilidade em condições de variação de temperatura.

3.6.2 Características organolépticas

Ensaio organoléptico são procedimentos utilizados para avaliar as características de um produto, detectáveis pelos órgãos dos sentidos: aspecto, cor, odor, sabor e tato. Considerando que o produto deve manter-se íntegro sustentando o aspecto inicial; em relação a cor e odor deve-se manter estáveis dentro do tempo de validade como também a viscosidade deve ser definida pelo formulador levando em consideração percepção visual e sensorial (BRASIL, 2004). Estudo descrito por Cordeiro et al., (2013) tinha como objetivo o desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*zingiber officinale roscoe*) avaliando características organolépticas em relação a odor, cor e aspecto entre outros parâmetros físico-químico com o intuito de fornecer informações que indiquem o grau de estabilidade relativa das formulações nas várias condições a que possam estar sujeitos.

3.6.3 Determinação do pH

O pH é um dos principais mecanismos de proteção da pele, devendo-se à produção de ácido láctico e conferindo à superfície cutânea aquilo que se convencionou designar por “manto ácido cutâneo”, e é constantemente desafiado por agressores externos como a poluição, mudanças de temperatura e os produtos químicos. Ele varia de acordo com ambos os gêneros e onde está situado no corpo (LOPES et al., 2018). De forma geral, o pH da pele é levemente ácido (4,6 a 5,8) o que é importante para adequadas atividades antibacteriana, fungicida, constituição da função de barreiras, bem como estruturação e maturação do estrato córneo (GONÇALVES et al., 2017).

3.6.4 Reologia

O termo reologia, de origem do grego *rheo* (fluxo) e *logos* (ciência), foi criado por Bingham e Crawford, e passou a ser adotado a partir de 1929, com o intuito de identificar a parte da físico-química que trata sobre a deformação dos sistemas líquidos, sólidos e semissólidos. (LAHOUD & CAMPOS, 2010). Adquirindo posição permanente nos testes de estabilidade, uma vez que as características reológicas são propriedades importantes a serem

consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico, interferindo na forma de utilização do produto, na adesão ao tratamento e, também, na aceitação do produto pelo consumidor (ISAAC et al., 2008).

Na reologia, os materiais podem ser classificados como Newtonianos ou não-Newtonianos, de acordo com suas características de fluxo. O fluxo Newtoniano é caracterizado pela viscosidade constante, independente da velocidade de cisalhamento aplicada; enquanto no fluxo não-Newtoniano, a viscosidade é alterada com o aumento da velocidade de cisalhamento (MIURA, 2012). Os materiais de fluxo não-Newtoniano podem ser classificados em três tipos gerais: plásticos, pseudoplásticos e dilatantes, podendo estes apresentarem ou não tixotropia (XU et al., 2013).

O comportamento pseudoplástico é considerado o mais adequado para formulações de aplicação tópica, pois indicam que a resistência inicial para fluir diminui após aplicar uma força, ou seja, cisalhar. Estes dados, juntamente com os dados de espalhabilidade refletem em maior e melhor distribuição da formulação no local de aplicação, tendo em vista que uma diminuição da viscosidade implica em um aumento da espalhabilidade (JAGDALE et al., 2015).

3.7 CITOTOXICIDADE

A utilização de testes *in vitro*, por meio de ensaios de viabilidade celular, constitui o primeiro passo para a avaliação da compatibilidade biológica de uma substância e pode fornecer elementos importantes para a análise da biocompatibilidade dos diferentes materiais (ARAÚJO et al., 2008). Os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo, sob condições específicas de exposição são estudados pela toxicologia, investigando experimentalmente a ocorrência, a natureza, a incidência, os mecanismos e os fatores de risco dos efeitos deletérios de agentes químicos (ARAÚJO, 2015).

A citotoxicidade é uma metodologia em abrangência para avaliação de toxicidade de compostos, utilizando células de mamífero e avaliando os danos causados as mesmas, a formação ou não de colônias celulares e a viabilidade celular (BEDNARCZUK et al., 2010), que segundo Iso (2009) pode ser realizada por análises quantitativas ou qualitativas. Na

análise quantitativa, conta-se o número de células após proliferação ou inibição celular, o número de colônias formadas, a dosagem de seus componentes, como proteínas e mitocôndrias, ou pela proliferação ou inibição do material genético. A análise qualitativa avalia as células microscopicamente, observando as alterações morfológicas, como vacuolização citoplasmática e lise de suas membranas.

O modelo *in vitro* tornando-se muito apreciado, pois são reprodutíveis, sensíveis e rápidos, além da homogeneidade das amostras e a facilidade de uma padronização, uma vez que é possível o controle de fatores tais como: pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e de O₂ (WILLIAMS, 2008), entretendo segundo Araújo (2015) algumas desvantagens devem ser consideradas para este método de estudo, entre elas a necessidade de se trabalhar em ambiente estéril e asséptico.

A citotoxicidade pode ser determinada medindo os efeitos na viabilidade celular utilizando citometria de fluxo para detectar e quantificar células apoptóticas e necróticas com Anexina V (SANTOS et al., 2018). As alterações na membrana plasmática podem ser avaliadas por meio da detecção da fosfatidilserina que é um lipídio que se encontra distribuído assimetricamente no folheto interno e externo da membrana plasmática. Fosfatidilserina (PS) é normalmente restrito ao folheto interno da membrana plasmática sendo, portanto, apenas exposto intracelularmente. Entretanto, no processo de apoptose, a assimetria lipídica é perdida e a PS fica exposta no folheto externo da membrana plasmática (KOOPMAN et al., 1994).

Anexina V, marcada fluorescentemente (isotiacianato fluoresceína - FITC), liga-se a PS; podendo ser utilizada para detectar PS quando exposta no exterior de células apoptóticas; marcando também células necróticas quando as mesmas têm membranas rompidas que permitem que a Annexina V acesse toda a membrana plasmática. No entanto, as células apoptóticas podem ser distinguidas das células necróticas por co-coloração com iodeto de propídio (PI) penetrando em células necróticas, e ligando-se ao DNA (CROWLEY et al., 2016).

3.8 RESPOSTA IMUNE

O sistema imunológico é formado por uma complexa rede de órgãos, células e moléculas, possuindo a finalidade de manter a homeostase do organismo, combatendo as agressões em geral; com um mecanismo de defesa notavelmente equilibrado para proteger o hospedeiro de ameaças ambientais e patógenos sem desencadear respostas aberrantes a auto-antígenos, envolve vários componentes plasmáticos como fatores de crescimento, fatores do complemento, receptores celulares, proteínas quinase e citocinas (CRUVINEL et al., 2010; ARCHANA et al., 2011; MANGINO et al., 2017).

A função imunológica tem sido conceitualmente dividida em imunidade inata e adaptativa (CRUVINEL et al., 2010). O sistema imune inato representa uma resposta rápida de defesa, composto por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000; CRUVINEL et al., 2010). A resposta inflamatória, o mecanismo da fagocitose e a liberação de mediadores, entre estes os que envolvem os processos oxidativos, constituem etapas importantes da imunidade inata, que podem usar uma variedade de mecanismos efetores para eliminar ou conter uma infecção. No entanto, em caso de falha destes mecanismos será acionado o sistema imune adaptativo (NUNES-PINHEIRO et al., 2003).

O sistema imune adaptativo é mais tardio, diferentemente, focaliza especificadamente o invasor gerando memória imunológica e explora a diversidade de receptores codificados na superfície de células B e T para reconhecer patógenos desconhecidos e proteger o organismo hospedeiro de infecções, sendo os principais tipos de linfócitos que agem no sistema adaptativo (ALMEIDA, 2017; CALLAN JR et al., 2017).

Segundo Junior et al., (2010) os linfócitos B são inicialmente produzidos no saco vitelino, posteriormente, durante a vida fetal, no fígado e finalmente na medula óssea. As células que vão se diferenciar nos mesmos permanecem na medula óssea durante sua maturação e quando maduros deixam a medula e entram na circulação, migrando para os órgãos linfoides secundários; sendo responsáveis pela imunidade humoral que se caracteriza

pela produção e liberação de anticorpos capazes de neutralizar, os antígenos contra os quais foram gerados.

Enquanto os linfócitos T entram no córtex tímico pelas artérias e durante o processo de seleção e maturação migram em direção à medula, de onde saem para a circulação; apresentando diferentes funções de acordo com a classe as quais pertencem. Classicamente os dois principais subtipos de linfócitos T são os auxiliares (Th) associados ao CD4 e os citotóxicos associados ao CD8 (JUNIOR et al., 2010; WYKES et al., 2017). As células Th são subdivididas, funcionalmente pelo padrão de citocinas que produzem, em Th0, Th1, Th2 e Th17 (NUNES et al., 2017).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, solúveis, produzidas geralmente após ou durante uma resposta do organismo a antígenos, que atuam na regulação química das respostas imunológicas (CAMPOS et al., 2016). Há um tipo específico de citocinas denominadas interleucinas e interferons, que também são secretados por células imunológicas e desempenham importante papel nas respostas imunes e inflamatórias (SARROUH et al., 2008).

Os linfócitos Th1 produzem grandes quantidades de IL-2, que induz proliferação de linfócitos T, incluindo os próprios linfócitos TCD4 de maneira autócrina e também induz a proliferação e aumenta a capacidade citotóxica dos LT CD8 (PARKIN & COHEN, 2001). A outra citocina produzida em grandes quantidades pelos linfócitos Th1 é o INF- γ , uma citocina muito importante na ativação de macrófagos infectados com patógenos intracelulares que apresenta também um papel relevante na ativação de LT CD8 (JUNIOR et al., 2010).

A segunda população Th muito importante nas respostas imunes humorais, linfócitos Th2, que produz IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, favorecendo a produção de anticorpos (PARKIN & COHEN, 2001). As respostas Th2 estão associadas com as doenças alérgicas e infecções por helmintos, uma vez que a IL-4 induz a troca de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B para IgE e a IL-5 induz a produção e ativação de eosinófilos (BRADLEY, 2003).

Os linfócitos Th17 fazem parte de um novo panorama de linfócitos T que mostram um fenótipo de linfócitos TCD4⁺ ativados caracterizado pela produção de elevadas quantidades de IL-17 (HARRINGTON et al., 2005). Os linfócitos Th17 parecem desempenhar um papel

crucial no desenvolvimento de uma ampla gama de transtornos inflamatórios crônicos e autoimunes como artrite reumatoide e esclerose múltipla (JUNIOR et al. 2010; ARAÚJO et al., 2016).

