



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ALEXANDRA DÉBORA LEITE BORBA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E
CICATRIZANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Terminalia
catappa* L. (COMBRETACEAE)**

Recife
2021

ALEXANDRA DÉBORA LEITE BORBA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E
CICATRIZANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Terminalia*
catappa L. (COMBRETACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

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

Recife
2021

Catalogação na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Borba, Alexandra Débora Leite

Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e cicatrizante do extrato hidroalcóolico das folhas de *Terminalia catappa L.* (Combretaceae) / Alexandra Débora Leite Borba. - 2021.

106 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. Plantas Medicinais. 2. Toxicologia. 3. Agentes anti-infecciosos. I. Silva, Teresinha Gonçalves (orientadora). II. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-252

ALEXANDRA DÉBORA LEITE BORBA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E
CICATRIZANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Terminalia
catappa* L. (COMBRETACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Aprovada em: 04/08/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Márcia Silva Nascimento (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua constante presença ao meu lado, sempre me protegendo, guiando e me dando forças para vencer os obstáculos da vida.

À minha família que, por muitas vezes entendeu a minha ausência e sempre incentivou o meu crescimento pessoal e profissional, especialmente minha mãe Denise, minhas irmãs Délia e Deise, minhas tias Rosângela (*"in memoriam"*), Jozélia, Sandra, Lúcia e minha avó Zélia.

Ao meu namorado Wendell por todo apoio e conforto necessários e ajuda na coleta do material vegetal.

À minha orientadora Profa Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva, pela introdução e ensinamentos no mundo científico e por ter me permitido desenvolver boa parte dos meus experimentos no Laboratório de Bioprospecção Farmacotoxicológica de Produtos Naturais - BIOFARMATOX. Obrigada pelo carinho e confiança!

À Profa Dr^a Márcia Nascimento, pela parceria que foi fundamental para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Profa Dr^a Maria Carolina Accioly, pelas oportunas contribuições a este estudo, na participação da banca de qualificação.

Às Professoras examinadoras Dr^a Márcia Nascimento e Dr^a Cynthia Almeida, e às suplentes Dr^a Karina Randau e Dr^a Jéssica Barbosa, por terem aceitado o convite para participar da minha defesa e pela avaliação do meu trabalho.

Aos colegas Bruno Veras do Departamento de Bioquímica, Raudiney Mendes do Laboratório de Etnofarmacologia Aplicada e Kayque Almeida do Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, que sem nenhuma obrigação, se dispuseram a me auxiliar, tornando possível a execução de partes indispensáveis a esse trabalho. Serei eternamente grata!

À equipe do BIOFARMATOX, em especial, Carol, Michelly e Pedro. Obrigada pela ajuda durante os experimentos, na discussão dos protocolos e, até mesmo, no desabafo nos momentos de estresse.

Ao meu coorientador da iniciação científica, Marlton Santana, pelos ensinamentos que tanto me ajudaram durante o mestrado e pela contribuição em alguns resultados importantes para finalização deste trabalho.

A Paulo Germano, secretário do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT), pela cordialidade e atenção.

Aos veterinários, José de Castro, do Biotério de Antibióticos e Raquel, do Biotério de Farmácia, pela disponibilidade sempre que solicitados.

À técnica Silvânia, pelo processamento histológico das amostras no final do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos de mestrado.

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao PPGIT, pela oportunidade de ter realizado o meu mestrado.

A todos que, por quaisquer meios, mínima ou maximamente, participaram do desenvolvimento desta dissertação.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A espécie *Terminalia catappa* L. (Combretaceae), popularmente conhecida como castanhola ou amendoeira, é utilizada pelas comunidades tradicionais para o tratamento de inflamações, infecções e diabetes. Neste contexto, o objetivo do estudo foi analisar o perfil fitoquímico e avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana e cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* (EHTc). O perfil fitoquímico do extrato foi analisado por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) e os compostos foram identificados por cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas (UPLC-DAD-QTOF MS), sendo também quantificados os teores de fenóis totais, taninos totais e flavonoides. A capacidade antioxidante foi avaliada pelos testes do DPPH, ABTS e fosfomolibdênio. A citotoxicidade foi testada frente às linhagens de hemácias, fibroblastos, macrófagos e queratinócitos, enquanto a atividade antimicrobiana foi determinada pelos testes de microdiluição em caldo e por inibição e remoção de biofilmes. Para a avaliação da atividade cicatrizante *in vivo*, foram preparados os hidrogéis de EHTc 5% e 10% que foram caracterizados e testados em modelo de excisão por um período de 3, 7 e 14 dias. As classes de metabólitos secundários encontrados foram os taninos hidrolisáveis, alcaloides, flavonoides, triterpenos e esteroides, confirmados através da análise em UPLC-DAD-QTOF MS. O EHTc apresentou teores de fenóis totais (3,79 g EAG/g), taninos totais (2,16 g EAT/g) e flavonoides (2,34 g EQ/g), bem como atividade antioxidante nos diferentes métodos analisados. O EHTc não foi capaz de induzir hemólise e não apresentou toxicidade frente às células L929 e macrófagos peritoneais murinos nas concentrações testadas, enquanto que para HaCat apresentou $Cl_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$, demonstrando baixa citotoxicidade. No ensaio de microdiluição em caldo, o EHTc apresentou inibição moderada frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, e para o fungo *Candida albicans*. Os biofilmes de *Candida* spp. apresentaram atividade metabólica reduzida quando em contato com o EHTc em concentrações iguais ou superiores a 124 $\mu\text{g/mL}$, sendo mais eficaz na inibição da formação dos biofilmes de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Os hidrogéis desenvolvidos apresentaram os parâmetros apropriados para formulações tópicas. No modelo de cicatrização *in vivo*, os animais tratados com o EHTc 5% apresentaram grau de contração significativo no

período de 7 dias com um percentual de 84,81% de contração da lesão, comparado ao controle de 72,07%. Após 14 dias, o grau de contração foi significativo para o EHTc 5% e EHTc 10% com um percentual de 91,83% e 90,13% de contração da lesão, respectivamente, comparado ao controle de 82,39%. Nas análises histopatológicas, o grupo tratado com o EHTc 5% promoveu melhor reepitelização tecidual com restauração do tecido conjuntivo e rearranjo das fibras de colágeno. Desta forma, o estudo mostrou que o EHTc apresenta propriedades antioxidante, antimicrobiana e cicatrizante, com baixa citotoxicidade, sugerindo que estas propriedades podem estar associadas à presença dos compostos fenólicos.

Palavras-chave: Fenólicos. Radicais livres. Infecções. Feridas cutâneas.

ABSTRACT

The species *Terminalia catappa* L. (Combretaceae), popularly known as castanet or almond tree, is used by traditional communities to treat inflammation, diseases, and diabetes. In this context, the study aimed to analyze the phytochemical profile and evaluate the antioxidant, antimicrobial and healing activities of the hydroalcoholic extract of *Terminalia catappa* leaves (EHTc). The phytochemical profile of the extract was analyzed by thin-layer chromatography (TLC) and the compounds were identified by ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-DAD-QTOF MS), and the total phenol, tannins, and flavonoids contents were also quantified. Antioxidant capacity was evaluated by DPPH, ABTS, and phosphomolybdenum tests. Cytotoxicity was tested against red blood cells, fibroblasts, macrophages and keratinocytes, while antimicrobial activity was determined by microdilution tests in broth and by inhibition and removal of biofilms. For the evaluation *in vivo* healing activity, 5% and 10% EHTc hydrogels were prepared, which were characterized and tested in an excision model for a period of 3, 7 and 14 days. The classes of secondary metabolites found were hydrolyzable tannins, alkaloids, flavonoids, triterpenes and steroids, confirmed by analysis in UPLC-DAD-QTOF MS. The EHTc presented contents of total phenols (3.79 g EAG/g), total tannins (2.16 g EAT/g) and flavonoids (2.34 g EQ/g), as well as antioxidant activity in the different methods analyzed. The EHTc was not able to induce hemolysis and did not show toxicity against L929 cells and murine peritoneal macrophages at the concentrations tested, while for HaCat it presented $IC_{50} > 50$ μ g/mL, demonstrating low cytotoxicity. In the broth microdilution assay, EHTc showed moderate inhibition against the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumonia* and *Proteus mirabilis*, and against the fungus *Candida albicans*. *Candida* spp. biofilms showed reduced metabolic activity when in contact with EHTc at concentrations equal to or greater than 124 μ g/mL, being more effective in inhibiting the formation of *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* biofilms. The developed hydrogels had the appropriate parameters for topical formulations. In the *in vivo* healing model, animals treated with 5% EHTc presented a significant degree of contraction within 7 days with a percentage of 84.81% of injury contraction, compared to the control of 72.07%. After 14 days, the degree of contraction was significant for 5% EHTc and 10% EHTc with a percentage

of 91.83% and 90.13% of injury contraction, respectively, compared to the control of 82.39%. In the histopathological analyses, the group treated with 5% EHTc promoted better tissue re-epithelialization with the restoration of connective tissue and rearrangement of collagen fibers. Thus, the study showed that EHTc has antioxidant, antimicrobial and healing properties, with low cytotoxicity, suggesting that these properties may be associated with the presence of phenolic compounds.

Keywords: Phenolics. Free radicals. Infections. Skin wounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- A árvore <i>Terminalia catappa</i> Linn (A), suas folhas (B), flores (C) e frutos (D).....	25
Figura 2- Desenho esquemático das estruturas da pele.....	27
Figura 3- Fases do processo de cicatrização em lesões cutâneas.....	32
Figura 4- Representação da formação de biofilme.....	38
Figura 5- Exsicata da <i>Terminalia catappa</i>	42
Figura 6- Cromatograma UPLC-DAD/MS do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i>	57
Figura 7- Estrutura básica dos taninos hidrolisáveis.....	61
Figura 8- Estrutura básica dos flavonoides.....	63
Figura 9- Estrutura dos núcleos A, B e C, respectivamente.....	63
Figura 10- Avaliação citotóxica do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i> frente às linhagens L929, macrófagos peritoniais murinos e HaCat após 72 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT.....	70
Figura 11- Aspectos macroscópicos das lesões cutâneas antes do tratamento e após o tratamento com hidrogel-base (controle), EHTc 5%, EHTc 10% e Dersani® durante um período de 3, 7 e 14 dias.....	76
Figura 12- Efeito cicatrizante das formulações semi-sólidas contendo o extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i> (EHTc) nas concentrações de 5 e 10% sobre lesões cutâneas em ratos Wistar (n=5 animais/grupo).....	78
Figura 13- Fotomicrografias dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional após 3 dias de tratamento (aumento de 40 X).....	81
Figura 14- Fotomicrografias dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional após 7 dias de tratamento (aumento de 40 X).....	82
Figura 15- Fotomicrografias dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional após 14 dias de tratamento (aumento de 40 X).....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fase móvel com os padrões e reveladores específicos para as classes de metabólitos secundários utilizados na CCD do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i> (EHTc).....	44
Tabela 2- Relação das massas e rendimento do extrato de <i>Terminalia catappa</i>	55
Tabela 3- Classes de metabólitos secundários encontrados no EHTc.	56
Tabela 4- Dados de espectrometria de massa dos principais constituintes identificados no extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i>	57
Tabela 5- Doseamento de fenóis totais, taninos totais e flavonoides do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i>	65
Tabela 6- Atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i> pelos métodos DPPH, ABTS e AAT.	66
Tabela 7- Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i>	72
Tabela 8- Efeito antimicrobiano do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i> na inibição da formação dos biofilmes de <i>Candida</i> spp.....	73
Tabela 9- Efeito antimicrobiano do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i> na remoção de biofilmes pré-formados de <i>Candida</i> spp.	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Fórmula para preparação de 100g do hidrogel-base.....	52
Quadro 2- Parâmetros organolépticos, pH e viscosidade das formulações desenvolvidas.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT: Atividade antioxidante total