Um grupo de células relevantes também além das B e T são as células *Natural Killer* (NK) que têm origem na medula óssea, a partir de um progenitor comum aos linfócitos Ts, sendo uma importante linha de defesa inespecífica, reconhecendo e lisando células infectadas por vírus, bactérias e protozoários, bem como células tumorais, apresentam receptores de ativação e de inibição, e o balanço entre os sinais gerados por eles determina sua ativação. Uma vez ativadas, as NKs lisam células infectadas e tumorais e secretam citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-2 e principalmente IFN- γ (YOKOYAMA & KIM, 2004; CRUVINEL et al., 2010).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar atividades citotóxica e imunomoduladora de hidrogéis com efeito cicatrizante a base da associação entre o extrato de *Rhizophora mangle* + Ácido Ascórbico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

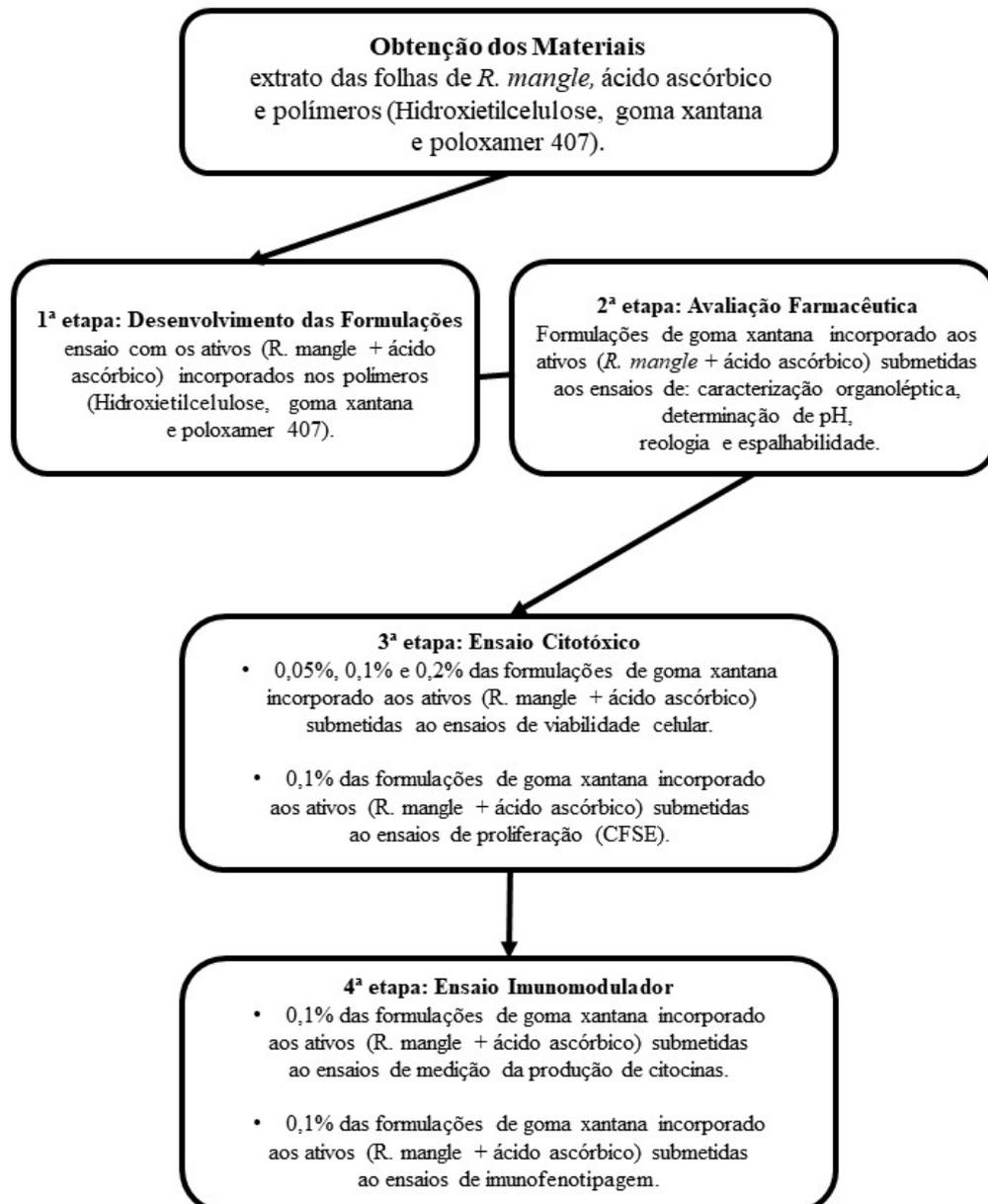
- Analisar a compatibilidade dos polímeros goma xantana, poloxamer 407 e hidroxietilcelulose com os ativos extrato de *R. mangle* e ácido ascórbico para desenvolvimento de formulações;
- Realizar a avaliação farmacêutica das formulações desenvolvidas incluindo características organolépticas, pH e espalhabilidade;
- Analisar estabilidade física das formulações desenvolvidas mediante a determinação do comportamento reológico;
- Avaliar a citotoxicidade das formulações desenvolvidas em esplenócitos de camundongos;
- Investigar o potencial proliferativo das formulações desenvolvidas em esplenócitos de camundongos;
- Avaliar se as formulações desenvolvidas são capazes de induzir a produção das citocinas e ativação e proliferação dos subconjuntos de linfócitos T em sobrenadantes de culturas de esplenócitos de camundongos.

5 METODOLOGIA

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de desenvolvimento e de avaliação pré-clínica *in vitro* das atividades citotóxica e imunomoduladora de hidrogéis a base da associação do extrato de folhas da *Rhizophora mangle* e Ácido Ascórbico em esplenócitos de camundongos.

Figura 3- Fluxograma do Estudo



Fonte: AUTORA

5.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

A pesquisa foi realizada através do Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. A obtenção do material vegetal foi no Laboratório Pesquisa Translacional e Inovação Terapêutica Aplicada à Morfologia do Departamento de Histologia e Embriologia (CB/UFPE); o desenvolvimento e caracterização dos hidrogéis foi realizada no Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC); e os experimentos para avaliação das atividades citotóxica e imunomoduladora foram realizados no Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais (LAIA) e no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

5.3 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

5.3.1 *Material Botânico*

O extrato aquoso liofilizado de *R. mangle* foi obtido no Laboratório Pesquisa Translacional e Inovação Terapêutica Aplicada à Morfologia no Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), tendo seu processamento e caracterização fitoquímica descritos no trabalho de Oliveira (2018).

5.3.2 *Desenvolvimento dos Hidrogéis*

No estudo de pré-formulação foram utilizados três agentes gelificantes em diferentes concentrações, entre eles o hidroxietilcelulose, a goma xantana e o poloxamer 407, segundo tabela 2.

Tabela 2- Composição das formulações contendo extrato das folhas de *R. mangle* e Ácido Ascórbico.

COMPOSIÇÃO (%; P/V)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Extrato <i>R. mangle</i> (%)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Metabissulfito de Sódio (%)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Metilparabeno (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Propilparabeno (%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Hidroxietilcelulose (%)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Goma Xantana (%)	-	1	1,5	2	-	-	-	-	-	-
Poloxamer 407 (%)	-	-	-	-	15	18	20	22,5	25	30
Ácido Ascórbico (%)	-	-	10	-	-	-	-	10	-	-
Água destilada q.s.p (g)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Legenda: F: Formulação; %: concentração do composto no total da formulação; P/V: peso do composto por volume.

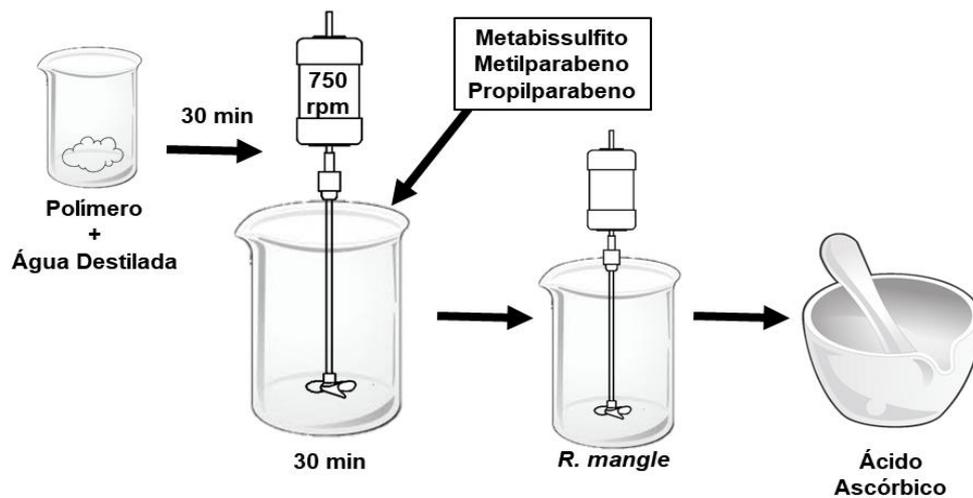
5.3.2.1 Obtenção dos Hidrogéis

As formulações contendo goma xantana e hidroxietilcelulose foram obtidas segundo metodologia adaptada de Mohsin & Shaikh (2017) e as formulações contendo poloxamer 407 segundo o método descrito por Dumortier et al., (2006). Os polímeros, o Ácido Ascórbico e o metabissulfito de sódio, metilparabeno e propilparabeno foram obtidos no Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC).

O polímero (goma xantana ou hidroxietilcelulose) foi disperso em um béquer com parte da água destilada deixando em repouso por 30min. Em seguida o antioxidante metabissulfito foi dissolvido em água destilada em temperatura ambiente e os conservantes metilparabeno e propilparabeno foram dissolvidos em água destilada previamente aquecida (80°C). Depois do intumescimento do polímero o mesmo foi colocado por mais 30min em agitação a 750 RPM e aos poucos adicionada a solução contendo antioxidante e conservantes homogeneizados. A incorporação do extrato aquoso de *R. mangle* foi feita mediante a dissolução do mesmo em água

destilada sendo adicionado aos poucos na base das formulações sob agitação a 750 RPM para a homogeneização das mesmas, por fim, foi incorporado o Ácido Ascórbico com o auxílio de um gral com pistilo, armazenando-a sob temperatura ambiente (Figura 4).

Figura 4- Desenvolvimento dos hidrogéis com polímeros hidroxietilcelulose e goma xantana a base da associação entre o extrato aquoso de *Rhizophora mangle* e o Ácido Ascórbico.



Fonte: Adaptada de Admin (2012)

Em um béquer o antioxidante metabissulfito foi dissolvido em água destilada com temperatura ambiente e os conservantes metilparabeno e propilparabeno foram dissolvidos em água destilada previamente aquecida, em seguida foi homogeneizado a solução. O Poloxamer 407 foi vertido no béquer da solução e deixado em overnight no refrigerador. Com a base pronta foi incorporado o extrato aquoso de *R. mangle* e o Ácido Ascórbico com o auxílio do gral com pistilo (Figura 5).

Figura 5- Desenvolvimento dos hidrogéis com polímero Poloxamer 407 a base da associação entre o extrato aquoso de *Rhizophora mangle* e o Ácido Ascórbico.



Fonte: Adaptada de Admin (2012)

5.3.3 Avaliação Farmacêutica

5.3.3.1 Caracterização Organoléptica

Quanto às principais características organolépticas as amostras foram avaliadas segundo os seguintes critérios: aspecto, cor e odor (BRASIL, 2004).

5.3.3.2 Determinações do pH

O pH das formulações foi determinado através do pHmetro modelo PG 1800 (GEHAKA ®), previamente calibrado com as soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0, à temperatura de 4°C, sem diluição do produto (PRISTA et al., 2008).

5.3.3.3 Reologia

O comportamento reológico foi avaliado em viscosímetro rotacional da marca Rheology International (Figura 6) com parâmetro *Spindle* ASTM 7 e análise dos dados com o software Microsoft® Excel. A partir da construção do gráfico de viscosidade versus taxa de cisalhamento foi identificado o comportamento reológico dos produtos (GOEBEL, 2012).

Figura 6- Viscosímetro rotacional utilizado no teste de reologia com as formulações desenvolvidas.