AAPH: 2,2-azobis amidinopropano

ABTS: 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico

AG: Ácido gálico

ANOVA: Análise de variância

AT: Ácido tânico

bFGF: Fator de crescimento fibroblástico básico

CaCl₂: Cloreto de cálcio

CAT: Catalase

CCD: Cromatografia em camada delgada

CI₅₀: Concentração inibitória média

CH₅₀: Concentração que causa 50% de hemólise

CLSI: Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

CMB: Concentração mínima bactericida

CMI: Concentração mínima inibitória

CO₂: Dióxido de carbono

COX-2: Ciclooxygenase tipo 2

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilidrazina

EHTc: Extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa*

EPS: Exopolissacarídeo

ESI: Ionização por electrospray

GSH: Glutatona reduzida

HE: Hematoxilina-eosina

IL-1: Interleucina tipo 1

IL-6: Interleucina tipo 6

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada

KGF-1: Fator de crescimento dos queratinócitos tipo 1

KGF-2: Fator de crescimento dos queratinócitos tipo 2

MEP: Metileritritol fosfato

MPO: Mieloperoxidase

MS: Espectrometria de Massas

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

NaCl: Cloreto de sódio

NO: Óxido nítrico

OMS: Organização Mundial de Saúde

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

pH: Potencial hidrogeniônico

Q: Quercetina

SOD: Superóxido dismutase

TGF- β : Fator transformador de crescimento tipo beta

TNF- α : Fator de necrose tumoral tipo alfa

UFC: Unidades formadoras de colônias

UFPEDA: Departamento de Antibióticos da UFPE

UPLC: Cromatografia Líquida de Ultra Performance

URM: Coleção de Culturas da Micoteca

UV: Ultravioleta

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 OBJETIVOS	21
1.1.1 Objetivo geral	21
1.1.2 Objetivos específicos	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	22
2.2 FAMÍLIA COMBRETACEAE	23
2.3 <i>Terminalia catappa</i> Linn.....	24
2.3.1 Características gerais da planta	24
2.3.2 Utilização na medicina popular.....	25
2.3.3 Composição química e propriedades farmacológicas	25
2.4 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DA PELE	27
2.4.1 Epiderme.....	27
2.4.1.1 Queratinócitos	28
2.4.1.2 Melanócitos	29
2.4.1.3 Células de Langerhans	29
2.4.1.4 Células de Merkel	29
2.4.2 Derme	29
2.4.2.1 Fibroblastos.....	30
2.4.2.2 Colágeno.....	30
2.4.3 Hipoderme	30
2.5 FERIDAS CUTÂNEAS	31
2.6 CICATRIZAÇÃO	31
2.6.1 Hemostasia	33
2.6.2 Fase inflamatória.....	33

2.6.3 Fase proliferativa	34
2.6.4 Fase de remodelação.....	35
2.7 TIPOS DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	35
2.8 FATORES QUE INTERFEREM NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	36
2.8.1 Infecção.....	36
2.8.1.1 Formação de biofilmes	37
2.9 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS PARA LESÕES CUTÂNEAS	39
2.9.1 Hidrogéis.....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 MATERIAL	42
3.1.1 Material botânico.....	42
3.1.2 Células.....	42
3.1.3 Microrganismos.....	43
3.1.4 Animais experimentais	43
3.2 MÉTODOS	43
3.2.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i>.43	
3.2.2 Perfil fitoquímico do EHTc.....	44
3.2.2.1 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)	44
3.2.2.2 Análise por UPLC- DAD - QTOF MS.....	45
3.2.3 Quantificação dos fenóis totais, taninos totais e flavonoides no EHTc.46	
3.2.3.1 Determinação do conteúdo de fenóis e taninos totais	46
3.2.3.2 Determinação do conteúdo de flavonoides	46
3.2.4 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do EHTc.....	46
3.2.4.1 Ensaio de eliminação do radical DPPH	46
3.2.4.2 Ensaio de eliminação do radical ABTS.....	47
3.2.4.3 Atividade antioxidante total.....	47
3.2.5 Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> do EHTc.....	48

3.2.5.1 Avaliação da atividade hemolítica	48
3.2.5.2 Avaliação da viabilidade celular	49
3.2.6 Ensaios microbiológicos	49
3.2.6.1 Microdiluição em caldo.....	49
3.2.6.2 Inibição da formação do biofilme	50
3.2.6.3 Remoção do biofilme pré-formado	51
3.2.7 Preparação do hidrogel de <i>Terminalia catappa</i>.....	51
3.2.8 Análise físico-química do hidrogel de <i>Terminalia catappa</i>.....	52
3.2.8.1 Características organolépticas	52
3.2.8.2 Determinação de pH.....	53
3.2.8.3 Determinação da viscosidade	53
3.2.9 Modelo de ferida excisional.....	53
3.2.9.1 Análise macroscópica do fechamento da lesão	54
3.2.9.2 Análise histopatológica.....	54
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 RENDIMENTO DO EHTC	55
4.2 PERFIL FITOQUÍMICO DO EHTC	55
4.2.1 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)	55
4.2.2 Caracterização de compostos por UPLC- DAD- QTOF MS.....	56
4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS, TANINOS TOTAIS E FLAVONOIDES NO EHTC.....	65
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DO EHTC	66
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i> DO EHTC	68
4.5.1 Avaliação da atividade hemolítica	68
4.5.2 Avaliação da viabilidade celular	69
4.6 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	71

4.6.1 Microdiluição em caldo.....	71
4.6.2 Inibição e remoção de biofilme.....	73
4.7 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO HIDROGEL DE <i>Terminalia catappa</i>	75
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EHTC SOBRE LESÕES CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR	76
4.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	80
5 CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS	87
ANEXO A - OFÍCIO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA.....	106

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas na cura dos mais diversos males é uma prática utilizada há muitos anos pela humanidade. No Brasil, encontra-se a maior biodiversidade do mundo, com uma rica flora, a qual desperta interesse das comunidades científicas para estudo, conservação e utilização racional destes recursos (MENDONÇA *et al.*, 1998). As plantas medicinais são fontes de compostos biologicamente ativos para a síntese e o desenvolvimento de agentes farmacológicos eficazes, de baixo custo operacional e, sobretudo, com menor taxa de efeitos tóxicos, quando comparados a maior parte dos medicamentos convencionais (LORENZI; MATOS, 2008).

A espécie *Terminalia catappa* Linn., pertence à família Combretaceae, sendo conhecida popularmente como castanhola, amendoeira, noz-da-praia, chapéu-de-sol, dentre outras denominações (GILMAN; WATSON, 1994), é originária da Índia e da Malásia e foi difundida pelo mundo em consequência da migração humana, adaptando-se aos países tropicais, principalmente às regiões litorâneas. *T.catappa* apresenta como principais classes de metabólitos secundários, os taninos, flavonoides e triterpenos (MARQUES *et al.*, 2012; TERÇAS *et al.*, 2017), responsáveis por suas propriedades farmacológicas já descritas como anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antiviral e antidiabética (FAN *et al.*, 2004; MININEL *et al.*, 2014). Embora seja uma espécie muito comum no litoral brasileiro, a grande maioria dos estudos que evidenciaram suas variedades de substâncias químicas e farmacologicamente ativas foram realizados com as plantas nativas da Ásia (MAU; KO; CHYAU, 2003; GAO *et al.*, 2004) e da África (BABAYI *et al.*, 2004).

A cicatrização tecidual consiste em um processo biológico complexo, dinâmico e multifatorial que visa restaurar a homeostasia e a integridade do tecido lesionado (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005), podendo ser dividido em quatro fases distintas, denominadas: hemostasia, inflamatória, proliferativa e de remodelação (GREAVES *et al.*, 2013). Complicações durante o processo de reparo tecidual podem influenciar no tempo de cicatrização e ainda interferir na qualidade final da cicatriz (MENON *et al.*, 2012).

A exposição do tecido lesionado favorece um ambiente ideal para o crescimento microbiano (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001). Dentre os microrganismos mais comumente encontrados em feridas estão as bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, os bacilos Gram-negativos

(STEPHENS *et al.*, 2003; DAVIES *et al.*, 2007) e os fungos, sendo a espécie *Candida albicans* de maior prevalência (LIN *et al.*, 2017). Interações microbianas podem levar à cronicidade do processo de reparo tecidual e ainda provocar uma resistência aos antimicrobianos disponíveis (SHAI; MAIBACH, 2005).

Os radicais livres são produzidos em grandes quantidades nos tecidos lesionados e inflamados, como forma de defesa contra patógenos invasores e para sinalização intracelular (D'AUTREAUX; TOLEDANO, 2007). Quando a taxa de produção dos radicais livres ultrapassa a taxa de remoção pelos antioxidantes naturais do sistema de defesa celular, ocorre o chamado estresse oxidativo (SIES, 1985), resultando em danos celulares graves com consequente comprometimento do reparo tecidual (SCHÄFER; WERNER, 2008; REUTER *et al.*, 2010). Substâncias antioxidantes são capazes de reduzir a formação dos radicais livres e, ainda, retardar a degradação das substâncias biológicas (CONDELLI *et al.*, 2015).

A incidência de feridas que evoluem para um estado mais crítico ainda se mantém alta, tendo em vista a interferência dos diversos fatores que comprometem o processo de cicatrização, tornando-se relevante a busca de novas possibilidades terapêuticas. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento do perfil fitoquímico e avaliação das propriedades antioxidante, antimicrobiana e cicatrizante das folhas de *T. catappa*, provenientes do município de Olinda, estado de Pernambuco.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 **Objetivo geral**

Investigar a composição fitoquímica, avaliar a citotoxicidade e as propriedades antioxidante, antimicrobiana e cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa*.

1.1.2 **Objetivos específicos**

- Preparar o extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* (EHTc);
- Caracterizar e identificar os principais constituintes químicos presentes no EHTc por meio de cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de ultra-desempenho acoplada à espectrometria de massas;
- Quantificar os teores de fenóis totais, taninos totais e flavonoides no EHTc;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do EHTc;
- Determinar o potencial hemolítico e a capacidade citotóxica do EHTc;
- Avaliar a propriedade antimicrobiana do EHTc;
- Desenvolver e analisar os parâmetros físico-químicos dos hidrogéis incorporados do EHTc 5% e 10%;
- Investigar o potencial cicatrizante dos hidrogéis sobre lesões cutâneas em ratos Wistar através de parâmetros clínicos e histopatológicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo todo vegetal que contém, em um ou vários de seus órgãos, substâncias com finalidades terapêuticas ou que sejam precursoras de fármacos semissintéticos (PASQUA, 2009). Estima-se que, aproximadamente, 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos de forma direta ou indireta a partir de fontes naturais, sendo 25% provenientes das plantas (BRASIL, 2006).

A utilização milenar de plantas medicinais como fonte de substâncias terapêuticas se deu de forma empírica pela população, porém, com o passar do tempo e com a maior procura por substâncias bioativas, a fim de diminuir os gastos com o desenvolvimento de novos fármacos, a terapêutica vegetal vem ganhando atenção no meio científico e recebendo incentivos da própria OMS, que recomenda o estudo de pesquisas voltadas para área química, farmacológica, toxicológica e clínica das plantas, sendo necessário para conhecê-las quanto a sua eficácia e os possíveis efeitos adversos (CASTRO *et al.*, 2004; GURIB-FAKIM, 2006).

Nesse cenário, o Brasil é o país que apresenta a maior biodiversidade genética do mundo, com cerca de 55 mil espécies de plantas distribuídas nos seus diferentes biomas: Mata Atlântica, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pantanal e Pampa, oferecendo recursos farmacológicos para a solução de muitas doenças (ALBERNAZ *et al.*, 2010). No entanto, muito pouco tem sido realizado para transformar este potencial da flora medicinal em produtos, visando à inserção social e a proteção desses ecossistemas, sendo necessário que se invista em pesquisas voltadas para nossa flora nativa (VILLAS BOAS; GADELHA, 2007; ALMEIDA; SCHEFFER, 2012). Os metabólitos de plantas medicinais são importantes para o desenvolvimento de novas moléculas, pois a natureza é a mais rica fonte de novas entidades químicas.

O metabolismo primário das plantas garante substâncias como ácidos graxos, proteínas, lipídeos e carboidratos, responsáveis pelo seu crescimento. Já o metabolismo secundário pode ser visto como a produção de compostos secundários, entre eles os terpenoides, alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, óleos essenciais e etc., responsáveis pelos efeitos farmacológicos ou toxicológicos das plantas e pela sobrevivência das mesmas, uma vez que estes metabólitos podem

atuar na atração de agentes polinizadores ou representar uma defesa química contra o estresse ambiental e os predadores (MENDES *et al.*, 2018).

A seleção de determinada espécie vegetal para um estudo ocorre por meio de três abordagens: a randômica, na qual a escolha é feita ao acaso; a quimiotaxonômica ou filogenética, em que são considerados a ocorrência de certos metabólitos secundários em um gênero ou espécie; ou ainda por meio da etnofarmacologia, em que há uma busca baseada nas informações cedidas pela comunidade. Na abordagem do tipo randômica, a descoberta de novas substâncias ativas é maior, no entanto, é na abordagem etnofarmacológica que os resultados da busca se mostram mais eficazes. Assim, a avaliação do histórico de uso da planta pela população faz com que tempo e dinheiro sejam economizados na corrida por novos medicamentos (MACIEL *et al.*, 2002).

2.2 FAMÍLIA COMBRETACEAE

A família Combretaceae é composta por aproximadamente 20 gêneros e cerca de 600 espécies, com distribuição pantropical, apresentando maior diversidade na África e na Ásia. No Brasil, ocorrem cinco gêneros nativos (*Buchenavia*, *Combretum*, *Conocarpus*, *Terminalia* e *Thiloa*), com cerca de 70 espécies, e dois gêneros exóticos (*Quisqualis* e *Bucida*) (LINSINGEN; CERVI; GUIMARÃES, 2009; RENDÓN- SANDOVAL; IBARRA- MANRÍQUEZ, 2018).

De acordo com Stace (2004), a família Combretaceae se subdivide em duas subfamílias: *Strephonematoideae*, que não apresenta espécies no Brasil, e *Combretoideae*, com duas tribos, *Combreteae* e *Laguncularieae*, compostas por quatro e doze gêneros, respectivamente, sendo os gêneros *Combretum* e *Terminalia* os de maior predominância.

As plantas que compõe essa família são caracterizadas como árvores ou arbustos, que apresentam folhas alternas simples ou opostas, inteiras, cobertas por tricomas seccionados. Possuem flores pequenas, zigomorfas ou actinomorfas, pentâmeras ou tetrâmeras, receptáculo dividido em duas partes, a inferior envolve o ovário e a superior termina nos lobos do cálice, 4-5 pétalas ou ausentes, 4-5 lobos do cálice, ovário ínfero, unilocular, 2-6 rudimentos seminais pêndulos e ovoides. Os frutos são secos indeiscentes, drupáceos ou betulídios, endocarpo esponjoso ou

lígneo, uma semente, cotilédones plicados ou convolutos e não possui endosperma (LINSINGEN; CERVI; GUIMARÃES, 2009; FERNANDES *et al.*, 2018).

Estudos fitoquímicos realizados com diferentes espécies da família Combretaceae identificaram a presença de inúmeros compostos bioativos, tais como: fenóis, flavonoides, taninos, triterpenoides, cumarinas, fenantrenos, lignanas e cardenolídeos. Esses resultados estão possivelmente ligados às diferentes atividades medicinais que essas espécies possuem (ARAÚJO *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2018).

Membros da família Combretaceae apresentam diversas propriedades farmacológicas comprovadas pelo uso dos seus extratos ou de suas substâncias isoladas, tais como antibacteriana, antiasmática, anticâncer, antiviral, antiparasitária, antidiabética, antimutagênica, antioxidante, antiúlcera, antinociceptiva e de cicatrização de feridas (MONGALO *et al.*, 2016; BASHEER; FARUK, 2018).

2.3 *Terminalia catappa* Linn

2.3.1 Características gerais da planta

A espécie *Terminalia catappa* L., pertencente à família Combretaceae, é nativa de regiões da costa do Oceano Índico e das regiões que compreendem as ilhas a oeste do Oceano Pacífico, como a Malásia, Indonésia e ilhas da região da Melanésia. Esta espécie foi introduzida no Brasil pelos portugueses no período de colonização do país e se adaptou às condições climáticas por serem resistentes ao calor, frio, escassez de água, ventos fortes e salinidade (ANGEL *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2010). *T. catappa* encontra-se largamente distribuída pelas regiões litorâneas, tropicais e subtropicais, principalmente pelas áreas costeiras, sendo utilizada para arborização urbana, ornamentação de ruas e avenidas, para fins medicinais, produção de madeira, reflorestamento e recuperação de áreas degradadas (MENESES *et al.*, 2003).

Terminalia catappa é conhecida popularmente como castanhola, chapéu-de-sol, castanheira, amêndoia-da-praia, sete copas, amendoeira, guarda-chuva e noz-da-praia. Apresenta-se na natureza como uma árvore de grande porte, podendo atingir até 40 metros de altura (THOMSON; EVANS, 2006), de tronco alto, áspero e tortuoso, e com os galhos dispostos horizontalmente ao longo do tronco principal,

dando a impressão de camadas. Favorece o sombreamento das ruas, por apresentar uma copa ampla com folhas grandes e coriáceas agrupadas nas extremidades dos ramos, cuja coloração depende da idade podendo variar do verde intenso ao vermelho rubro. Suas flores são pequenas, pouco vistosas e de coloração branco-amarelada (Figura 1), seus frutos apresentam alto valor nutricional e as sementes são ricas em óleo (TEIXEIRA, 2010).

Figura 1- A árvore *Terminalia catappa* Linn (A), suas folhas (B), flores (C) e frutos (D).



Fonte: https://ast.wikipedia.org/wiki/Terminalia_catappa e <http://floraufersa.blogspot.com.br/2014/02/castanhola.html>

2.3.2 Utilização na medicina popular

No Brasil, as folhas, frutos e raízes da espécie *T. catappa* são utilizadas como medicamento pela população para tratamento de problemas respiratórios, diabetes, inflamação, diarréias, ejaculação precoce, problemas nos rins, cólicas intestinais, verminoses, disenterias, dores na coluna e para redução de peso (MONVISES *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012). Na Índia, Filipinas, Malásia e Indonésia, as folhas, cascas e frutos são usados comumente para dermatites, febre, diarréias, hepatites, diabetes e na prevenção de hepatoma (NAGAPPA *et al.*, 2003; GAO *et al.*, 2004). Em Taiwan, as folhas são usadas para prevenção e tratamento de hepatites e doenças do fígado (CHYAU; KO; MAU, 2006). Já a população caribenha utiliza a espécie para tratamento de gastrite e infecção urinária (GERMOSÉN-ROBINEAU, 2014).

2.3.3 Composição química e propriedades farmacológicas

Estudos fitoquímicos utilizando diferentes extratos e frações das folhas de *T. catappa* relataram a presença de compostos fenólicos, majoritariamente os taninos hidrolisáveis como a punicalina, punicalagina, geranina, tergalagina, ácido chebulágico, terflavinas A e B, corilagina, ácido gálico e elágico (ANGEL *et al.*, 2003; KINOSHITA *et al.*, 2007); flavonoides como a isovitexina, vitexina e rutina; e ácidos triterpênicos, como o ácido ursólico. Além destes, outros compostos também foram isolados e caracterizados, como os ácidos benzóicos, cumarinas e seus derivados (FAN *et al.*, 2004; CHYAU; KO; MAU, 2006).

Estudos farmacológicos utilizando as folhas, frutos e cascas da planta, comprovaram as atividades antioxidante (KINOSHITA *et al.*, 2007; SAROJA; ANNAPOORANI, 2012), anticâncer (KOTRESHA *et al.*, 2012; NAITIK *et al.*, 2012), antidiabética (NAGAPPA *et al.*, 2003; PATEL *et al.*, 2012), analgésica (DHARMASIRI; RATNASOORIYA; THABREU, 2003), antifúngica (TERÇAS *et al.*, 2017), antibacteriana (OPARA *et al.*, 2012), antiviral (TANAKA; NONAKA; NISHIOKA, 1986), antiparasitária (MUDI; MUHAMMAD, 2011), antinociceptiva (RATNASOORIYA *et al.*, 2002), hepatoprotetora e anti-inflamatória (MOHALE *et al.*, 2009).

A atividade antioxidante da espécie pode ser associada aos taninos hidrolisáveis, onde a punicalina e a punicalagina se destacam como os compostos mais abundantes associados à essa propriedade farmacológica; também pode estar relacionada aos flavonoides, ácidos cumáricos e terpenos, e por isso se tornam importantes na prevenção e terapia de doenças, como câncer, doenças degenerativas e inflamatórias (CHYAU; KO; MAU, 2006). Os ácidos triterpênicos também são associados à atividade anti-inflamatória, principalmente o ácido ursólico (FAN *et al.*, 2004). Os alcaloides estão envolvidos na inibição da ejaculação precoce (RATNASOORIYA *et al.*, 2002).

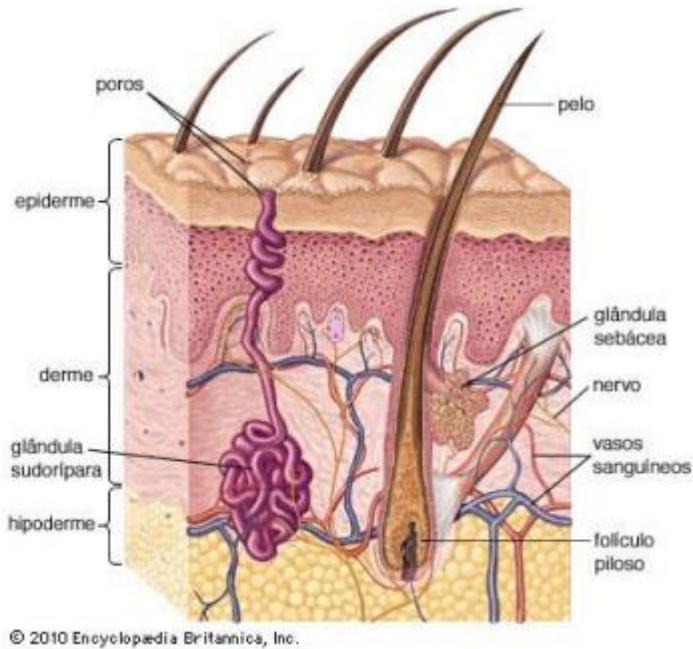
A punicalagina e punicalina isoladas de *T. catappa* são largamente utilizadas na medicina por causa de suas propriedades adstringentes. Elas reagem com as proteínas da pele, precipitando-as e formando uma película que a protege da contaminação externa, evita perda de fluidos, reestrutura o epitélio e forma novos vasos, podendo ser empregadas no tratamento de lesões cutâneas (VASCONCELOS *et al.*, 2008). Com base nestes princípios, foram realizadas investigações mais detalhadas com relação à composição química e às propriedades antioxidante, antimicrobiana e cicatrizante desta planta.

2.4 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, e juntamente com seus apêndices (pêlos, glândulas sudoríparas e sebáceas), é responsável por funções essenciais para a homeostasia do corpo, incluindo proteção contra agentes externos, manutenção do equilíbrio hídrico, regulação da temperatura corpórea, percepção sensorial, excreção de sais e síntese de vitaminas (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

No que se refere à anatomia, a pele pode ser dividida em três camadas: a epiderme, que é a camada mais superficial da pele e não apresenta vasos, recebendo sua nutrição a partir dos vasos sanguíneos adjacentes na derme; a derme é a camada intermediária da pele, composta por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e colágeno; e a hipoderme é composta por tecido adiposo, glândulas e terminações nervosas, e também é vascularizada (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), como está apresentado na Figura 2.

Figura 2- Desenho esquemático das estruturas da pele.



Fonte: <http://escola.britannica.com.br/assembly/135568/A-pele-humana-tem-tres-camadas-a-epiderme-a-derme>.

2.4.1 Epiderme

A epiderme é formada por um epitélio escamoso estratificado e queratinizado, que é separado da derme por uma membrana basal. Ela é composta principalmente por quatro tipos celulares: queratinócitos (responsáveis pela renovação epidérmica e proteção), melanócitos (responsáveis pela pigmentação da pele e produção da melanina), células de Langerhans (responsáveis por captar os sinais抗igenicos e enviar as informações para o sistema imunológico) e células de Merkel (síntese de catecolaminas e sensibilidade tátil) (KENDALL; NICOLAOU, 2013).

2.4.1.1 Queratinócitos

Os queratinócitos são as células mais numerosas que compõe a epiderme. De acordo com o grau de queratinização, a epiderme pode ser dividida em cinco camadas que representam os diferentes estágios de maturação dos queratinócitos, sendo elas a camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e camada córnea (STANDRING, 2008).

A camada basal ou estrato basal é a primeira camada da epiderme localizada em contato com a derme, formada por uma única camada de células com formato cúbico. A camada espinhosa ou estrato espinhoso encontra-se acima da camada basal e contém várias camadas de células com formato poligonal, além de apresentar um maior número de queratina, sendo mais espessa quando comparada com a camada basal. A camada granulosa ou estrato granuloso é composta por células achatadas que apresenta grânulos queratinizados que contribuem para sua agregação. Essas células contêm um glicolipídeo hidrofóbico que reduz a perda de água transepídermica. A camada lúcida encontra-se somente em regiões onde a epiderme é mais espessa, como na palma das mãos e na sola dos pés. As células dessa camada sofrem degeneração nuclear e, dessa forma, o núcleo e as organelas não são visíveis, dificultando a sua visualização histológica. A camada córnea ou estrato córneo forma a camada superficial da pele, composta por células mortas e queratinizadas que são constantemente removidas da superfície corporal através do processo de descamação ou esfoliação. Esta camada de células achatadas e anucleadas oferece resistência e proteção às células presentes nas camadas mais internas (EDWARDS, 2005; WYSOCKI, 2012).