Fonte: AUTORA

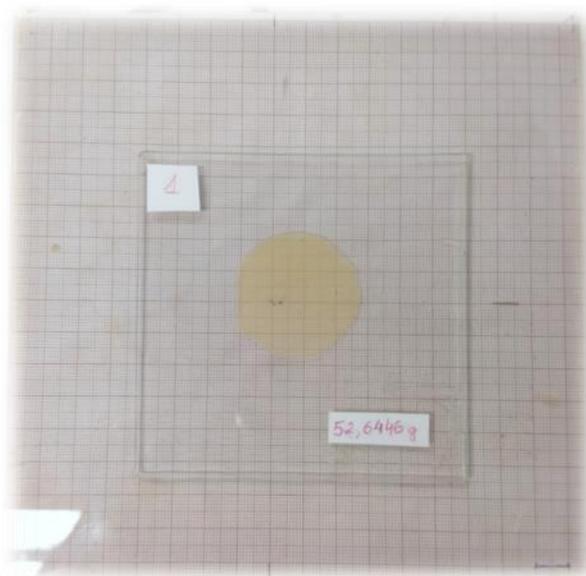
5.3.3.4 Determinação da espalhabilidade

A espalhabilidade foi determinada em triplicata pelo método adaptado de Borghetti & Knorst (2006). Em uma placa de vidro disposta sobre papel milimetrado, foi aplicado 0,5g da formulação e sobre cada uma delas foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido (52.6446g, 70.0193g, 70.2349g, 70.3389g, 70.2492g). Após um minuto de espalhamento, o diâmetro foi aferido em posições opostas e o diâmetro médio calculado. Esse procedimento foi repetido até um total de 5 placas (Figura 7). Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado, de acordo com a equação:

$$E_i = d^2 \pi / 4$$

No qual, E_i = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm²); d = diâmetro médio (mm).

Figura 7- Aparato utilizado no teste de espalhabilidade com as formulações desenvolvidas.



Fonte: AUTORA

5.4 ENSAIOS CITOTÓXICO

5.4.1 Casuística

5.4.1.1 Critérios de inclusão

Foram usadas células viáveis ($\geq 95\%$) isoladas de baço de camundongos Balb/c.

5.4.1.2 Critérios de exclusão

Células isoladas de baço de camundongos com baixa viabilidade ou portadores de alguma patologia.

5.4.2 Animais

Camundongos fêmeas BALB/c (6-8 semanas de idade, 5 animais) foram criados e mantidos nas instalações de animais do Laboratório de Imunologia de Keizo Asami - LIKA, localizado na Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os camundongos foram mantidos em condições laboratoriais padrão (20-22°C e 12 h ciclo diurno e noturno) com dieta padrão

(Labina / Purina, Campinas, Brasil) e água “ad libitum”. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (número de protocolo: 0048/2016 – ANEXO A).

5.4.3 Obtenção dos esplenócitos

Este procedimento foi realizado de acordo com Aguiar et al. (2019). Depois da eutanásia dos animais (gás CO₂), o baço de cada camundongo foi removido assepticamente e colocado num tubo Falcon contendo RPMI 1640 com soro fetal bovino (meio completo). Em uma capela, cada baço foi transferido para uma placa de Petri e macerados. As suspensões celulares obtidas a partir de cada baço foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10 mL de meio incompleto. Os homogeneizados de baço foram sobrepostos numa camada Ficoll-Paque TM PLUS, com a densidade ajustada para 1,076 g/mL e centrifugadas a 1000 xg à temperatura ambiente durante 25 min. A camada celular de interface contendo células imunes foi recuperada por pipeta Pasteur, lavada duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) e centrifugada duas vezes a 500g durante 10 min para obtenção do pélate. As células foram contadas numa câmara de Neubauer, e a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão do azul de tripan. As células foram usadas apenas quando a viabilidade foi > 95%.

5.4.4 Análise da viabilidade celular

Esplenócitos tratados com as formulações desenvolvidas descritas na tabela 3 nas concentrações de 0,05%, 0,1% e 0,2% passaram 24 horas de incubação bem como células não tratadas e foram centrifugados a 450 xg a 4 °C durante 10 min. Após descartar o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de PBS 1X ao precipitado e após ressuspensão, as células foram novamente centrifugadas (450 xg, 4°C, 10 min). O sedimento foi ressuspenso em 300 µL de tampão de ligação (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM), transferido para um tubo citométrico marcado e anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1: 500) e iodeto de propídio (PI, 20 µg / mL). A citometria de fluxo foi realizada em uma plataforma FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, EUA) e os resultados foram analisados usando o software CellQuest Pro (BD Biosciences). As células anexos-FITC negativo/ PI positivo foram consideradas como

necróticas e as células Anexina-FITC positivas/ PI negativas foram consideradas na fase inicial da apoptose. Os duplos negativos foram considerados células viáveis.

5.4.5 Ensaio de proliferação usando coloração com 5(6) éster de N-succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE)

O mesmo protocolo para os esplenócitos obtidos foi utilizado para o ensaio de proliferação usando 5-(6)-éster-de-N-succinimidil-de-diacetato-de-carboxifluoresceína (CFSE). Após a obtenção dos linfócitos, a solução celular foi centrifugada a 300 xg à temperatura ambiente durante 5 minutos com PBS 1X esterilizado adicionado com SFB 5% (pH 7,2). Depois disso, a solução celular foi ajustada para 1×10^6 cels/mL e recebeu 5 mM de CFSE. As células foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro e centrifugadas duas vezes a 300 xg por 5 minutos com PBS 1X estéril. As células marcadas com CFSE foram cultivadas durante 24 horas com 10 µg/mL das formulações desenvolvidas na concentração de 0.1% ou apenas meio de cultura (controle negativo). Após o término do tempo de cultivo, as células foram centrifugadas (300 xg por 5 min), foram transportadas para aquisição na plataforma FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences) e os resultados foram analisados usando o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

5.5 ENSAIOS IMUNOMODULADOR

5.5.1 Medição da produção de citocinas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA)

Os sobrenadantes das culturas tratadas com as formulações desenvolvidas na concentração de 0.1% durante 24h e 48h, assim como as células não tratadas (controle negativo), foram coletados para a medição da produção de citocinas. A avaliação das citocinas foi realizada utilizando a citocina Th1/Th2/Th17 Mouse (Becton Dickinson Biosciences, EUA) para a detecção simultânea das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ).

A medição de citocinas baseou-se no princípio da tecnologia Cytometric bead array (CBA) e todos os dados foram adquiridos na plataforma FACSCalibur. A técnica CBA utiliza micropartículas ou esferas marcadas com intensidade de fluorescência discreta. As beads de

captura foram marcadas com alo ficocianina e foram lidas a 650 nm. O anticorpo de detecção específico para citocinas foi marcado com fluorocromo de ficoeritrina que emite a 585 nm em parâmetros amarelos. A intensidade de fluorescência do parâmetro amarelo é proporcional à quantidade de citocina presente nas amostras teste. Resumidamente, amostras de teste (50 µL) e anticorpo de detecção de ficoeritrina foram incubadas com as beads de captura e reagente de detecção durante 2h no escuro à temperatura ambiente. Todos os anticorpos não ligados foram lavados (1,0 mL de tampão de lavagem) e ressuspensos em 300 µL de tampão de fixação antes da aquisição de dados na plataforma FACSCalibur. Cada citocina apresentou um pico único e bem separado e sete curvas padrão de citocinas individuais (0-5000 pg/mL) foram executadas em cada ensaio.

5.5.2 Ensaio de imunofenotipagem de linfócitos

Os linfócitos e monócitos presentes nos esplenócitos dos camundongos foram cultivados em placas de 24 poços (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), com uma densidade de 10^6 células / poço, na presença e ausência das formulações na concentração de 0.1% a 12,5 µg / mL e RPMI. Após este tempo de incubação, as células foram removidas das placas utilizando PBS-Wash 1% gelado e inseridas em tubos de polipropileno de 15 mL (BD Biosciences) com 6 mL de PBS-Wash para centrifugação (400 x g durante 10 min). Após descartar o sobrenadante, as células foram lavadas com 2 mL de PBS-Wash e centrifugadas (400 x g durante 5 min). O sobrenadante foi descartado e os anticorpos monoclonais de superfície foram adicionados a tubos e incubados durante 30 minutos. Após este tempo, realizaram-se duas etapas de lavagem com 1 mL de PBS-Wash seguido de centrifugação (400 x g durante 5 min). Os sobrenadantes foram rejeitados e as células foram fixadas durante 15 minutos com 150 mL de solução de Cytotfix (BD Biosciences). As células foram lavadas com 2 mL de PBS-Wash seguido de centrifugação (400 x g durante 5 min). Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 300 µL de PBS-Wash a cada tubo, o qual foi carregado na plataforma FACSCalibur. Os anticorpos monoclonais utilizados neste ensaio Rat Anti-mouse CD4, PE Rat Anti-mouse CD8 and FITC Rat Anti-mouse CD16/CD32 (BD Biosciences).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados no software Sigma, versão 2.23.03. A normalidade das variáveis quantitativas foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para detectar as diferenças entre os grupos, utilizou-se o teste de Wilcoxon. O teste *t*-Student foi utilizado para analisar os resultados do ensaio de viabilidade celular. Todos os resultados foram expressos como média \pm Desvio Padrão e um valor de $p < 0,0001$ foi considerado como estatisticamente significativo.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 RESULTADOS

6.1.1 Obtenção e Desenvolvimento dos Hidrogéis

Dos três agentes gelificantes avaliados apenas a goma xantana apresentou-se compatível com os ativos. Por apresentar uma melhor consistência e aspecto, a concentração de goma xantana escolhida para o hidrogel foi de 1,5% (F3), sendo divididos em sete formulações com combinações variadas de concentrações de ativos para avaliação farmacêutica, citotóxica e imunomoduladora (tabela 3).

Tabela 3- Composição das formulações de goma xantana 1,5% contendo extrato das folhas de *R. mangle* e Ácido Ascórbico em diferentes concentrações.

COMPOSIÇÃO (%; P/V)	F3(a)	F3(b)	F3(c)	F3(d)	F3(e)	F3(f)	F3(g)
Extrato <i>R. mangle</i> (%)	-	-	5	5	5	5	5
Metabissulfito de Sódio (%)	0,2	1	0,2	0,2	0,2	1	1
Metilparabeno (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Propilparabeno (%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Goma Xantana (%)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Ácido Ascórbico (%)	-	-	-	5	10	10	5
Água destilada q.s.p (g)	100	100	100	100	100	100	100

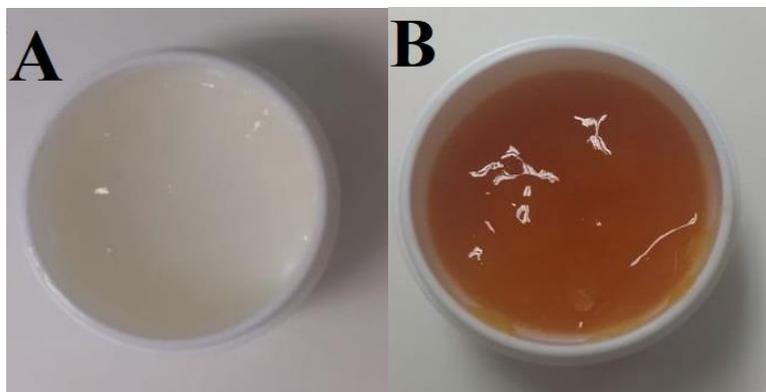
Legenda: F: Formulação; %: concentração do composto no total da formulação; P/V: peso do composto por volume.

6.1.2 Avaliação Farmacêutica

6.1.2.1 Caracterização Organoléptica

As formulações com a goma xantana associada aos ativos (Figura 8B) apresentaram aspecto homogêneo, cor alaranjada, superfície lisa, com brilho intenso, translúcida e odor típico dos ativos *R. mangle* e Ácido Ascórbico.

Figura 8- Formulações desenvolvidas com goma xantana 1,5% placebo (A) e incorporado com os ativos *R. mangle* e ácido ascórbico (B).