2.4.1.2 Melanócitos

Os melanócitos são células localizadas na camada basal da epiderme, derivados dos melanoblastos (ROSS; PAWLINA, 2012). Os melanócitos são responsáveis pela produção do pigmento chamado melanina que protege a pele contra os raios ultravioletas. A melanina produzida fica armazenada nos melanossomos e através de prolongamentos ramificados chamados dendritos de melanócitos é transferida aos queratinócitos e liberada por meio da secreção citócrina (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

2.4.1.3 Células de Langerhans

As células de Langerhans são derivadas da medula óssea, localizadas por toda a epiderme entre os queratinócitos, sendo mais frequentes na camada espinhosa. Funcionam como células dendríticas apresentadoras de antígeno que processam e captam os sinais antigênicos enviando informações para os linfócitos e para as células responsáveis pelas sinapses das terminações nervosas localizadas na camada basal da epiderme. Uma vez que as células T foram ativadas pelo antígeno epidérmico, caem na circulação sanguínea e alcançam o local no qual o antígeno se encontra, liberando citocinas pró-inflamatórias com a finalidade de neutralizar o antígeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

2.4.1.4 Células de Merkel

As células de Merkel são encontradas na região mais profunda da epiderme, juntamente com a membrana basal e presas aos queratinócitos pelos desmossomos (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). São responsáveis por sintetizar catecolaminas e formam terminações nervosas que estão associadas com a sensibilidade tátil (RABE *et al.*, 2006).

2.4.2 Derme

A derme é formada por tecido conjuntivo vascular, responsável pela sustentação e nutrição da epiderme e dos apêndices cutâneos. O tecido conjuntivo é composto pela matriz extracelular e por células residentes e migratórias. As células residentes são aquelas formadas localmente e que permanecem no tecido

conjuntivo, são elas: fibroblastos, plasmócitos, macrófagos, mastócitos, células adiposas e leucócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A derme é constituída por duas camadas distintas: a papilar é a mais superficial e a reticular que é a mais profunda. A camada papilar é constituída de numerosas papilas que se ligam às pregas epidérmicas, formando a junção dermoepidérmica. Já a camada reticular é a mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso, contendo muitas fibras de colágeno e fibras elásticas grossas (EDWARDS, 2005; WYSOCKI, 2012).

2.4.2.1 Fibroblastos

Os fibroblastos são as células mais numerosas do tecido conjuntivo frouxo. São células originadas a partir das células mesenquimais indiferenciadas e que apresentam prolongamentos citoplasmáticos irregulares, com núcleo grande, ovoide e com cromatina fina. Seu citoplasma é rico em retículo endoplasmático rugoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Os fibroblastos são responsáveis por sintetizar componentes da matriz extracelular, auxiliando na formação do tecido de granulação (PAGNANO *et al.*, 2008; MASSENO *et al.*, 2010) e sintetizam também as fibras colágenas, reticulares, elásticas e as proteoglicanas, além da participação no debridamento das feridas e na remodelação da pele (HILDEBRAND *et al.*, 2005).

2.4.2.2 Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante do organismo, além de ser a principal proteína que compõe a matriz extracelular. Apresenta papel fundamental na estrutura e resistência dos tecidos, e nas diversas interações entre célula-célula e célula-matriz. Existem mais de vinte tipos diferentes de colágeno, sendo os tipos I, II, III, IV, V, VI e VII mais frequentes na derme. O colágeno tipo I se destaca como o principal componente fibroso da derme, responsável pela resistência do tecido às forças de tensão (SAMPAIO; RIVITTI, 2007). O colágeno tipo III corresponde a cerca de 8 a 12% do colágeno dérmico e confere plasticidade ao tecido nas fases iniciais do processo de reparação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

2.4.3 Hipoderme

A hipoderme, também conhecida como tecido subcutâneo, é a camada mais interna do tecido epitelial. Ela é formada principalmente por tecido adiposo e vasos sanguíneos. As funções da hipoderme incluem: proteção dos órgãos internos, depósito de gordura e prevenção da perda de calor pelo corpo (EDWARDS, 2005; DI MEGLIO; PEREIRA; NESTLE, 2011).

2.5 FERIDAS CUTÂNEAS

Feridas cutâneas são representadas pelo rompimento da função anatômica e estrutural da pele, em maior ou em menor extensão, produzida geralmente por ação traumática externa que aciona as frentes de defesa do organismo para o contra-ataque (BLANES, 2004). Tazima, Vicente e Moriya (2008) classificaram as feridas de três formas diferentes de acordo com o agente causal, o grau de contaminação e o comprometimento tecidual.

- A) Quanto o agente causal: cirúrgicas (produzidas por instrumento cortante); contusas (produzidas por objeto de rombo); lacerantes (produzidas através de rasgão ou arrancamento tecidual) e perfurantes (caracterizadas por pequenas aberturas na pele).
- B) Quanto o grau de contaminação: feridas limpas (não apresentam sinais de infecção); contaminadas (ferimentos que apresentam contaminação accidental, com mais de seis horas de trauma ou que tiveram contato com objeto contaminado) e infectadas (feridas que apresentam sinais nítidos de infecção).
- C) Quanto ao comprometimento tecidual: grau 1 (comprometimento apenas da epiderme, sem perda tecidual); grau 2 (ocorre perda tecidual e comprometimento da epiderme e/ou derme); grau 3 (comprometimento da epiderme, derme e hipoderme) e grau 4 (comprometimento da epiderme, derme, hipoderme e tecidos mais profundos).

2.6 CICATRIZAÇÃO

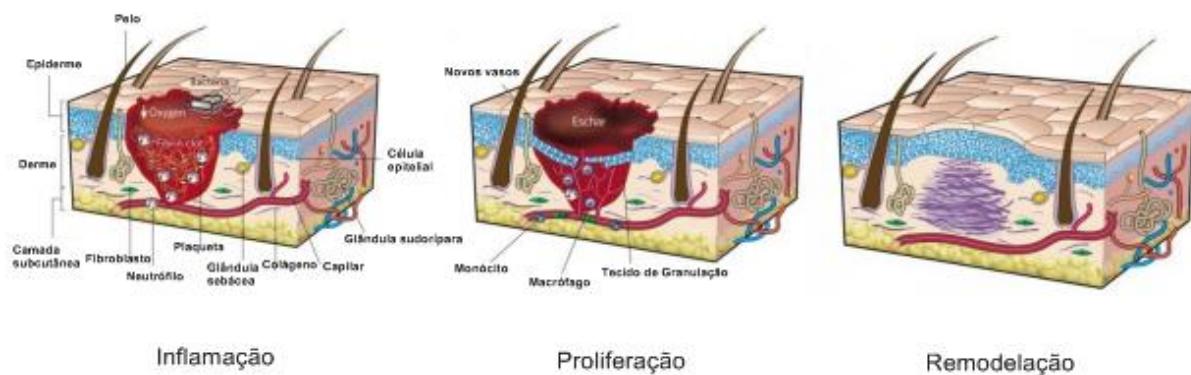
Após ocorrer a lesão de um tecido, imediatamente se inicia uma série de eventos biológicos complexos, dinâmicos e multifatoriais, com a participação de diferentes tipos celulares, mediadores solúveis e componentes da matriz extracelular

que interagem para restaurar a função e a integridade dos tecidos (GURTNER *et al.*, 2008; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

Existem quatro tipos de respostas que podem ocorrer após uma lesão tecidual: cicatrização normal, cicatrização excessiva, cicatrização deficiente ou regeneração. No processo de reparo normal, há um equilíbrio entre a formação da cicatriz e seu remodelamento, sendo considerado o tipo de resposta mais comum. Na cicatrização excessiva, existe muita deposição de tecido conjuntivo, resultando em alteração estrutural e perda de função, como é o caso dos queloides e das cicatrizes hipertróficas. A cicatrização deficiente ocorre quando existe deposição insuficiente de tecido conjuntivo, o tecido fica delicado e facilmente pode ser rompido, como é o caso das úlceras crônicas. A regeneração ocorre quando o organismo consegue refazer a estrutura do tecido exatamente como era antes da lesão, mas não consegue restaurar sua função. A capacidade de regeneração do homem é limitada a alguns tecidos como: hepático, ósseo, epiderme e alguma extensão de nervos que podem ser parcialmente regenerados após uma lesão (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

O processo de cicatrização de feridas normalmente é dividido em quatro etapas distintas, porém, sobrepostas: hemostasia, inflamação, proliferação e de remodelação (Figura 3) (GREAVES *et al.*, 2013).

Figura 3 - Fases do processo de cicatrização em lesões cutâneas.



Fonte: Adaptado de GURTNER *et al.*, 2008.

2.6.1 Hemostasia

A fase de hemostasia ocorre logo após a lesão tecidual e constitui-se de agregação plaquetária e formação de coágulo sanguíneo, que servirá de matriz extracelular provisória para migração celular (AKBIK *et al.*, 2014). Além disso, ocorre ativação da cascata de coagulação, que vai estimular a formação de trombina, responsável por transformar fibrinogênio em fibrina. A rede de fibrinas, por sua vez, fortalece o tampão plaquetário e torna o coágulo mais estável (HOSGOOD, 2007). Os mastócitos presentes nos vasos sanguíneos da região lesada liberam histamina, fator de necrose tumoral, leucotrienos e citocinas (GHOSH; GABA, 2013), que funcionam como sinalizadores para a migração de leucócitos, dando início à fase inflamatória.

2.6.2 Fase inflamatória

A fase inflamatória normalmente dura em torno de 24 e 48 horas após a lesão e pode ser caracterizada pelos sinais típicos como dor, rubor, calor e edema, resultantes da vasodilatação e da permeabilidade capilar aumentada (BAUM; ARPEY, 2005; PAZYAR *et al.*, 2014). As principais células envolvidas nesta fase são os neutrófilos e os macrófagos e a principal função desta fase é realizar o debridamento dos corpos estranhos, preparando o local afetado para o crescimento do novo tecido, o tecido de granulação (ABREU; MARQUES, 2005). Neutrófilos, macrófagos e fibroblastos produzem óxido nítrico, radicais livres e proteases, que destroem as bactérias e removem os componentes danificados da matriz extracelular (STOJADINOVIC *et al.*, 2008).

Quando a descontaminação da lesão é completa, os neutrófilos entram em apoptose e vão sendo repostos por monócitos recrutados da circulação sanguínea, ativados e diferenciados em macrófagos, atraídos por citocinas como fator de transformação do crescimento tipo beta (TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (BEANES *et al.*, 2003; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009). A presença de macrófagos na lesão é um marcador final da fase inflamatória e inicio da fase proliferativa, uma vez que estes irão mediar a angiogênese, a fibroplasia e a síntese de óxido nítrico (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

2.6.3 Fase proliferativa

A fase proliferativa inicia logo após a limpeza do tecido lesado e tem duração média de dois dias até três semanas. É caracterizada pelo aumento da proliferação celular, formação de novos vasos e síntese de matriz extracelular, com deposição de colágeno, fibronectina e outros componentes proteicos para preencher o tecido danificado e auxiliar na formação do tecido de granulação (BUDOVSKY; YARMOLINSKY; BENSHABAT, 2015). A fase proliferativa apresenta três eventos importantes: angiogênese, fibroplasia e reepitelização.

A falta de oxigênio e nutrientes no leito da ferida refletem perfusão tecidual inadequada devido ao rompimento dos capilares sanguíneos, permitindo a liberação de fatores necessários para trazer um novo suprimento sanguíneo por meio de um processo denominado angiogênese (BAUM; ARPEY, 2005). Células epidérmicas, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais produzem principalmente o VEGF, além de outros fatores de crescimento como bFGF e TGF- β (ABREU; MARQUES, 2005; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Conforme os novos vasos vão entrando na área lesionada, o aporte de oxigênio e nutrientes vai retornando ao nível normal (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

Os fibroblastos proliferam (fibroplasia), migram para o local da ferida, tornam-se ativos e começam a sintetizar colágeno (PAZYAR *et al.*, 2014). Junto à fibroplasia e à intensa proliferação vascular, ocorre a formação do tecido de granulação, apresentando aspecto granuloso e avermelhado. O miofibroblasto é uma célula que está presente no tecido de granulação e confere capacidade contrátil ao tecido, reduzindo a área das feridas após as lesões e facilitando a sua reepitelização (RAMALHO *et al.*, 2003). As citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- α estimulam os fibroblastos a sintetizar e secretar fator de crescimento dos queratinócitos tipo 1 e 2 (KGF-1 e KGF-2) e IL-6, os quais estimulam a migração, proliferação e diferenciação dos queratinócitos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; STOJADINOVIC *et al.*, 2008).