Fonte: AUTORA

6.1.2.2 Determinações do pH

O pH das formulações estudadas apresenta-se entre 5.0 e 5.3, conforme demonstrado na tabela 4.

Tabela 4- Valores médios de pH das formulações a base de *R. mangle* e Ácido Ascórbico.

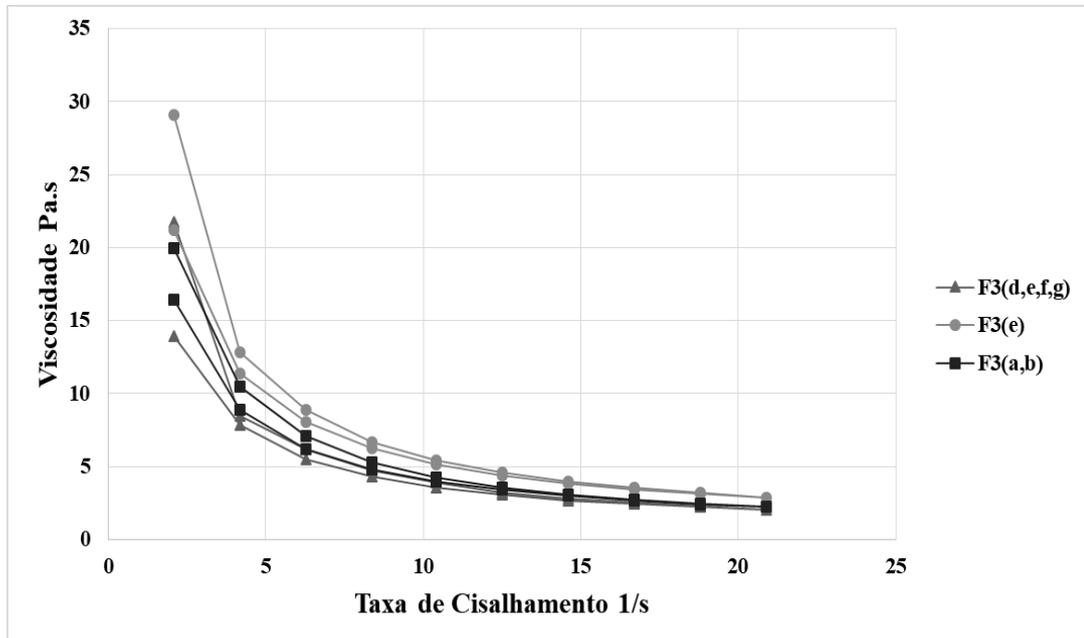
Parâmetro n=3	F3(a)	F3(b)	F3(c)	F3(d)	F3(e)	F3(f)	F3(g)
pH \pm SD	5,0 \pm 0,1	5,1 \pm 0,15	5,1 \pm 0,15	5,2 \pm 0,1	5,0 \pm 0,05	5,1 \pm 0,05	5,3 \pm 0,07

Legenda: F: Formulação.

6.1.2.3 Reologia

As formulações em estudo apresentaram comportamento não-Newtoniano do tipo pseudoplástico (figura 9), não apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparados.

Figura 9- Reograma das formulações. F3(d, e, f, g): formulações com a associação de extrato de *R. mangle* e Ácido Ascórbico, F3(c): formulação com extrato de *R. mangle* e F3(a, b): placebo das formulações.

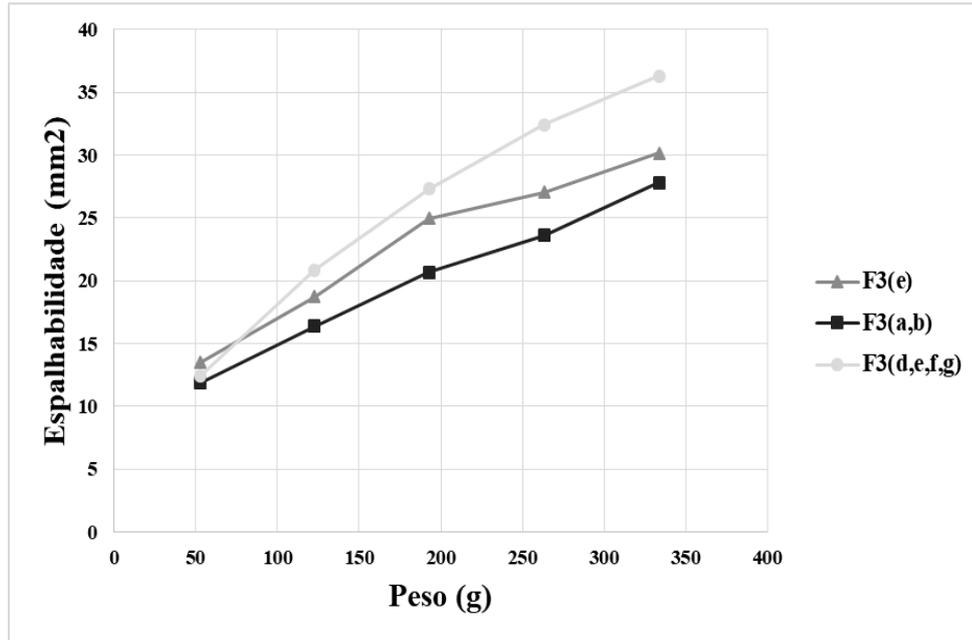


Fonte: AUTORA

6.1.2.4 Determinação da espalhabilidade

A espalhabilidade das formulações apresentou um aumento gradativo em função do peso (g) aplicado sobre as amostras (figura 10), não apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparados.

Figura 10- Gráfico da espalhabilidade das formulações em função do peso (g) aplicado sobre as amostras. F3(d, e, f, g): formulações com a associação de extrato de *R. mangle* e Ácido Ascórbico, F3(c): formulação com extrato de *R. mangle* e F3(a, b): placebo das formulações.

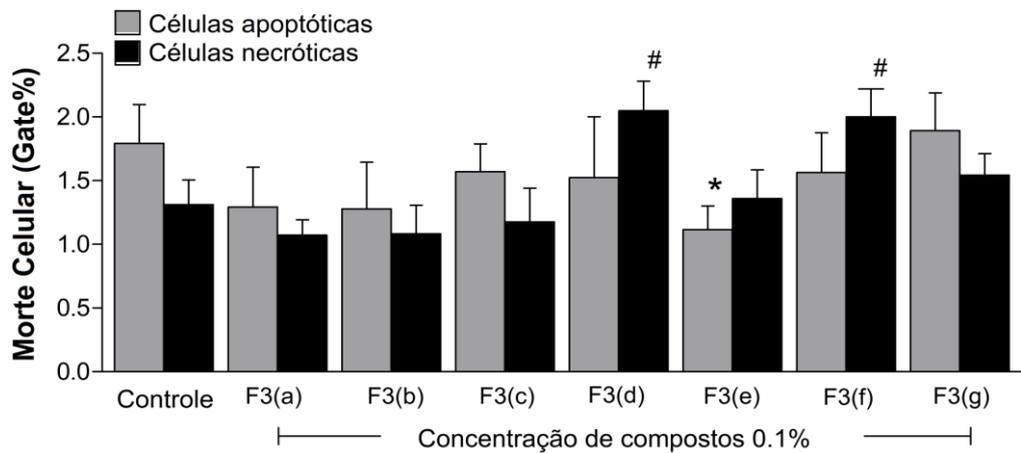


Fonte: AUTORA

6.1.3 Avaliação da atividade Citotóxica

Após a avaliação da equivalência farmacêutica das formulações (tabela 3), as mesmas foram submetidas a um ensaio de viabilidade celular com o intuito de avaliar se os hidrogéis a base de *R. mangle* e Ácido Ascórbico (associação ativa) podem promover danos as células animais. O teste de viabilidade celular mostrou que 96% das células permaneceram vivas após o tratamento com as sete formulações analisadas nas concentrações de 0,05%, 0,1% e 0,2%; escolhendo o material referente a concentração 0,1% para os testes seguintes. As células inviáveis foram equivalentes a 4%, onde as formulações F3(d) e F3(f) apresentaram indução de necrose mais elevada quando comparada ao controle, enquanto a formulação F3(e) apresentou indução a apoptose em valor menor quando comparado ao controle. Os valores apoptóticos e necróticos encontrados para as células tratadas com as formulações F3(a, b, c, g) não foram estatisticamente significativos em relação controle (Figura 11).

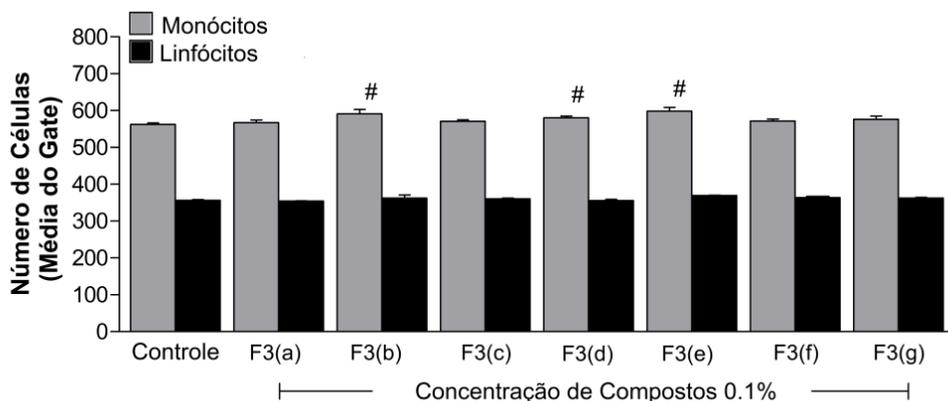
Figura 11- Viabilidade celular dos esplenócitos de camundongos tratados com as formulações desenvolvidas em diferentes concentrações dos ativos. As barras cinzas verticais representam indução a apoptose celular e as barras pretas verticais representam indução a necrose celular. As barras verticais representam a média do experimento em triplicata. #p<0.0001.



Fonte: AUTORA

Para avaliar se as formulações (tabela 3) foram capazes de ativar células imunológicas do baço de camundongos, foi realizado um ensaio para investigar o índice de proliferação das mesmas. Mostrando que referente aos linfócitos não aconteceu indução significativa a proliferação das células tratadas quando comparadas ao controle, entretanto em relação aos monócitos pode ser observado uma maior indução quanto ao índice de proliferação celular quando tratadas com as formulações F3(b, d, e) comparando ao controle (Figura 12).

Figura 12- Índice de proliferação promovido pelas formulações desenvolvidas em culturas de esplenócitos marcados com CFSE. As barras cinzas verticais representam culturas de monócitos tratados e as barras pretas verticais representam culturas de linfócitos tratados. As barras verticais representam a média do experimento em triplicata. # $p < 0.0001$.

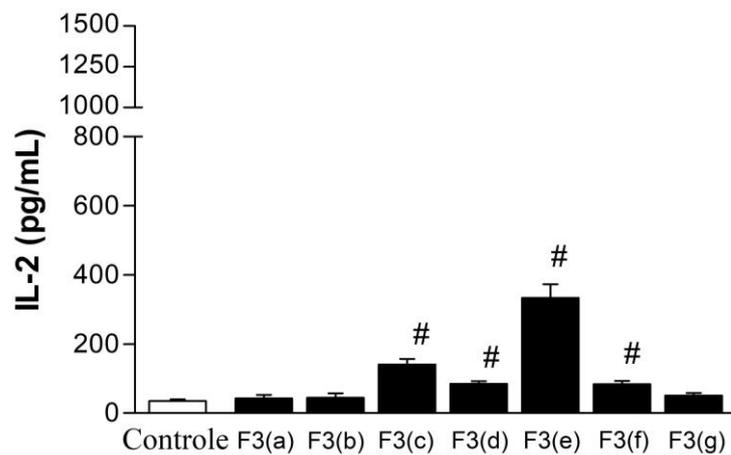


Fonte: AUTORA

6.1.4 Avaliação da atividade imunomoduladora

Na investigação quanto a produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e INF- γ em células tratadas com os hidrogéis a base da associação de *R. mangle* e Ácido Ascórbico (tabela 3), os resultados da produção de citocinas mostraram que IL-6 e INF- γ não foram produzidas pelos mesmos. Entretanto nas formulações F3(c, d, e, f) induziram a produção de IL-2 (figura 13), IL-4 (figura 14), IL-10 (figura 15), TNF- α (figura 16) e as formulações F3 (c, d, e, f, g) induziram a produção de IL-17 (figura 17) que em relação ao controle tiveram maior e significativa produção. A formulação F3(e) comparada ao controle e as outras formulações que apresentaram significância destacou-se quanto a produção das citocinas citadas.

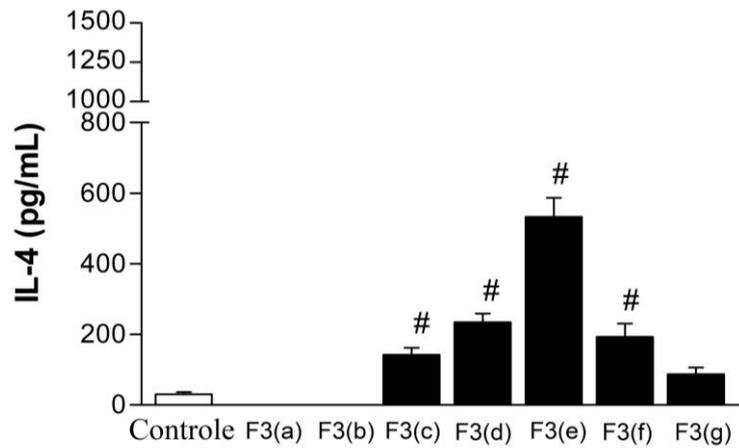
Figura 13- Perfil da produção de citocinas IL-2 promovido pelas sete formulações desenvolvidas em culturas de esplenócitos de camundongos. A barra branca vertical representa culturas de controle (células + médias) e as barras pretas verticais representam culturas tratadas com as formulações desenvolvidas. As barras verticais representam a média do experimento em triplicata. # $p < 0.0001$.



Fonte: AUTORA

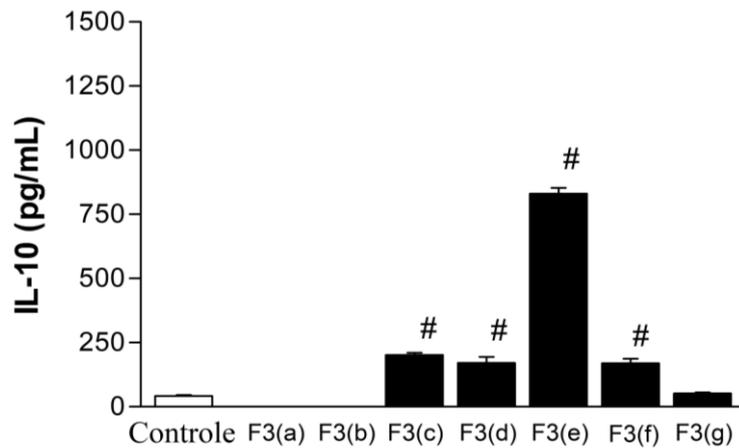
Figura 14. Perfil da produção de citocinas IL-4 promovido pelas sete formulações desenvolvidas em culturas de esplenócitos de camundongos. A barra branca vertical representa culturas de controle (células + médias) e as barras pretas verticais representam

culturas tratadas com as formulações desenvolvidas. As barras verticais representam a média do experimento realizado em triplicata. # $p < 0.0001$.



Fonte: AUTORA

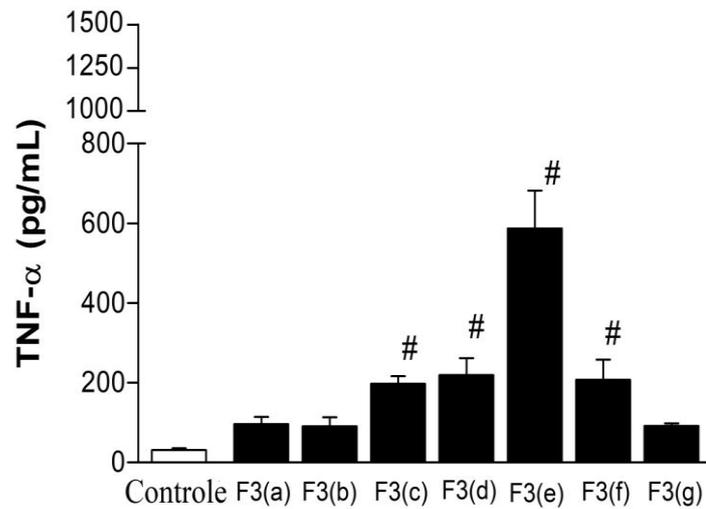
Figura 15- Perfil da produção de citocinas IL-10 promovido pelas sete formulações desenvolvidas em culturas de esplenócitos de camundongos. A barra branca vertical representa culturas de controle (células + médias) e as barras pretas verticais representam culturas tratadas com as formulações desenvolvidas. As barras verticais representam a média do experimento realizado em triplicata. # $p < 0.0001$.



Fonte: AUTORA

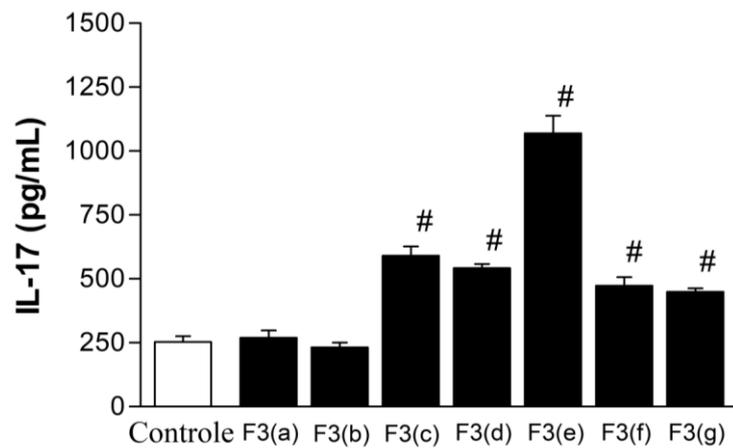
Figura 16- Perfil da produção de citocinas TNF- α promovido pelas sete formulações desenvolvidas em culturas de esplenócitos de camundongos. A barra branca vertical representa culturas de controle (células + médias) e as barras pretas verticais representam

culturas tratadas com as formulações desenvolvidas. As barras verticais representam a média do experimento realizado em triplicata. # $p < 0.0001$.



Fonte: AUTORA

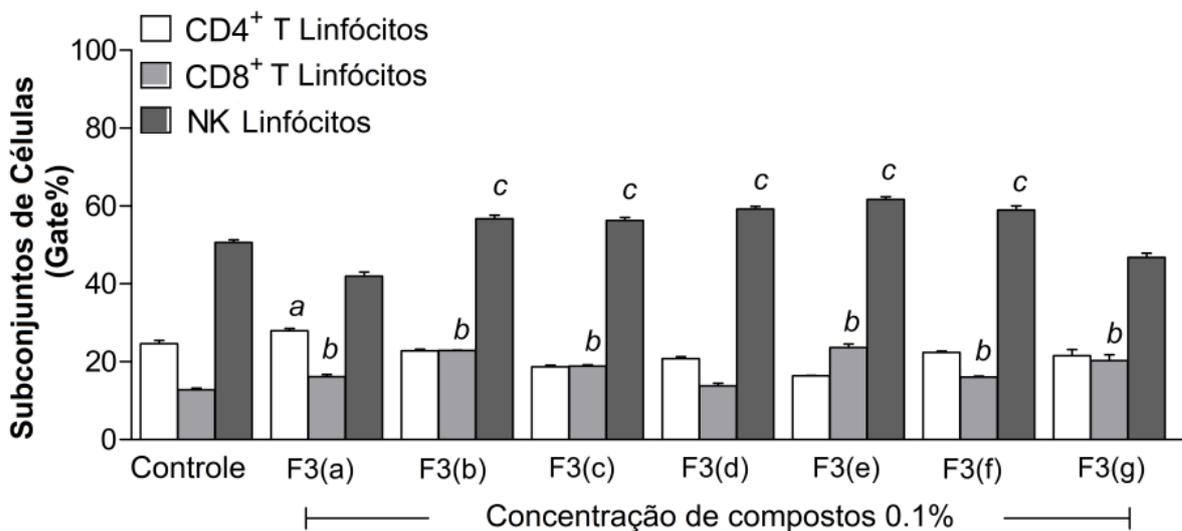
Figura 17- Perfil da produção de citocinas IL-17 promovido pelas sete formulações desenvolvidas em culturas de esplenócitos de camundongos. A barra branca vertical representa culturas de controle (células + médias) e as barras pretas verticais representam culturas tratadas com as formulações desenvolvidas. As barras verticais representam a média do experimento realizado em triplicata. # $p < 0.0001$.



Fonte: AUTORA

Os ensaios de imunofenotipagem foram realizados para analisar a capacidade das formulações (tabela 3) em induzir proliferação, ativação ou inibição de subunidades de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e NK. Os resultados mostraram que apenas na formulação F3(a) o subgrupo de linfócitos T CD4⁺ induziu proliferação, ativação significativa quando comparado ao controle. As formulações F3 (a, b, c, e, f, g) induziram proliferação, ativação quando comparados ao controle do subgrupo de linfócitos T CD8⁺, entretanto a formulação F3 (d) não apresentou alterações. Notou-se que as formulações F3 (b, c, d, e, f) induziram proliferação, ativação significativa do subgrupo NK, enquanto as formulações F3(a, g) apresentaram inibição (Figura 18).

Figura 18- Ensaio de proliferação, ativação e inibição *in vitro* induzidos por formulações a base da associação de extrato de *R. mangle* e Ácido Ascórbico em subconjuntos de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e NK. As barras verticais representam a média do experimento realizado em triplicata. #p<0.0001.



Fonte: AUTORA

6.2 DISCUSSÃO

No mercado biotecnológico e farmacêutico o desenvolvimento de materiais como cremes, óleos, pomadas, hidrogéis e substitutos de pele para o tratamento da reparação tecidual em seus diversos níveis é uma temática vasta e com elevada complexidade (SMANIOTTO et al., 2012). O processo cicatricial leva em conta vários fatores biológicos como também clínicos que interferem diretamente para o processo ser realizado com êxito (BARRETO et al., 2018). Mediante este cenário, o desenvolvimento de novos materiais para o tratamento de feridas cutâneas tornou-se um campo de ampla exploração científica, quando relacionado à criação de novos curativos incorporados a ativos sintéticos, semissintéticos e naturais de forma isolada ou associada com o intuito de auxiliarem no tratamento da inflamação e cicatrização do ferimento (FRANCO & GONÇALVES, 2008; MELO & FERNANDES, 2011; SMANIOTTO et al., 2012).