Na reepitelização, ocorre migração dos queratinócitos da camada basal da epiderme por sobre a área de reparação do tecido conjuntivo subjacente (VIEIRA *et al.*, 2002). Esta migração é facilitada através da produção de proteases específicas, como por exemplo, a colagenase produzida pelos fibroblastos e também pelo conteúdo de água no leito da ferida (GENTILHOMME *et al.*, 1999). Feridas

superficiais ressecadas reepitelizam mais lentamente do que as ocluídas (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

2.6.4 Fase de remodelação

Com o fechamento da lesão, inicia-se o remodelamento da cicatriz pelos próximos meses ou anos, com redução de vasos e células no tecido cicatricial, aumento da tensão e reorganização do colágeno (ABREU; MARQUES, 2005). O colágeno tipo III que compõe a matriz provisória será degradado pela ação das metaloproteinases e substituído por colágeno do tipo I, promovendo maior rigidez ao tecido (DOUGHTY; SPARKS-DeFRIESE, 2012; PAZYAR *et al.*, 2014). As fibras de colágeno gradualmente se espessam e tornam-se orientadas paralelamente no leito da ferida, alinhando-se às linhas de tensão da pele, diferente do modelo de fibras entrelaçadas observado no tecido normal (STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009). A densidade das fibras vai diminuindo gradualmente e a lesão perde a coloração rosada, tornando-se pálida. Estruturas dérmicas que foram perdidas durante a lesão, como pêlos, glândulas sebáceas e sudoríparas, não são regeneradas (ABREU; MARQUES, 2005).

Apesar do processo de cicatrização ser um fenômeno local, pode sofrer influência de fatores ambientais e fisiológicos que interferem na qualidade da cicatriz, no tempo de cicatrização e na presença ou não de complicações (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2006).

2.7 TIPOS DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Existem três formas pelas quais uma ferida pode cicatrizar, a depender da quantidade de tecido danificado e da presença ou ausência de infecção: primeira, segunda ou terceira intenção (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

- Primeira intenção: é o tipo de cicatrização que ocorre quando as bordas da ferida são aproximadas por suturas cirúrgicas, havendo perda mínima de tecido e ausência de infecção.
- Segunda intenção: neste tipo de cicatrização ocorre perda excessiva de tecido, com exsudato abundante e presença ou não de infecção. A

aproximação cirúrgica das bordas não é possível. As feridas são deixadas abertas para serem fechadas por contração e reepitelização.

- Terceira intenção: este tipo de cicatrização ocorre principalmente quando há presença de infecção na ferida, que deve ser tratada inicialmente, para posteriormente ser suturada.

2.8 FATORES QUE INTERFEREM NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

Segundo Hess (2002), os fatores que podem interferir no processo de cicatrização são classificados como locais e sistêmicos. Os fatores locais são os que incidem diretamente na ferida, enquanto que os sistêmicos ocorrem de forma disseminada pelo corpo. Dentre os fatores locais, encontram-se infecção local, profundidade da lesão, suprimento sanguíneo inadequado (isquemia), hipóxia, edema, necrose tecidual, fatores mecânicos (movimentação excessiva), presença de corpo estranho e os medicamentos de uso tópico. Os fatores sistêmicos são idade do paciente, estado nutricional, doenças crônicas (diabetes, doenças cardiovasculares, doenças hematológicas, doenças autoimunes e etc), infecções sistêmicas, uso de medicamentos (anticoagulantes, corticosteroides), imunossupressão e radioterapia (MITCHELL *et al.*, 2006; JAUL, 2009).

2.8.1 Infecção

A superfície da pele apresenta mecanismos de defesa que ajudam a prevenir a invasão e o estabelecimento de microrganismos patogênicos à pele. Por exemplo, a presença do estrato córneo fornece uma barreira física à invasão, enquanto que o pH ácido da pele fornece uma barreira química de proteção. Quando essas barreiras são rompidas e a pele tem uma lesão aberta, os tecidos adjacentes tornam-se suscetíveis aos efeitos danosos das bactérias e outros microrganismos (WARRINER; BURREL, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2009).

A presença de um processo infeccioso, numa lesão, dificulta o reparo tecidual, podendo levar a quadro de necrose ou aumento do tamanho da ferida (KINGSLEY, 2001). O comprometimento do processo cicatricial ocorre porque há uma competição entre as células do hospedeiro e as bactérias por oxigênio e nutrientes, como também, as bactérias produzem toxinas que modificam ou inativam

as células do hospedeiro, causando sua morte ou alterando suas atividades normais (STOTTS, 2012).

Feridas cutâneas comumente são infectadas por bactérias provenientes da pele. Dentre as espécies frequentemente isoladas a partir das lesões epiteliais, encontram-se *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (KUMAR *et al.*, 2008; PATTANAYAK; SUNITA, 2008). Os fungos também são responsáveis pelas micoses em humanos e podem causar desde simples infecções superficiais até sistêmicas graves (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015). A *Candida albicans* é a levedura de maior prevalência, no entanto, outras espécies não albicans como a *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, também estão relacionadas aos processos infecciosos (HOFS; MOGAVERO; HUBE, 2016; LIN *et al.*, 2017).

Neste cenário, a má utilização dos antimicrobianos, seja por uso excessivo ou de forma incorreta, contribui para o surgimento global de microrganismos patogênicos de alta resistência (PASTOR-SÁNCHEZ, 2006; RODRÍGUEZ- ROJAS *et al.*, 2013). Os mecanismos de resistência ocorrem de diversas formas, incluindo a alteração do sítio de ação, alterações na permeabilidade celular e de efluxo, transferência de genes de resistência e formação de biofilmes, o que reflete negativamente na população com o aumento das taxas de mortalidade, de morbidade e dos custos com tratamentos (RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014).

2.8.1.1 Formação de biofilmes

O potencial de virulência pode ser definido como a capacidade de um microrganismo em aderir na superfície do hospedeiro, infeccionar e provocar doenças. Uma das principais formas de virulência é a capacidade de adesão e adaptação dos microrganismos à diferentes superfícies, formando comunidades microbianas complexas denominadas biofilmes (SUZUKI, 2009).

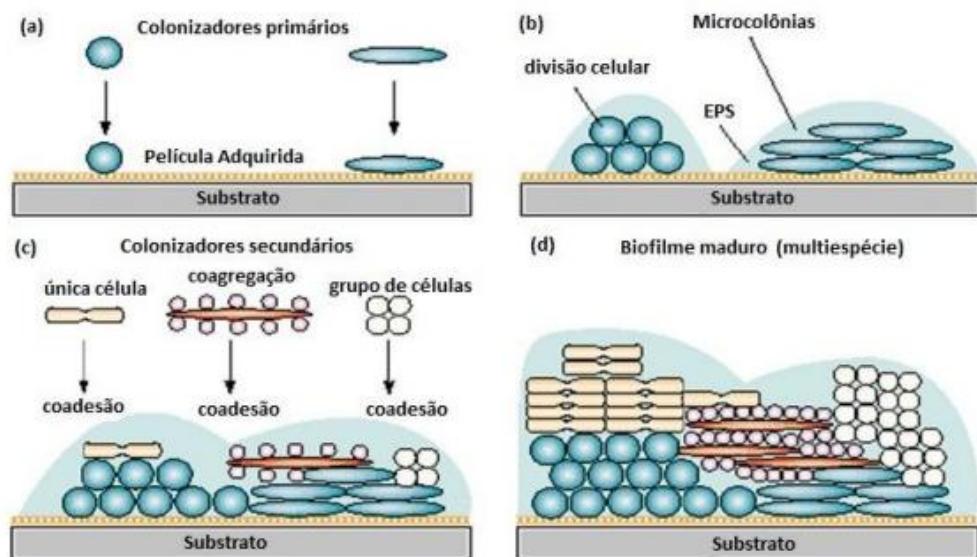
Os biofilmes microbianos são formados por microrganismos de uma única ou múltiplas espécies (LINDSAY; VON-HOLY, 2008), ligados irreversivelmente a um substrato ou uns aos outros por meio de uma interface (DONLAN; COSTERTON, 2002), representando o tipo mais prevalente de crescimento de microrganismos na

natureza, sendo fundamentais para o desenvolvimento de infecções clínicas (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

A formação dos biofilmes ocorre em três fases coordenadas, como ilustrado na Figura 4. Na fase inicial, os microrganismos denominados colonizadores primários aderem à superfície do substrato por meio das interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Figura 4a). Na fase intermediária, as células aderidas começam a proliferar, formando microcolônias que sintetizam uma matriz exopolissacarídica (EPS) que permite a circulação de nutrientes dentro do biofilme e serve de substrato para a associação de novos microrganismos denominados colonizadores secundários (Figura 4b). Estes colonizadores secundários podem aderir diretamente aos primários ou aderir a outros microrganismos, formando os chamados coagregados, que vão aderir aos primários (DONLAN; COSTERTON, 2002), possibilitando o desenvolvimento do biofilme como mostra a Figura 4c.

Na fase final, o biofilme maduro vai liberar microrganismos para que possam colonizar novos ambientes. À medida que o processo ocorre, a complexidade e a variedade da comunidade aumentam (Figura 4d). O decurso encerra quando não há mais espaço disponível para novas populações microbianas (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Figura 4 - Representação da formação de biofilme.



Fonte: Adaptado por RICKARD *et al.*, 2003.

A sinalização célula a célula é um processo de comunicação intra e interespécies microbianas imprescindível na formação dos biofilmes. Esta comunicação é intermediada por auto-reguladores que controlam a superpopulação desnecessária e a competição por nutrientes e tem consequências críticas no estabelecimento e disseminação do processo infeccioso (RAMAGE *et al.*, 2005).

As vantagens para os microrganismos se organizarem em biofilmes consistem em aumentar a captação de nutrientes, permitirem proliferação maior e mais rápida, proteger contra a fagocitose e outros mecanismos de defesa do hospedeiro, além de aumentar a resistência aos antimicrobianos (SUZUKI, 2009).

2.9 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS PARA LESÕES CUTÂNEAS

As lesões cutâneas não ocorrem como um evento isolado, portanto, uma avaliação completa do paciente é necessária para estabelecer um tratamento individualizado, eficaz e de qualidade. A avaliação deve conter a causa da lesão, bem como análise de fatores locais e sistêmicos que talvez estejam comprometendo o processo de reparação tecidual (ROLSTAD; BRYANT; NIX, 2012), como é o caso das doenças crônicas, as quais precisam ser tratadas para corrigir as anormalidades no processo de cicatrização (HARDING; MORRIS; PATEL, 2002).

Atualmente, existem diversos métodos terapêuticos utilizados no tratamento de feridas, entre eles a aplicação de curativos e soluções antissépticas como o PVPI (polivinilpirrolidona iodo, a 10%) e pomadas à base de antimicrobianos como neomicina, sulfadiazina de prata 1%, nitrofurasona e mupirocina 2% são amplamente utilizadas na prática clínica (PEREIRA; BACHION, 2005).

Os curativos que promovem a absorção de umidade como as fibras de alginato de cálcio e sódio, as fibras de carboximetilcelulose e espumas de poliuretano são utilizados durante a fase inflamatória, pois o excesso de exsudato compromete a evolução do processo de cicatrização. Os filmes de poliuretano ou polietileno são curativos utilizados quando os tecidos estão úmidos, mas apresentam pouco exsudato. Já os hidrogéis à base de carboximetilcelulose e alginato de cálcio são necessários quando os tecidos estão secos, pois eles hidratam e restabelecem a umidade tecidual. Curativos à base de ácido hialurônico são utilizados no tratamento de feridas crônicas, como as úlceras venosas (VACHON; YAGER, 2006).

A terapêutica disponível aumenta a possibilidade da cura de lesões, entretanto, apresentam eficácia restrita e algumas técnicas são de custo elevado uma vez que se trata de produtos importados de alta tecnologia (MASSON-MEYERS *et al.*, 2013). Dessa forma, almeja-se o estudo de novos fármacos acessíveis à população e que apresentem efeitos anti-inflamatório, antimicrobiano, analgésico, antioxidante e cicatrizante (VIEIRA *et al.*, 2008; MAVER *et al.*, 2015), capazes de restaurar a integridade tecidual.

O processo inflamatório embora essencial na reparação do tecido, quando prolongado pode retardar a cicatrização (HOSGOOD, 2007). A contaminação no leito da ferida é um fator que aumenta a inflamação local e compromete o reparo tecidual, necessitando da ação de agentes anti-inflamatório, antimicrobiano e do uso de analgésicos para reduzir o processo doloroso (MITTAL; SATISH; ANIMA, 2013). Os processos inflamatórios também envolvem a liberação de radicais livres os quais apresentam um ou mais elétrons desemparelhados e ao capturar elétrons das moléculas estáveis causam sua desestabilização (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; LÓPEZ-DELIS *et al.*, 2018). Quando os radicais livres alcançam concentrações elevadas no meio fisiológico ocorre estresse oxidativo, provocando danos reversíveis ou irreversíveis às moléculas biológicas importantes na resolução da lesão, como os lipídios, proteínas, colágeno, ácido hialurônico e proteoglicanos (SCHÄFER; WERNER, 2008; REUTER *et al.*, 2010).