No desenvolvimento de formulações objetivando o tratamento tópico, é necessário considerar características que facilitem a penetração do seu ativo através da pele, permitindo a interação do veículo e da pele, proporcionando a passagem da substância ativa (FOLDVARI & BAGONLURI, 2008). A faixa de pH tolerado pela pele pode variar de 4,6 a 5,8 (GONÇALVES, 2017). Os valores de pH das setes formulações estudadas neste trabalho, tiveram variação entre 5,0 e 5,3, sendo compatíveis com os valores de pH tolerados pela pele. Em seu estudo Roger et al., (2011) revelou que os valores de pH de formulações contendo o extra de *R. mangle* ficaram próximos de 6,0 a 7,0; enquanto formulações com ácido ascórbico no trabalho de Maia (2002) demonstraram valores de 3,1 a 3,3. O pH levemente ácido no leito da ferida favorece as condições de cicatrização e a proteção contra infecções demonstrando melhores resultados do que aquelas com pH básico, tornando-se um ponto relevante também quanto a penetração cutânea do Ácido Ascórbico na pele, que possui melhor absorção do ativo em meios mais ácidos (MAIA, 2002; SOUZA, 2016).

As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação e aplicação de produtos de uso tópico (CORRÊA, 2005). Em análises realizadas neste trabalho, os hidrogéis contendo 1,5% de goma xantana apresentaram comportamento não-Newtoniano do tipo pseudoplástico, onde têm sua viscosidade aparente diminuída gradualmente, à medida que aumenta a tensão de cisalhamento, conferindo característica importante para formulações de uso tópico (MIURA, 2012). Segundo Lourenço (2013) a

absorção de agentes ativos pela pele diminui com o aumento da viscosidade do veículo, verificando uma relação inversa entre viscosidade e absorção. Outra vantagem para esse comportamento é a capacidade de deformação durante a aplicação, facilitando o espalhamento, seguida da recuperação da viscosidade quando se encerra a aplicação, evitando que o produto escorra (CORRÊA, 2005).

As características de espalhamento sobre a pele são importantes, tanto do ponto de vista sensorial como de eficácia, corroborando com os resultados reológicos, quando referenciados a relação de viscosidade e espalhabilidade, do modo que uma diminuição da viscosidade implica em um aumento da espalhabilidade (ANDRADE, 2017). As formulações avaliadas neste estudo apresentaram um aumento na espalhabilidade quando empregado um peso nas mesmas, observando assim uma característica favorável em relação a formulação tópica. Miura (2012) em estudo com profissionais de um Ambulatório de Feridas, ressaltou as perspectivas quanto a consistência de um material destinado a aplicação em feridas durante a execução dos curativos; os mesmos chegaram ao consenso que a melhor formulação deveria ser de fácil aplicação e remoção, mas não tão fluida que escorresse dos limites da lesão durante o período de ação do ativo, corroborando assim, com as características apresentadas dos hidrogéis em avaliação.

A avaliação de compostos quanto a sua toxicidade pode ser feita de várias maneiras entre elas o teste de citotoxicidade que define o potencial toxicológico de um material sobre cultura de células, sendo, portanto, um pré-requisito para a avaliação de biocompatibilidade (LOPES et al., 2019). As células imunológicas tratadas com os hidrogéis expuseram viabilidade de 96%, denotando que as formulações em estudo não apresentam perfil citotóxico, caracterizando indução na proliferação dos monócitos e estabilidade dos linfócitos quando comparados ao controle. O uso associado do extrato de *R. mangle* e o Ácido Ascórbico não é descrito na literatura, porém pode ser observado estudos separadamente.

Almeida (2017) relata em seu trabalho que o extrato metanólico das folhas de *R. mangle* não apresentou perfil citotóxico, frente as células imunológicas, sendo capaz de induzir proliferação nos esplenócitos. Enquanto Araújo (2015), avaliou o extrato aquoso das folhas de *R. mangle* revelando que o mesmo atuou na proliferação de células *HeLa*, demonstrando efeito mitogênico, sem atividade citotóxica. Em relação ao Ácido Ascórbico estudos relatam um citotoxicidade seletiva, uma vez que dados obtidos através de estudos *in vitro* e *in vivo*

mostram que essa substância causa danos as células tumorais, preservando as células normais, sendo verificado esse efeito em linhagens celulares diferentes, tendo importância em salientar que essa resposta seletiva é dependente do tempo de incubação e da sua concentração (MAMEDE, 2012; MATA, 2016).

Diante das implicações que envolvem o tempo de reparação das feridas cutâneas, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de se minimizar o período de reparo por meio da modulação de seus componentes. Segundo Campos et al., (2007) a evolução do processo de forma didática abrange três fases, com limites não distintos, sobrepostos temporalmente: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de remodelação ou de maturação. O conhecimento das células e citocinas que participam do processo é fundamental para que tal modulação seja eficaz.

As citocinas são liberadas por diferentes células do hospedeiro para estimular e regular outras células através de receptores específicos que participam no controle de todos os eventos imunologicamente relevantes, como a ativação, diferenciação, maturação, proliferação e a sobrevivência da célula (LIPMAN et al., 2010). Sendo mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida (OLIVEIRA et al., 2011). A associação dos ativos nos hidrogéis neste estudo induziu a produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-17 e TNF- α quando comparado ao controle em esplenócitos estimulados.

Estudos com compostos naturais demonstraram indução a produção de citocinas como IL-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ por meio do extrato metanólico de folhas de *R. mangle* (ALMEIDA, 2017) e TNF- α , IL-6 e IL-10 em células animais tratadas por ligninas isoladas (FILHO et al., 2018) como também a indução a produção de TNF- α , IL-2, IL-10 e IFN- γ em linfócitos tratados com extrato aquoso de folhas de *Conocarpus erectus* (SANTOS et al., 2018) enquanto, trabalhos relacionados ao ácido ascórbico evidenciam a indução a produção de IL-1 e TNF- α em resposta a diferentes estímulos pró-inflamatórios e tipos celulares variados (PRIANTE et al., 2002; KRAYCHETE et al., 2006). Citocinas como IL-2 e TNF- α estão associadas à resposta imunológica pró-inflamatória, presente em danos teciduais (OLIVEIRA et al., 2011). Em contrapartida, citocinas IL-4 e IL-10, auxilia a síntese de anticorpos por plasmócitos e ativação de eosinófilos, além de participar da resposta cicatricial e processos fibróticos (CINSA et al., 2013; MEDEIROS & FILHO, 2016). Quanto a IL-17

desempenha papéis reguladores fundamentais na defesa do hospedeiro e nas doenças inflamatórias, além de procedimento pós -cirúrgico, trauma ou durante as infecções (JIN & DONG, 2013).

Em nosso estudo, os resultados do ensaio de imunofenotipagem com as sete formulações desenvolvidas apresentaram a proliferação, ativação dos subgrupos de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e NK tendo variação quanto à significância quando comparado ao controle dependendo da formulação avaliada. Gupta et al., (2011) relatou em seu trabalho que *Browelia serrata* promoveu um aumento significativo nos subgrupos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ de células do baço, como também no estudo de Santos et al., (2018) mostraram que o extrato aquoso de folhas de *Conocarpus erectus* induziu ativação e proliferação dos linfócitos T CD8⁺ sem alteração nos subgrupos de linfócitos T CD4⁺ e não inibiu subgrupos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Enquanto o extrato etanólico das sementes de *Psoralea corylifolia* combateu as células tumorais através da ativação das células NK (NUNES-PINHEIRO, 2003). A ativação e proliferação dessas células tem relação direta com a resposta imune que vai ser empregada quanto a situações adversas em que o organismo pode enfrentar, como a reparação tecidual ou processo inflamatório (SANTOS et al., 2018).

Das sete formulações avaliadas no presente estudo, a que apresentou resultados mais expressivos quanto a proliferação celular e atividade imunomoduladora foi a F3(e) com concentração dos ativos em 5% do extrato de *R. mangle* e 10% do ácido ascórbico. Araújo (2015) usou no desenvolvimento de creme cicatrizante o extrato aquoso das folhas de *R. mangle* na concentração de 5% indicando resultados favoráveis para reparação tecidual em testes *in vitro* e *in vivo*. A mesma concentração de 5% também foi utilizada por Lopes et al., (2019) na avaliação de um creme cicatrizante com extrato de *Avicennia schaueriana*.

Quanto as concentrações usuais do ácido ascórbico em formulações farmacêuticas encontram-se variações de 5% a 15%, sendo que a maior eficácia é obtida com no mínimo 10% (BAGATIN, 2009). Estudos constataram que a concentração de 20% em formulações leva ao nível máximo de absorção do ativo pela pele, porém por razões ainda não estabelecidas concentrações superiores resultaram em um decréscimo nos níveis teciduais (AZULAY et al., 2003), enquanto a concentração de 15% aplicadas diariamente no período de cinco dias, mostraram, após três dias, uma saturação de concentração de ácido ascórbico na pele (DALCIN et al., 2003). Os resultados em questão sugerem o potencial biológico dos

hidrogéis a base da associação de *R. mangle* e o ácido ascórbico, sendo uma temática em desenvolvimento, tendo em vista a escassez de trabalhos quanto a associação desses compostos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que o polímero com maior indicação para o desenvolvimento de hidrogéis com a associação do extrato aquoso das folhas de *R. mangle* e Ácido Ascórbico foi a goma xantana, apresentando características organolépticas que demonstram a biocompatibilidade entre o ativo e a base das formulações. Ensaios farmacêuticos demonstraram que as formulações apresentam pH dentro da faixa tolerada pela pele, comportamento não-Newtoniano do tipo pseudoplástico, tendo os resultados da espalhabilidade corroborando com esse comportamento. Além disso, mostraram ser formulações sem atividade citotóxica com uma taxa de viabilidade celular de 96% mesmo nas doses mais elevadas como também atividade imunomoduladora em culturas de esplenócitos de camundongos. Estes achados proporcionaram uma compreensão inicial da resposta imunológica e do potencial efeito cicatrizante *in vitro* promovidos pelo hidrogel de *Rhizophora mangle* 5% e Ácido Ascórbico 10% (F3e).

O extrato de *R. mangle* e o Ácido Ascórbico de forma separada são estudados quanto aos seus potenciais terapêuticos na cicatrização, porém sua associação até o momento não foi relatada nos bancos de dados de pesquisas científicas. Diante do exposto, este trabalho experimental trouxe informações adicionais a respeito de atividades biológicas da associação desses ativos, perfil de atividade citotóxica e efeitos imunológicos produzidos em células de esplenócitos de camundongos, consiste em dados valiosos para a compreensão do uso destes ativos associados para fins terapêuticos. Nossos resultados sugerem que a formulação desenvolvida pode ser eficiente na cicatrização de feridas, possuindo potencial necessário para a ampliação de pesquisas em tecnologias e terapias apropriadas.

7.2 CONCLUSÕES

- Dos três polímeros testados no ensaio de pré-formulações em variadas concentrações, a goma xantana na concentração de 1,5% (F3) apresentou maior compatibilidade com a associação dos ativos.
- As características organolépticas das formulações (F3) foram aspecto homogêneo, cor alaranjada, superfície lisa, com brilho intenso, translúcida e odor típico dos ativos.
- O pH das formulações estudadas apresenta-se entre 5,0 e 5,3.
- As formulações em estudo apresentaram comportamento não-Newtoniano do tipo pseudoplástico, tendo o ensaio de espalhabilidade corroborando com esse comportamento.
- As formulações F3 (a, b, c, d, e, f, g) não apresentaram perfil citotóxico nas concentrações testadas 0,05%, 0,1% e 0,2%; na concentração de 0,1% apresentou 96% de viabilidade celular, observando uma maior indução de monócitos quanto ao índice de proliferação celular quando tratadas com as formulações F3(b, d, e) comparando ao controle.
- As formulações F3 (a, b, c, d, e, f, g) foram capazes de promover imunomodulação em culturas de esplenócitos de camundongos através da, ativação e proliferação de subconjuntos de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e NK, produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α e IL-17. A formulação F3(e) comparada ao controle e as outras formulações destacou-se quanto a atividade imunomoduladora estudada.

REFERÊNCIAS

ADMIN. Vidrarias de Laboratório. Disponível em:

<www.vidrariadelaboratorio.com.br/vidrarias-de-laboratorio-2>. Acesso em: 11/09/2019.

AGUIAR, L.M.S.; NASCIMENTO, D.K.D.; RAMOS, B.A.; MOURA, M.C.; COELHO, L.C.B.B.; NAPOLEÃO, T.H.; CORREIA, M.T.S.; FILHO, I.J.C.; MAIOR, A.M.S.; SILVA, T.D.; LIMA, C.S.A.; LORENA, V.M.B.; MELO, C.M.L. Antioxidant, antimicrobial and immunostimulant properties of saline extract from *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz (Fabaceae) leaves. **Indian Journal of Traditional Knowledge**. v. 18 p. 281–289. 2019.

ALMEIDA, V. S. Investigação de Atividade Citotóxica, Antibacteriana e Imunomoduladora do Extrato Metanólico de *Rhizophora Mangle* Linneus (Rhizophoraceae). 2017. 80 f. Dissertação (Pós-Graduação em Morfotecnologia), **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2017.

ANDRADE, V. M. Obtenção De Gel Contendo Rutina Para Aplicação Transdérmica: Caracterização, Estabilidade E Atividade Antioxidante. 70 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), **Universidade Federal de Sergipe**, São Cristóvão, 2017.

AQUINO, J. S. & FELIPE, D. F. Avaliação da Estabilidade Acelerada de Diferentes Formulações Contendo Vitamina C. **Revista Saúde e Pesquisa**. v. 7, p. 119-128. 2014.

ARAÚJO, S. A. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MIRANDA, A. M.; LIMA, F. E. S.; MELO, V. S. P.; RICARTE, A. R. F.; COSTA, E. C. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**. v.18 p. 25-31. 2008.

ARAÚJO, J. G. Desenvolvimento de creme de *Rhizophora mangle* L: avaliação do potencial cicatrizante em feridas cutâneas. 2015. 132 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências da Saúde), **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2015.

ARAÚJO, J. A. P.; JUNIOR, D. M.; CRUVINELA, W. M.; SALMAZI, K. I.; KALLÁS, E. G.; ANDRADE, L. E. C. Linfócitos Th17 e linfócitos T CD4⁺ multifuncionais em pacientes

com lúpus eritematosos sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 56, p. 28-36. 2016.

ARCHANA, J.; ATAWA, S.; PAUL, R.; TIWARI, A. A Rich Source of Natural Immuno-Modulador. Indian Medicinal Plants. **Internacional Journal Pharmacology**. v.7, p. 198-205. 2011.

AZULAY, M. M.; LACERDA, C. A. M.; PEREZ, M. A.; FILGUEIRA, A. L.; CUZZI, T. Vitamina C. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 78, p. 265-274. 2003.

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

BAGATIN, E. Mecanismos do envelhecimento cutâneo e o papel dos cosmecêuticos. **Revista Brasileira de Medicina** v. 66, p. 5-11. 2009.

BANDARANAYAKE, W. M. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. **Wetlands Ecology and Management** v. 10, p. 421-52. 2002.

BARRETO, L. S.; GOIÁS, G. S.; SILVA, M. F.; SILVA, I. D. L.; LIMA, J. C. C.; ALVES, I. B. V.; JUNIOR, S. A.; VINHAS, G. M. Nanobiocompósito de quitosana e nanowiskers de celulose sob forma de hidrogel para curativo. **Revista de Ciência, Tecnologia e Humanidades do IFPE**. V. 10, p. 121-128. 2018.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes in vitro e in vivo Utilizados na Triagem Toxicológica de Produtos Naturais. **Visão Acadêmica**. v. 11, n. 2, p. 43-50, 2010.

BORGES, C. D. & VENDRUSCOLO, C. T. Goma Xantana: Características e condições operacionais de produção Semina. **Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 29, p. 171-188. 2008.

BORGHETTI, G. S. & KNORST M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, p. 531-537. 2006.

BRADLEY, L. M. Migration and T-lymphocyte effector function. **Current Opinion Immunology**. v. 15, p. 343-8. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de Produtos Cosméticos. Série Temáticas; Brasília: ANVISA; 2004. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+de+Estabilidade+de+Produtos+C3%A9ticos/49cdf34c-b697-4af3-8647-dcb600f753e2> Acesso em: 11/09/2019.

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

BURKE, K. Interaction of vitamins C and E as better cosmeceuticals, **Dermatology Therapy**. v. 20 p. 314-321. 2007.

CALLAN JR. C. G.; MORA, T.; WALCZAK, A. M. Repertoire sequencing and the statistical ensemble approach to adaptive immunity. **Current Opinion in Systems Biology**. v. 1, p. 44-47. 2017.

CAMPOS, A. C. L; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiro Cirurgia Digestiva**. v.20, p. 51-58. 2007.

CAMPOS, D. L.; PONTES, L. F.; SILVA, F. T. J. N.; JÚNIOR, A. T. T. Uma Abordagem Sobre a Inter-Relação de Citocinas na Artrite Reumatoide. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente** v. 7, p. 93-102. 2016.

CHUNG, K. C.; GLORI, A. K. Systematic review of skin graft donor-site dressings. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 124, p. 307-8. 2009.

CINSA, L.; GUALBERTO, A. C. M.; LOPES, K. H. S. Processo Cicatricial Cutâneo e Perfil de Citocinas. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 5, p.17-21, 2013.

CORDEIRO, M. S. F.; COSTA, J. K. B.; LIMA, C. G.; JÚNIOR, J. D. C. C.; MELO, A. F. M. Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do

óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 94, p.148-153. 2013.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO, J. F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revisita Brasileira de Farmácia**. v. 41, p. 73-78. 2005.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; SCOTT, A. P.; WATERHOUSE, N. J. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**. v. 11, p. 953-957. 2016.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 50, p. 434-461. 2010.

DALCIN, K. B.; SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S.S. Vitamina C e seus derivados em produtos dermatológicos: Aplicações e Estabilidade. **Caderno de Farmácia**. v. 19, p. 69-79. 2003.

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

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J.L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**. v. 23, p. 2709-2728. 2006.

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

- FOLDVARI, M. & BAGONLURI, M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines II. Drug delivery and biocompatibility issues. **Nanomedicine**. v. 4, p. 183-200. 2008.
- FILHO, I. J. C.; BARROS, B. R. S.; AGUIAR, L. M. S.; NAVARRO, C. D. C.; RUAS, J. S.; LORENA, V. M. B.; ROCHA, G. J. M.; VERCESI, A. E.; MELO, C. M. L.; MAIOR, A. M. S.; Lignins isolated from Prickly pear cladodes of the species *Opuntia ficusindica* (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller induces mice splenocytes activation, proliferation and cytokines production. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 123, p. 1331-1339. 2018.
- FRANCO, D. & GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. V. 35, p. 203-6. 2008.
- GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J. A.; GOMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**. v. 18, p. 549-579.2000.
- GIULIANO, E.; PAOLINO, D.; FRESTA, M.; COSCO, D.; Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: an overview. **Pharmaceutics**. v.10, p. 2-26. 2018.
- GOEBEL, K. Estudo de liberação in vitro do Diclofenaco dietilamônio em especialidades farmacêuticas. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 2012.
- GONÇALVES, G. M.; BRIANEZI, G.; MIOT, H. A. O pH dos principais hidratantes e sabonetes líquidos comerciais brasileiros: considerações sobre o reparo da barreira cutânea. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 92, p. 738-40. 2017.
- GUPTA, A.; KHAJURIA, A.; SINGH, J.; SINGH, K.A.; SURI, G. N. Immunological adjuvant effect of *Boswellia serrata* (BOS 2000) on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice. **Int Immunopharmacol**. v. 11, p. 968-975. 2011.
- HARRINGTON, L. E.; HATTON, R. D.; MANGAN, P.R.; TURNER, H.; MURPHY, T. L.; MURPHY, K. M.; WEAVER, C.T. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop

via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**. v. 6, p.1123-1132. 2005.

IMAI, Y.; USUI, T.; MATSUZAKI, T.; YOKOTANI, H.; MIMA, H. The antiscorbutic activity of L-ascorbic acid phosphate given orally and percutaneously in guinea pigs. **Journal of Pharmacology**. v.17, p. 317-24. 1967.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 29, p. 81-96. 2008.

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

JAGDALE, S. C.; KHAWALE, P. S.; KUCHEKAR, B. S.; CHABUKSWAR, A. R. Development and evaluation of pluronic lecithin organogel topical delivery of tapentadol. **American Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**. v. 2, p.1-21. 2015.

JEONG, B.; KIM, S. W.; BAE, Y.H.; Themosensitive sol-gel reversible. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 54, p. 37-51. 2002.

JIN, W. & DONG, C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation emerg microbes infect. **Emerging Microbes & Infections**. v. 2, p. 52- 60. 2013.

JUNIOR, D. M.; ARAUJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário – Parte II. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 50, p. 552-580. 2010.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C.P.; KUIJTEN, G.A.; KEEHNER, R.M.; PALS, S.T.; VAN OERS, M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **American Society of Hematology**. v. 84, p.1415-1420. 1994.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 46, p. 199-206. 2006.

KHURMA, J. R.; ROHINDRA, D. R.; NAND, A. V. Synthesis and Properties of Hydrogels Based on Chitosan and Poly (Vinyl Alcohol) Crosslinked by Genipin. **Journal of Macromolecular Science**. v. 43, p. 749-758. 2006.

LAHOUD, M. H. & CAMPOS, R. Aspectos Teóricos Relacionados a Reologia Farmacêutica. **Visão Acadêmica**. v. 11, p. 65-73. 2010.

LIPMAN, A. G.; BEAULIEU, P.; LUSSIER, D.; PORRECA, F.; DICKINSON, A. H. Farmacologia da dor. **Journal of Pain and Palliative Care Pharmacotherapy**. v. 24 p. 179. 2010.

LOPES, A. C.; MORAES, A.; OLIVEIRA, A. F. R.; GUIMARÃES, B. P.; OLIVEIRA, C. F.; BETIM, F. C. M.; MARTINEZ, A. L.; BOBEK, V. B. Análise Físico-química Comparativa De Sabonetes Líquidos. **Visão Acadêmica**. v.19, p. 84-89. 2018.

LOPES, C. M. I.; BARARELLA-EVÊNCIO, L.; SOUZA, I. A.; OLIVEIRA, E.; SÁ, J.G.A.; SANTANA, M.A.N.; MARCELINO NETO, P.P.; SANTANA, E.S.; SILVA, L.A.; VIEIRA, J. R. C.; Evaluation of cytotoxicity and wound healing activity of *Avcennia schaueriana* in cream. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 91, p. 20280171-13. 2019.

LOURENÇO, A. R. N. Administração Tópica de Fármacos - das Restrições aos Desafios. 2013. 51 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas), **Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**, Lisboa, 2013.

MAIA, A. M.; ROBLES, M. V.; DE PAOLA, V.; RIBEIRO, M. E.; CONSIGLIERI, V. O. Ação das vitaminas antioxidantes em cosméticos. **Revista Racine**. v. 65, p. 52-60. 2001.

MAIA, M. A. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade das formulações cosméticas contendo ácido ascórbico. 2002. 129 f. Dissertação (Pós-Graduação em Fármaco e

Medicamentos), **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2002.

MANGINO, M.; ROEDERER, M.; BEDDALL, M. H.; NESTLE, F. O.; SPECTOR, T. D. Innate and adaptive immune traits are differentially affected by genetic and environmental factors. **Nature Communications**. v. 8, p. 1-6. 2017.