Por outro lado, os antioxidantes são moléculas capazes de inibir a formação de radicais livres ou os fenômenos de complexação e ainda reduzir ou retardar a degradação das substâncias biológicas (CONDELLI *et al.*, 2015). Essas moléculas podem ser divididas por meio do seu comportamento, como enzimáticas ou não enzimáticas. As enzimáticas como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) são de maior representatividade por estarem presentes em todas as células do corpo, enquanto as não enzimáticas podem ser obtidas através da alimentação, como as vitaminas C e E (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Porém, no estresse oxidativo tecidual a taxa de produção dos radicais livres ultrapassa a taxa de remoção pelos antioxidantes naturais do sistema de defesa celular do organismo (SIES, 1985), sendo necessário durante o tratamento de feridas cutâneas o uso de produtos tópicos que ofereçam potencial antioxidante.

2.9.1 Hidrogéis

Os hidrogéis são formados por água e por um polímero hidrofílico que devido sua estrutura tridimensional consegue reter grande quantidade de água e intumescer rapidamente, apresentando-se como um material flexível e elástico que adere tanto à pele saudável quanto à pele lesionada (WANG *et al.*, 2004). Normalmente, são utilizados para o tratamento de úlceras diabéticas ou de pressão, queimaduras de primeiro ou segundo grau e traumas na pele em geral (ROSIAK; OLEJNICZAK, 1993).

Apresentam propriedades físicas semelhantes as dos tecidos vivos, como manutenção do teor de água relativamente alto, são biocompatíveis e hidrofílicos, de consistência macia e boa aderência, além da baixa tensão superficial com a água ou outros fluidos biológicos (SATISH; SATISH; SHIVAKUMAR, 2006), despertando grande interesse para uma variedade de aplicações médicas e farmacêuticas, tais como: lentes de contato, curativos, peles artificiais, cordas vocais, tendões artificiais, dentre outros (PEPPAS, 1996).

No processo de cicatrização, os hidrogéis auxiliam promovendo o amolecimento e remoção do tecido desvitalizado por meio de desbridamento autolítico, absorvem o exsudato, formam barreira contra os microrganismos e permitem o acesso de oxigênio para a ferida. Possuem a vantagem de serem utilizados em várias fases da cicatrização sem comprometer o resultado, não danificam o tecido de granulação (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; FRANCO; GONÇALVES, 2008), são hipoalergênicos, de baixo custo e fácil preparação (ROGERO *et al.*, 2003). Dessa forma, a incorporação do extrato de *T. catappa* com o hidrogel apresenta-se como uma alternativa promissora no tratamento de feridas cutâneas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material botânico

As folhas da espécie *Terminalia catappa* foram coletadas no município de Olinda (Rua João Alexandre de Tavares, nº 91, bairro de Jardim Atlântico), zona metropolitana de Recife - PE, em 28 de agosto de 2019. Uma exsicata do material botânico (Figura 5) foi depositada no acervo do Herbário Geraldo Mariz, do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) devidamente enumerada e catalogada (nº 86.171).

Figura 5 - Exsicata da *Terminalia catappa*.



Fonte: A autora (2021).

3.1.2 Células

As células L929 (fibroblastos murinos), macrófago peritoneal murino e HaCat (queratinócito humano) foram provenientes da secção de Cultura de Células do BIOFARMATOX do Departamento de Antibióticos/UFPE, mantidas em meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino e 1% antibióticos (penicilina 1000 UI/mL

contendo estreptomicina 250 mg/mL e 1% L-glutamina 200 mM), em uma atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C.

3.1.3 Microrganismos

Os microrganismos padrões utilizados foram obtidos da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA) e da Coleção de Culturas da Micoteca (URM) da Universidade Federal de Pernambuco. Foram utilizadas quatro bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Staphylococcus epidermidis* (UFPEDA 113), *Streptococcus pyogenes* (UFPEDA 1043b) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138); quatro bactérias gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 212) e *Proteus mirabilis* (UFPEDA 16) e as leveduras *Candida albicans* (UFPEDA 1007), *Candida krusei* (URM 6258), *Candida tropicalis* (URM 5034), *Candida glabrata* (URM 9415) e *Candida parapsilosis* (URM 4261).

3.1.4 Animais experimentais

Foram utilizados 60 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), pesando entre 250 a 300g, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades de aço inoxidável e maravalha como cobertura, tendo acesso livre à água “ad libitum” e ração balanceada (Presence-Purina Brasil), mantidos num ambiente com temperatura de 22 ± 2 °C e luminosidade controlada, proporcionando um ciclo claro-escuro de 12 horas. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, sob protocolo de número 0010/2020 (Anexo A).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa*

O material vegetal foi submetido à secagem em estufa à 45 °C por um período de 14 dias e, em seguida, triturado com o auxílio de um moinho de facas. Para obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* (EHTc), foi utilizado 180 g do material vegetal para 500 mL de solução etanol/ água 70% (v/v) e submetido à

extração por maceração exaustiva por um período de 72 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato obtido foi filtrado, o solvente etanólico foi totalmente retirado através de um evaporador rotativo à baixa pressão e depois liofilizado para remoção completa da água. O rendimento final do extrato foi calculado de acordo com a fórmula: RE (%) = [Peso do extrato liofilizado (g)/ Peso do pó utilizado na preparação do extrato (g)] x 100.

3.2.2 Perfil fitoquímico do EHTc

3.2.2.1 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

Foi realizado segundo metodologia descrita por Wagner e Bladt (2009). Uma amostra do extrato bruto, na concentração de 10 mg/mL, foi aplicada em placas cromatográficas de sílica gel 60 (0,20 mm) como fase fixa e solventes orgânicos como fase móvel pré-selecionados. Após a corrida cromatográfica, as placas foram reveladas utilizando reagentes específicos de acordo com a classe de metabólitos pesquisados: taninos condensados e hidrolisáveis, alcaloides, flavonoides, triterpenos, esteroides e cumarinas (Tabela 1).

Tabela 1 - Fase móvel com os padrões e reveladores específicos para as classes de metabólitos secundários utilizados na CCD do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* (EHTc).

Classes de metabólitos secundários	Padrões	Reveladores	Fase móvel/Proporção
Taninos condensados	Catequina	Vanilina clorídrica	Acetato de Etila: Ácido Fórmico: Ácido Acético glacial: Água (100:11:11:27 v/v)
Taninos hidrolisáveis	Ácido gálico	Alumínio de ferro a 1%	Acetato de Etila: Tolueno: Ácido Fórmico (10:3:1 v/v)
Alcaloides	Pilocarpina	Dragendorff	Acetato de Etila: Ácido Fórmico: Ácido Acético glacial: Água (100:11:11:27 v/v)
Flavonoides	Quercetina	NEU	Acetato de Etila: Ácido Fórmico: Ácido Acético glacial: Água (100:11:11:27 v/v)
Triterpenos e esteroides	β-sitosterol	Liebermann -Burchard	Tolueno: Acetato de Etila (90:10 v/v)

Cumarinas	Ácido cumárico	UV- 365 nm	Éter: Tolueno: Ácido Acético 10 % (50: 50: 50 v/v)
-----------	----------------	------------	---

Fonte: A autora (2021).

3.2.2.2 Análise por UPLC- DAD - QTOF MS

O espectrômetro de massa XEVO-G2XSQTOF (Waters, Manchester, Reino Unido) foi conectado ao sistema ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, EUA) através de uma interface de ionização por eletropulverização (ESI). O detector analítico utilizado foi o de Waters Acquity PDA, que foi configurado para uma faixa de comprimento de onda de 200- 400 nm. A separação cromatográfica dos compostos foi realizada no ACQUITY UPLC com um amostrador automático condicionado a 4 °C, usando uma coluna C18 (50 mm × 2.1 mm i.d., tamanho de partícula de 1,7 µm) (Waters, Milford, MA, EUA). A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. A fase móvel constituída por água com 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) foi bombeada a uma taxa de fluxo de 0,4 mL min⁻¹. O programa de eluição com gradiente foi o seguinte: 0-5 min, 5-10% A; 5-9 min, 10-95% B. O volume de injeção foi de 10 µL. A análise MS foi realizada em um Xevo G2 QTOF (Waters MS Technologies, Manchester, Reino Unido), um espectrômetro de massa acoplado a uma fonte de ionização por eletropulverização no modo iônico negativo ou modo iônico positivo. O intervalo de varredura foi de 50 a 1200 m/z para aquisição de dados.

Além disso, foram realizados experimentos de MSE que permitem que os dados de íons de precursores e produtos sejam adquiridos em uma única injeção. As condições de origem são as seguintes: tensão capilar - 3,0 kV; cone de amostra, temperatura da fonte - 100 °C; temperatura de dessinação - 250 °C; taxa de fluxo de gás cone - 20 Lh⁻¹; taxa de fluxo de dessolvatação (N2) - 600 Lh⁻¹. Todas as análises foram realizadas usando o lockspray, o que garantiu precisão e reproduzibilidade. A leucina-encefalina (10 ng mL⁻¹) foi utilizada como um composto padrão ou de referência para calibrar espectrômetros de massa durante a análise e introduzida por uma lockspray a 10 µL min⁻¹ para aquisição de massa precisa. Toda a aquisição e análise de dados foram controladas usando Waters MassLynx v 4.1.

3.2.3 Quantificação dos fenóis totais, taninos totais e flavonoides no EHTc

3.2.3.1 Determinação do conteúdo de fenóis e taninos totais

O conteúdo de fenóis e taninos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Li *et al.* (2008). 0,5 mL do extrato foi misturado com 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (1:10 diluído com água destilada) por 5 min e em seguida adicionado 2 mL de Na_2CO_3 aquoso (7,5 %, p/v). A mistura foi deixada em repouso por 2 horas e a absorbância foi medida em espectrofotômetro à 760 nm contra um branco preparado com metanol. Ácido gálico (AG) em concentrações de 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram usados para obter a curva de calibração padrão (em triplicata). O teor de fenóis totais foi expresso em gramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (g EAG/g). Para taninos totais, o ácido tântico (AT) em concentrações de 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram usados para obter a curva de calibração padrão (em triplicata). O teor de taninos totais foi expresso em gramas equivalentes de ácido tântico por grama de extrato (g EAT/g).

3.2.3.2 Determinação do conteúdo de flavonoides

O conteúdo de flavonoides foi determinado de acordo com Woisky e Salatino (1998). Uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi adicionada a 0,5 mL de solução AlCl_3 (2%, p/v) preparada em etanol/água. Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, protegida contra a luz, a absorbância da amostra foi medida em espectrofotômetro à 420 nm contra um branco preparado com metanol. Quercetina (Q) nas concentrações de 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram usados para obter a curva de calibração padrão (em triplicata). O teor de flavonoides foi expresso em gramas equivalentes de quercetina por grama de extrato (g EQ/g).

3.2.4 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do EHTc

3.2.4.1 Ensaio de eliminação do radical DPPH

A avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* pelo método de sequestro de radical livre foi medida por meio da doação

de hidrogênio utilizando o radical estável DPPH (VERAS *et al.*, 2020). As medições foram realizadas em triplicata, utilizando 250 µL da solução de DPPH (1 mM) a 40 µL de diferentes concentrações do extrato (31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1.000 µg/ml). As soluções foram deixadas em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. Logo após, a absorbância foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 517 nm e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de DPPH removido. Um análogo da vitamina E (Trolox ®-Sigma-Aldrich, Alemanha) foi utilizado como padrão. A porcentagem de inibição (%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(Ac - As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorbância do controle e As é a absorbância da amostra. A IC_{50} da atividade do DPPH foi calculada com base na regressão linear da porcentagem do DPPH remanescente contra a concentração da amostra.

3.2.4.2 Ensaio de eliminação do radical ABTS

A atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* pelo teste ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico) foi baseada na geração do radical cromóforo catiônico obtido a partir da oxidação de 7 mM de ABTS com 140 mM de persulfato de potássio, os quais foram incubados à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 12-16 h (tempo necessário para a formação do radical). Após este período, a solução foi diluída em etanol até a obtenção de uma absorbância de 0,70 ($\pm 0,05$) no comprimento de onda de 734 nm. Posteriormente, foram misturados 30 µL de diferentes concentrações do extrato (31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1.000 µg/ml) com 3 mL da solução, deixados em repouso durante 6 min e determinada absorbância a 734 nm (VERAS *et al.*, 2019). As medições foram realizadas em triplicata e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de ABTS removido. Um análogo da vitamina E (Trolox ®-Sigma-Aldrich, Alemanha) foi utilizado como padrão. A percentagem de inibição (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(Ac - As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorbância do controle e As é a absorbância da amostra. A IC_{50} da atividade de ABTS foi calculada com base na regressão linear da porcentagem de ABTS restante contra a concentração da amostra.

3.2.4.3 Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante total (AAT) foi determinada por meio do ensaio de fosfomolibdênio, baseando-se na redução de molibdênio⁺⁶ a molibdênio⁺⁵ pela amostra e posterior formação de um complexo fosfato/molibdênio⁺⁵ esverdeado (COSTA *et al.*, 2011). 100 µL de diferentes concentrações do extrato (31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1.000 µg/ml) foram misturados a 1 mL da solução composta por ácido sulfúrico 600 mM, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM, posteriormente incubados a 100 °C por 90 min. As absorbâncias das amostras foram medidas a 695 nm contra um branco, em triplicata. O ácido ascórbico foi utilizado como padrão. A atividade antioxidante total (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(Ac - As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorbância do controle e As é a absorbância da amostra. A IC_{50} da AAT foi calculada com base na atividade de regressão linear contra a concentração da amostra.

3.2.5 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* do EHTc

3.2.5.1 Avaliação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi realizada em hemácias obtidas do sangue periférico de ratos. Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina (NaCl 0,9% + CaCl₂ 10 mM) e centrifugados por 5 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os eritrócitos ressuspensos em solução de NaCl 0,9% para se obter uma suspensão de eritrócitos a 2%.

Este ensaio foi realizado em placas de 96 poços: 100 µL de solução salina (controle negativo); 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo (branco); 80 µL de solução salina + 20 µL de Triton X – 100 a 1% (controle positivo); 100 µL de solução salina + 100 µL dos extratos separadamente diluídos em DMSO a 10% e distribuídos nos poços. Por último, foi adicionado 100 µL da suspensão de eritrócitos a 2% em todos os poços.

Em seguida, a placa foi deixada sob agitação constante em temperatura ambiente, por um período de 30 minutos e logo depois centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para outra placa e a absorbância medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. Amostras que apresentam uma concentração capaz de hemolizar 50% das hemácias (CH_{50}) < 200 µg/mL são consideradas hemolíticas (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002).

3.2.5.2 Avaliação da viabilidade celular

Foi realizada pelo ensaio colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), conforme proposto por Alley *et al.* (1998). Suspensões de 10^5 células/mL para cada uma das linhagens celulares estudadas (L929, macrófagos e HaCat) foram distribuídas separadamente em placas de 96 micropoços contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C, por um período de 24 horas, em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂. Em seguida o EHTc, previamente dissolvido em DMSO (0,1%), foi adicionado aos poços nas concentrações de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. Após 72 horas de reincubação, foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 horas de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism* 5.0.

3.2.6 Ensaios microbiológicos

3.2.6.1 Microdiluição em caldo

A atividade antimicrobiana foi avaliada pela metodologia de microdiluição em caldo para determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) seguindo o CLSI (2018). O extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* com concentração inicial de 1.024 µg/mL em DMSO a 1%, foi adicionado à placa de 96 micropoços contendo meio Caldo Mueller Hinton para bactérias e RPMI-1640 (Sigma) para fungos, logo em seguida, uma suspensão microbiana na concentração $1,5 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias (UFC/mL) correspondentes a 0,5 da escala de McFarland, foi adicionada nas placas. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas para bactérias e por 48 horas para fungos. Para melhor visualização do crescimento bacteriano, foi adicionado resazurina (0,01 mg/mL) a todos os poços, seguindo-se de incubação por 2 horas e posterior leitura das placas para determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI). Para a

determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB) foi repicada, em placas de Petri contendo meio ágar Mueller Hinton para bactérias e ágar Sabouraud para fungos, uma alíquota das concentrações que apresentaram atividade no teste de CMI. Estas placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas para bactérias e por 48 horas para fungos. Para Concentração Mínima Bactericida (CMB) foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento do microrganismo. Os testes foram realizados em triplicata.

3.2.6.2 Inibição da formação do biofilme

Em uma microplaca de poliestireno de fundo chato (TPP; Trasadingen, Suíça), contendo 96 poços, foi adicionado em cada poço 180 µL de caldo RPMI, 20 µL da suspensão microbiana de turbidez de 0,5 de McFarland ou $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e as concentrações de 1.024 a 2µg/ml do extrato. A placa foi incubada em estufa bacteriológica durante 48 horas a 35 °C. Após o período de incubação, o conteúdo líquido da placa foi descartado e três lavagens com 200 µL solução salina estéril foram realizadas de modo a remover as células microbianas não aderidas à superfície polimérica (células planctônicas).

As células aderidas foram fixadas com 200 µL de metanol, durante 20 minutos. Então, o metanol foi removido por pipetagem, a microplaca foi invertida e submetida à secagem por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 µL de cristal violeta 0,5% por 15 minutos, para corar as células microbianas aderidas à microplaca. Após isso, removeu-se o cristal violeta e procedeu-se lavagem das microplacas em água corrente e, depois de secagem à temperatura ambiente, o biofilme corado foi eluído com 200 µL de etanol 95%, durante 30 minutos. A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 590 nm, em aparelho leitor de microplaca (Behring EL 311- HOECHST, Akasaka, Japan). Como controle positivo foi realizado somente o crescimento microbiano com o meio de cultura, um controle para validar o teste realizado com a cepa de *Candida albicans* e como controle de esterilidade somente o meio de cultura (branco), sem inóculo. Os testes foram realizados em triplicata.

O valor da densidade óptica (DO) utilizado foi o valor médio obtido nas três leituras para cada isolado, subtraído do valor medido para o controle branco (controle de esterilidade); desta forma foi possível excluir os valores mais

discrepantes e controlar a variabilidade. Considerou-se produtor de biofilme as amostras, cuja média de leitura da DO para cada isolado, foi maior ao valor do ponto de corte (DOc), definido pela seguinte fórmula: $[B + 3(s)]$, onde B é a média da leitura do branco e s é o desvio padrão das leituras do branco.

Os isolados foram classificados como fortes produtores de biofilme quando $4DOc \leq DO$ moderado quando $2DOc \leq DO \leq 4DOc$, fraco quando $DOc \leq DO \leq 2DOc$ e não produtor de biofilme quando o valor obtido foi igual ou menor ao valor de DOc.

A porcentagem de inibição de formação do biofilme para cada concentração foi calculada de acordo com Jadhav *et al.* (2013), usando a seguinte fórmula: % de inibição do biofilme = $[(DO \text{ da amostra tratada}) / (DO \text{ do controle positivo não tratado})] \times 100$.

3.2.6.3 Remoção do biofilme pré-formado

Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 180 μL de caldo RPMI + 20 μL do inóculo microbiano e incubados por 6 horas a 35 °C. Após esse período as concentrações do extrato foram adicionadas ao biofilme pré-formado e a placa incubada novamente por 38 horas a 35 °C. As etapas de lavagem, leitura do biofilme e classificação foram as mesmas descritas no item 3.2.6.2.

Como controle positivo foi realizado somente o crescimento microbiano com o meio de cultura, um controle para validar o teste realizado com a cepa de *Candida albicans* e como controle de esterilidade somente o meio de cultura (branco), sem inóculo. Os testes foram realizados em triplicata.

3.2.7 Preparação do hidrogel de *Terminalia catappa*

A formulação do hidrogel-base foi orientada por alguns estudos da literatura, como os de Ferreira (2010) e Batistuzzo, Itaya e Eto (2011), com modificações. Os componentes escolhidos para preparação do hidrogel, bem como suas concentrações, são apresentadas no Quadro 1.

Em um gral, foram solubilizados os componentes metilparabeno e propilparabeno com o propilenoglicol e, em seguida, acrescentada água destilada. Posteriormente, foi pulverizado o Carbopol® sobre a mistura e homogeneizado até a completa solubilização do polímero. O sistema permaneceu sob agitação, por

aproximadamente 30 minutos, até a formação do gel. O pH foi ajustado com trietanolamina na faixa de 5,0-6,0. Após preparação do hidrogel-base, foi feito a incorporação do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa*, sendo utilizado 5g do EHTc em 95g do hidrogel-base (100 g- concentração 5%); e utilizado 10g do EHTc em 90g do hidrogel-base (100 g- concentração 10%).

Quadro 1 - Fórmula para preparação de 100g do hidrogel-base.

Componente	Concentração (%)	Função
Carbômero (Carbopol® 940)	2g	Geleificante
Metilparabeno	0,3g	Conservante
Propilparabeno	0,1g	Conservante
Propilenoglicol	4g	Emoliente
Água destilada	93,6 mL	Veículo
Trietanolamina q.s.p.*	(8 a 10 gotas)	Neutralizante

Fonte: A autora (2021). *q.s.p. = quantidade suficiente para equilibrar o pH

3.2.8 Análise físico-química do hidrogel de *Terminalia catappa*

3.2.8.1 Características organolépticas

Após a manipulação dos hidrogéis, foram avaliados os seguintes parâmetros: características organolépticas, pH e viscosidade.

- Aspecto: A amostra foi analisada quanto as suas características “macroscópicas” para verificação de sinais de instabilidade (BRASIL, 2004; BRASIL, 2008).
- Cor: A amostra foi observada visualmente, em temperatura ambiente, sob condições de luz natural (sol) e artificial (branca) (BRASIL, 2004; BRASIL, 2008).
- Odor: O odor da amostra acondicionada no material de embalagem foi avaliado diretamente através do olfato (BRASIL, 2004; BRASIL, 2008).

3.2.8.2 Determinação de pH

Após calibração do eletrodo com solução tampão 4,0 e 7,0, a medida foi realizada em duplicata em pHmetro digital utilizando-se amostras diluídas a 10% em água destilada (BRASIL, 2008).

3.2.8.3 Determinação da viscosidade

Utilizando um viscosímetro rotacional de Brookfield com spindle set. Os valores foram obtidos após 1 minuto de rotação do spindle nº 4, na velocidade de 30 rpm e expressos em porcentagem (%) de redução de viscosidade em relação ao tempo zero. O resultado final foi calculado em centiPoise (cP) (BRASIL, 2004).

3.2.9 Modelo de ferida excisional

Os ratos Wistar machos foram previamente anestesiados com uma associação de ketamina (10 mg/kg^{-1}) e xilazina (3 mg/kg^{-1}), por via intramuscular. Posteriormente, os animais foram posicionados em decúbito ventral, e em seguida, realizada a tricotomia manual e antisepsia com álcool iodado 0,1% e na linha média dorsal da região cervical de cada animal, a área incidida foi demarcada usando um *punch* metálico com lâmina cortante na sua borda inferior ($\pm 10 \text{ mm}^2$). No procedimento cirúrgico para retirada da pele, tecido subcutâneo, panículo carnoso e fáscia, utilizou-se tesoura reta de íris e pinça de Adson.

Após a cirurgia, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo I (controle: hidrogel-base); Grupo II (EHTc 5%: Formulação do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* na concentração de 5%); Grupo III (EHTc 10%: Formulação do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* na concentração de 10%) e Grupo IV (padrão: Dersani®) em todos os grupos os respectivos produtos foram aplicados ($\pm 95 \text{ mg}$) diariamente, durante 3, 7 e 14 dias, utilizando espátula metálica. Ao final do tratamento, os animais receberam uma superdose de anestésico e suas feridas foram fotografadas para análise do percentual de contração e em seguida foram removidas para análise histopatológica.

3.2.9.1 Análise macroscópica do fechamento da lesão

As fotografias foram utilizadas para avaliar a contração das feridas tratadas com os diferentes produtos, as mesmas foram medidas utilizando o programa *ImageJ pro 6.1*. O grau de contração foi mensurado utilizando a seguinte equação proposta por Ramsey *et al.* (1995): % de contração = $[(W_0 - W_i) / (W_0)] \times 100$, onde W_0 é a área inicial da ferida e W_i é a área final da ferida. As feridas foram avaliadas também quanto à presença de exsudato e edema, formação de crosta e início da reepitelização.

3.2.9.2 Análise histopatológica

As feridas removidas dos animais foram fixadas em formalina tamponada a 10% por um período de 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram desidratadas a variadas concentrações de etanol, clareadas com xanol e embebidas em parafina. O corte do material emblocado foi realizado em micrótomo, ajustado para 5 μm de espessura. As lâminas montadas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas para secagem e coradas com hematoxilina/eosina (HE). As análises foram realizadas no microscópio óptico Olympus BX-50 (aumento de 40x) e as fotografias digitalizadas pelo programa DP2-BSW.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTO DO EHTC

Após a preparação do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* L. foi possível calcular o rendimento de 23% do extrato (Tabela 2).

Tabela 2 - Relação das massas e rendimento do extrato de *Terminalia catappa*.