MAMEDE, A. C.; PIRES, A. S.; ABRANTES, A. M.; TAVARES, S. D.; GONÇALVES, A. C.; CASALTA-LOPES, J. E.; SARMENTO-RIBEIRO, A. B.; MAIA, J. M.; BOTELHO, M. F. Cytotoxicity of ascorbic acid in a human colorectal adenocarcinoma cell line (WiDr): in vitro and in vivo studies. **Nutrition and Cancer**. v. 64, p. 1049-1057. 2012.

MARTINS, R. M.; CORTEZ, L. E. R.; FELIPE, D. F. Desenvolvimento de Formulações de Uso Tópico empregando o Óleo Essencial extraído do Cravo-da-Índia. **Revista Saúde e Pesquisa**. v. 1, p. 259-63. 2008.

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

MATA, V.E.; PORTO, F.; FIRMINO, F. Tempo e custo do procedimento: curativo em úlcera vasculogênica. **Revista de Pesquisa: Cuidado Fundamental Online**. v. 2, p. 94-97. 2010.

MATA, A. M. O. F.; CARVALHO, R. M.; ALENCAR, M. V. O. B.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; SILVA, B. B. Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 62, p. 680-686. 2016.

MEDEIROS, A. C. & FILHO, A. M. D. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal Surg of and Clinical Research**. v. 7, p. 87-102. 2016.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. JR. Innate immunity. *New England Journal of Medicine*. v. 3, p.338-344. 2000.

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

MELO, E. M. & FERNANDES, V. S. Avaliação do Conhecimento do Enfermeiro acerca das Coberturas de Última Geração. **Brazilian Journal of Enterostomal Therapy**. V. 9, p.12-20. 2011.

MENEZES, N.L. Rhizophores in *Rhizophora mangle* L.: an alternative interpretation of so-called “aerial roots”. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 213-226. 2006.

MIURA, D. Y. Desenvolvimento farmacotécnico e estudo de estabilidade de géis de papaína destinados ao tratamento de feridas. 2012. 120 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos Para Saúde), **Universidade Federal Fluminense**, Niterói, 2012.

MOHSIN, J. & SHAIKH, J. R. H. Preparation and evaluation of herbal gel formulation. **Journal of Pharmaceutical Research & Education**. v. 1, p. 201-224. 2017.

NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; LEITE, A. K. R. M.; FARIAS, V. M.; BRAGA, L. T.; LOPES, C. A. P. Atividade Imunomoduladora das Plantas Mediciniais: Perspectivas em Medicina Veterinária. **Ciência Animal**. v. 13, p. 23-32. 2003.

NUNES, G. S.; SPEZIALI, E.; CARVALHO, A. T.; AVELAR, D. M. V.; AVELAR, M. V.; AVELAR, R. S.; SOARES, T. F.; SILVA, M. L.; MAGALHÃES, V. P.; CHAVES, D. G.; MELO, G. E. B.; CARDOSO, G. M.; SOARES, E. B.; SANTOS, S. M. E.; TEIXEIRA, R.; QUEIROZ, D. M.; OLIVEIRA, R. C.; FARIA, A. M. C.; FILHO, O. A. M. Lifewide profile of cytokine production by innate and adaptive immune cells from Brazilian individuals. **Immunity & Ageing**. v. 14, p. 1-14. 2017.

OFORI-KWAKYE, K.; KWAPONG, A. A.; BAYOR, M. T. Wound healing potential of methanol extract of *Spathodea campanulata* stem bark formulated into a topical preparation. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines**. v. 8, p. 218-23. 2011.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 61, p. 255-265. 2011.

OLIVEIRA, J. A. V. Aplicação da *Rhizophora mangle* associada ao biopolímero de betaglucana em retalhos cutâneos isquêmicos em ratos. 2018. 91 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências da Saúde), **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2018.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**. v. 375. p. 1777-1789. 2001.

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

PEREIRA, G. G.; DIMER, A. F.; GUTERRES, S. S.; KECHINSKI, P.C.; GRANADA, E. J.; CARDOZO, M. S. N.; Formulation and characterization of poloxamer 407: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. **Química Nova**. v. 36, p. 1121-1125. 2013.

PERREIRA, R. J. & CARDOSO, M. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, p. 146-152. 2012.

PESSOA, M. F. A. A administração sistêmica e tópica de vitaminas antioxidantes acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos. 2014. 44 f. Tese (Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual), **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2014.

PRIANTE, G.; BORDIN, L.; MUSACCHIO, E.; CLARI, G.; BAGGIO, B. Fatty acids and cytokine mRNA expression in human osteoblastic cells: a specific effect of arachidonic acid. **Clinical Science**. v. 102, p. 403-409. 2002.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J. S. Tecnologia Farmacêutica. 6a ed. Lisboa: **Fundação Calouste Gulbenkian**, v 2, 2008.

REGALADO, A. I.; SÁNCHEZ, L. M.; MANCERO, B. *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapêutico. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**. v. 4, p. 1-17. 2016.

RISCUTA, G. Nutrigenomics at the interface of aging, lifespan, and cancer prevention. **The journal of nutrition** v. 146, p. 1931-1939. 2016.

RIVERO, V. K. F.; FIGUEREDO, A. D.; PACHECO, C.H.; NUEVO, A.T. Eficacia de la crema de *Rhizophora mangle* L al 50% en el tratamiento local de las quemaduras dérmicas AB. **Multimed**. v. 19, p. 59-72. 2015.

ROGER, D. M. S.; PERDOMO, Y. R.; BUENO, T. P.; ALEMÁN, Y. R.; LACARRERE, I. G. M. Estabilidad acelerada de un gel de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo) para heridas y quemaduras. **Revista Cubana de Farmacia**. v. 45, p. 563-574. 2011.

SANTOS, A. C. F.; KALSCHNE, D. L.; VIEGAS, M. C.; VANINI, L. S.; BENASSI, M. T.; LONNI, A. A. S. G. Desenvolvimento de uma Formulação Cosmecêutica para Região dos Olhos com Extrato Padronizado de Café Verde. **Visão Acadêmica**. v.18, p. 18-34. 2017.

SANTOS, D. K. D. N.; ALMEIDA, V. S.; ARAUJO, D. R. C.; HARAND, W.; SOARES, A. K. A.; MOREIRA, L. R.; LORENA, V. M. B.; MAGALHAES, L. P. M.; XIMENES, R. M.; SENA, K. X. F. R.; MELO, C. M. L.; NAPOLEAO, T. H.; LIMA, C. S. A.; YARA, R.; VIEIRA, J. R. C. Evaluation of cytotoxic, immunomodulatory and antibacterial activities of aqueous extract from leaves of *Conocarpus erectus* Linnaeus (Combretaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 70, p. 1092-1101. 2018.

SARROUH, B. F.; RIVALDI, J. D.; GAMBARATO BC, DOS SANTOS DT, DA SILVA SS. Importância das citoquinas no sistema imunológico - Parte I: propriedades e características funcionais. **Revista Analytica**. v. 32, p. 42-48. 2008.

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

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRON, G. Status of mangrove research in Latin America and the Caribbean. **Boletim do Instituto de Oceanografia**. v. 38, p. 93-97. 1990.

SHAPIRO, S. & SALIOU, C. Role of vitamins in skin care. **Nutrição**. v. 17, p. 839-44. 2001.

SILVA, M. M. P.; AGUIAR, M. I. F.; RODRIGUES, A. B.; MIRANDA, M. D. C.; ARAÚJO, M. A. M.; ROLIM, I. L. T. P.; SOUZA, A. M. A. The use of nanoparticles in wound treatment: a systematic review. **Revista Escola de Enfermagem da USP**. v. 51, p. 03-272. 2017.

SMANIOTTO, P. H. S.; CASTRO, F. M.; CESAR, I.; RAFAEL, G. Sistematização de Curativos para o tratamento clínico das feridas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. v. 27, p. 623-626. 2012.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2008.

SOUZA, C. C.; PINTO, G. I.; KERPPERS, I. I.; PAULA, D. Desenvolvimento e Caracterização de Formulação Tópica de Extrato de *Uvarana* Para Tratamento de Feridas. **Electronic Journal of Pharmacy**. v. 13, p. 191-200, 2016.

SOUZA, T. A. D. Hidrogel de Quitosana em Diferentes Graus de Desacetilação na Cicatrização de Feridas Cutâneas de Ratas Diabéticas. 2016. 97 f. Tese (Pós-Graduação em Ciência Animal), **Universidade Federal de Goiás**, Goiânia, 2016.

SUTHERLAND, I. A. A Sticky business. Microbialpolysaccharides: current products and future trends. **Microbiology Today**. v. 29, p. 70-71.2002.

VENDRUSCOLO, P. D. O. C. T.; BORGES, C. D.; MICHEL, R. C.; LOMBA, R. T. Avaliação Comparativa das Propriedades de Xantanas Produzidas pelo Patovar Pruni e Clairana com Xantana Comercial para Predição de Uso. **Polímeros**. v. 23, p. 417-424. 2013.

WENDEL, G. H.; TEVES, M. R.; PAREDES, J. D.; SANCHEZ PERERA, L. M.; PELZER, L. E.; Evaluation of the Antidiarrheal Activity of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 32, p.128-31. 2013.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941-2953. 2008.

WYKES, M. N.; STEPHENS, R.; COCKBURN, I. A. Adaptive Immunity to Plasmodium Blood Stages. **Springer International Publishing Switzerland**. v. 1, p. 47-66. 2017.

XU, L.; XU, G.; LIU, T.; CHEN, Y.; GONG, H. The comparison of rheological properties of aqueous welan gum and xanthan gum solutions. **Carbohydrate Polymers**. v.92, p.516-522. 2013.

YOKOYAMA, W. M. Betting on NKT and NK cells. **Immunity**. v. 20, p. 363-365. 2004.

ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -CCB
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA



PARECER

Este parecer trata do Processo CEUA 0048-2016 submetido online pela Professora Cristiane Moutinho Lagos de Melo à Comissão de Ética no Uso de Animais para avaliação do uso de *Mus musculus* no projeto de pesquisa intitulado "INVESTIGAÇÃO IMUNOLÓGICA E ANTITUMORAL DE COMPOSTOS NATURAIS EXTRAÍDOS DE PLANTAS". Além do projeto foi anexado o **FORMULÁRIO UNIFICADO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM ENSINO E/OU PESQUISA**. O projeto de pesquisa tem relevante importância acerca da necessidade de pesquisas que visem elucidar mecanismos de ação envolvidos com a resolução de patologias como o câncer.

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, os objetivos, os aspectos legais e o bem-estar animal, consideramos a solicitação de pesquisa científica **COM PENDÊNCIAS**. Abaixo, seguem as especificações:

- Falta a carta de apresentação com assinatura da responsável pelo projeto e respectivo chefe de departamento;
- Assinalar o item 9.6 como Grau de Invasividade 1.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/01/2017 - 04/01/2019
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> – Linhagem Swiss e Ballb/c
Nº de animais	32
Peso/Idade	25 - 40 gramas / 60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do Departamento de Antibióticos

Recife, 13 de dezembro de 2016.

ANEXO B- AUTORIZAÇÃO DE COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

CA DRFB N° 120/2014

24 de outubro de 2014.

Ao Senhor

JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

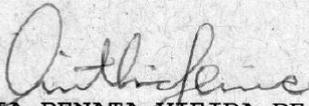
Prezado Senhor,

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

Atenciosamente,


CINTHIA RENATA VIEIRA DE LIMA

Diretoria de Recursos Florestais e Biodiversidade