<i>Terminalia catappa</i>	EHTC
Massa das folhas (g)	180
Massa do extrato liofilizado (g)	41,5
Rendimento (%)	23

Fonte: A autora (2021).

Os solventes possuem influência significativa em relação aos compostos extraídos da planta. Extrações utilizando-se de solventes polares apresentam maiores teores de compostos como flavonoides, taninos, saponinas, ácidos triterpênicos e carboidratos. Já extrações com solventes apolares como o hexano, contêm mais esteroides e terpenos (CECHINEL; YUNES, 1998).

A mistura polar etanol: água 70:30 (v/v), utilizada neste trabalho, possibilitou a extração de maior quantidade de compostos vegetais da amostra, assim o rendimento do extrato é devido à predominância dos compostos polares em *T. catappa*. A confirmação desse fato foi constatada após análises cromatográficas do extrato obtido.

4.2 PERFIL FITOQUÍMICO DO EHTC

4.2.1 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

O estudo do perfil fitoquímico tem por objetivo a detecção preliminar dos diferentes constituintes químicos das plantas, através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada

classe de substâncias analisadas (SIMÕES *et al.*, 2004), além de ser uma técnica rápida e de baixo custo (ARAÚJO *et al.*, 2010).

Por meio da análise fitoquímica preliminar, foi possível identificar as classes de metabólitos secundários de interesse farmacológico presentes no extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa*, tais como os taninos hidrolisáveis, alcaloides, flavonoides, triterpenos e esteroides (Tabela 3).

Tabela 3 - Classes de metabólitos secundários encontrados no EHTc.

Classes de metabólitos secundários	EHTc
Taninos condensados	-
Taninos hidrolisáveis	+++
Alcaloides	+
Flavonoides	++
Triterpenos e esteroides	+
Cumarinas	-

Fonte: A autora (2021). (-) não detectável; (+) fraco; (++) médio; (+++) forte.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com as classes de metabólitos encontradas no trabalho de Krishnaveni *et al.* (2015), que comprovaram a presença de taninos, flavonoides, alcaloides, terpenoides e esteroides no extrato aquoso das folhas *T. catappa*.

4.2.2 Caracterização de compostos por UPLC- DAD- QTOF MS

A cromatografia líquida de ultra-desempenho acoplada à espectrometria de massa (UPLC/QTOF MS) foi utilizada para caracterizar os compostos secundários presentes no EHTc. 26 compostos foram identificados (Figura 6) e as vias de fragmentação foram analisadas para facilitar a identificação estrutural. Foram obtidas informações essenciais para cada composto, incluindo o tempo de retenção (Tr), os espectros UV/vis e o modo de ionização na polaridade negativa, como evidenciados na Tabela 4.

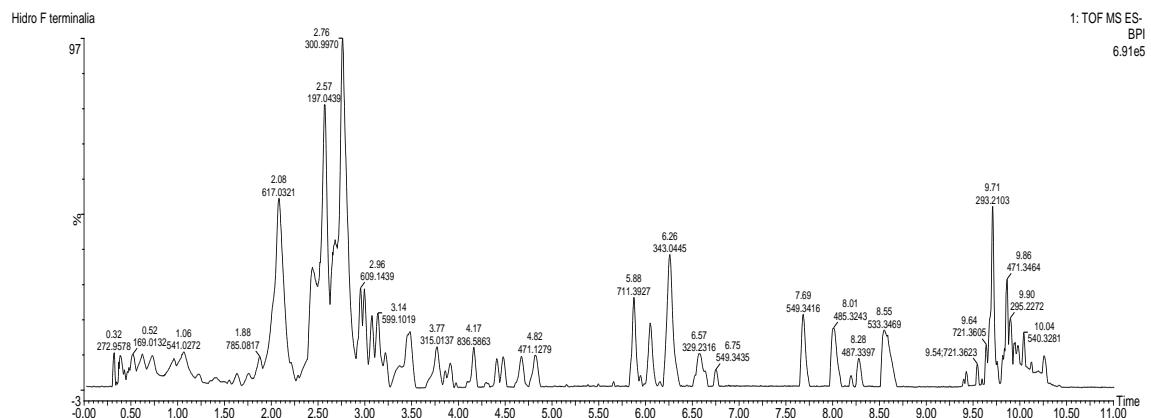
Os taninos hidrolisáveis são os compostos majoritários, num total de 16, onde 2 são unidades estruturais dos taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico), 1

galotanino (ácido metil-flavogalônico) e 13 são elagitaninos (corilagina, punicalina, castalagina, punicalagina isômero I e II, terflavina A isômero I, II e III, telimagrandina I, geraniina isômero I e II, ácido diacetil-rhamnosil-O-metil elágico e ácido dimetil elágico).

Oito compostos identificados pertencem à classe dos flavonoides: robinetina-O-rutinosídeo, canferol-O-rhamnosídeo, herbacetina-O-glucosídeo, orientina-O-galato, vitexina-O-galato, isorhamnetina, luteolina e herbacetina-O-acetato, e 2 são triterpenos (ácido arjunólico e arjungenina).

Os compostos citados acima já foram relatados no gênero *Terminalia* e na espécie *Terminalia catappa*, e, por meio deste trabalho, suas presenças foram comprovadas nas folhas de *T. catappa*.

Figura 6 - Cromatograma UPLC-DAD/MS do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa*.



Fonte: A autora (2021).

Tabela 4 - Dados de espectrometria de massa dos principais constituintes identificados no extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa*.

Pico	Composto Identificado	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx}}$	[M-H] ⁻ experimental	[M-H] ⁻ calculado	Peso molecular (g/mol)	Fórmula molecular	Referências
1	Corilagina	0.39	376	633.0726	633.0733	634.5	$C_{27}H_{22}O_{18}$	Chang et al. (2019)
2	Punicalina	0.48	377	781.0515	781.0530	782.5	$C_{34}H_{22}O_{22}$	Chang et al. (2019)
3	Ácido gálico	0.52	377	169.0132	169.0142	170.1	$C_7H_6O_5$	Abiodun et al. (2016)
4	Castalagina	0.62	376	933.0580	933.0640	934.6	$C_{41}H_{26}O_{26}$	Chang et al. (2019)

5	Punicalagina isômero I	0.73	376	1083.0530	1083.0593	1084.7	C ₄₈ H ₂₈ O ₃₀	Kaneria (2018) et al.
6	Punicalagina isômero II	1.06	378	1083.0522	1083.0593	1084.7	C ₄₈ H ₂₈ O ₃₀	Kaneria (2018) et al.
7	Terflavina A isômero I	1.23	376	1085.0710	1085.0749	1086.7	C ₄₈ H ₃₀ O ₃₀	Chang (2019) et al.
8	Terflavina A isômero II	1.41	376	1085.0702	1085.0749	1086.7	C ₄₈ H ₃₀ O ₃₀	Chang (2019) et al.
9	Terflavina A isômero III	1.63	376	1085.0669	1085.0749	1086.7	C ₄₈ H ₃₀ O ₃₀	Chang (2019) et al.
10	Telimagrandina I	1.88	376	785.0817	785.0843	786.6	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂	Chang (2019) et al.
11	Geraniina isômero I	2.44	376	951.0706	951.0745	952.6	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	Chang (2019) et al.
12	Geraniina isômero II	2.57	376	951.0698	951.0745	952.6	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	Chang (2019) et al.
13	Ácido elágico	2.76	368	300.9970	300.9990	301.9	C ₁₄ H ₆ O ₈	Chandrasekhar et al. (2017)
14	Robinetina -O-rutinosídeo	2.96	348	609.1439	609.1461	610.5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Kaneria et al. (2018)
15	Canferol -O-rhamnosídeo	3.00	358	431.0971	431.0984	432.4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Singh et al. (2016)
16	Herbacetina - O-glucosídeo	3.08	350	463.0874	463.0882	464.4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Kaneria et al. (2018)
17	Orientina -O-galato	3.14	350	599.1019	599.1042	600.5	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅	Kaneria et al. (2018)
18	Vitexina -O-galato	3.48	~394	583.1072	583.1093	584.5	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₄	Terças et al. (2017)
19	Isorhamnetina	3.77	360	315.0137	315.0026	316.3	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	Venkatalakshmi, Vadivel e Brindha (2016)
20	Ácido arjunólico	4.30	-----	487.1253	487.1398	488.7	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	Ichôron, Anyiin e Tor-Igoli (2018)
21	Ácido-diacetil-rhamnosil-O-metil elágico	4.48	~368	545.2009	545.0937	546.4	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₄	Singh et al. (2016)
22	Luteolina	4.68	~386	285.0395	285.0405	286.2	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Singh et al. (2016)
23	Ácido metil-flavogalânico	4.82	~377	471.1279	471.1264	472.1	C ₂₂ H ₁₆ O ₁₂	Chandrasekhar et al. (2017)
24	Herbacetina - O-acetato	6.26	375	343.0445	343.0459	344.3	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	Kaneria et al. (2018)
25	Ácido elágico dimetil	6.57	~368	329.2316	329.2333	330.2	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	Zhou et al. (2020)
26	Arjungenina	6.75	-----	503.3357	503.3378	504.7	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	Zhou et al. (2020)

Fonte: A autora (2021).

O composto correspondente ao **pico 1** ($Tr= 0,39$ min) apresentou absorção máxima no espectro UV-Vis de 376 nm e $[M - H]^-$ em 633 m/z, sendo identificado como corilagina. O **pico 2** ($Tr= 0,48$ min) foi identificado como punicalina com $[M - H]^-$ em 781 m/z e absorção máxima em 377 nm. O **pico 3** ($Tr= 0,52$ min) foi identificado como ácido gálico com $[M - H]^-$ em 169 m/z. O **pico 4** ($Tr= 0,62$ min) é a castalagina com $[M - H]^-$ em 933 m/z e absorção máxima em 376 nm. O **pico 5** ($Tr= 0,73$ min) e **6** ($Tr= 1,06$ min) com $[M - H]^-$ em 1083 m/z são isômeros da punicalagina, uma vez que apresentam o mesmo valor de massa negativa em diferentes tempos de retenção. O **pico 7** ($Tr= 1,23$ min), **8** ($Tr= 1,41$ min) e **9** ($Tr= 1,63$ min) com $[M - H]^-$ em 1085 m/z são os isômeros da terflavina A. O **pico 10** ($Tr= 1,88$ min) é a telimagrandina I com $[M - H]^-$ em 785 m/z e absorção máxima em 376 nm. Os **picos 11** ($Tr= 2,44$ min) e **12** ($Tr= 2,57$ min) são isômeros da geraniina com $[M - H]^-$ em 951 m/z. O **pico 13** ($Tr= 2,76$ min) é o ácido elágico com $[M - H]^-$ em 300 m/z e absorção máxima em 368 nm. O **pico 21** ($Tr= 4,48$ min) é o ácido diacetil-rhamnosil-O-metil elágico com $[M - H]^-$ em 545 m/z e absorção máxima de aproximadamente 368 nm. O **pico 23** ($Tr= 4,82$ min) é o ácido metil-flavogalônico com $[M - H]^-$ em 471 m/z e absorção máxima de aproximadamente 377 nm. O **pico 25** ($Tr= 6,57$ min) é o ácido dimetil elágico com $[M - H]^-$ em 329 m/z e absorção máxima de aproximadamente 368 nm. Este composto já foi identificado em outras espécies como *Terminalia bellerica* e *Terminalia chebula* (ZHOU *et al.*, 2020), no entanto, o presente estudo relata pela primeira vez a presença do ácido dimetil elágico em *Terminalia catappa*.

Os taninos hidrolisáveis citados acima, como a punicalagina, punicalina e a terflavina A apresentam propriedade cicatrizante (NEMA; ARJARIYA; TIWARI, 2013). A telimagrandina I (AL-SAYED; ESMAT, 2016), corilagina (CARVALHO *et al.*, 2013), punicalina e punicalagina (LIN *et al.*, 2001), ácido gálico e elágico (ANNEGOWDA *et al.*, 2010) apresentam propriedade antioxidante, podendo auxiliar no tratamento de uma variedade de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (ROLEIRA *et al.*, 2015).

Punicalagina e punicalina (ARJARIYA; NEMA; TIWARI, 2013), geraniina (ALCHÉ *et al.*, 2002), corilagina (LI *et al.*, 2018) e ácido gálico (CHANWITHEESUK *et al.*, 2007) apresentam propriedade antimicrobiana. Além disso, experimentos com

a punicalagina e punicalina (LIN; HSU; LIN, 1999) e geraniina (ALCHÉ *et al.*, 2002) demonstraram marcante atividade anti-inflamatória.

O **pico 14** ($Tr= 2,96$ min) é a robinetina-O-rutinosídeo com $[M - H]^-$ em 609 m/z e absorção máxima em 348 nm. O **pico 15** ($Tr= 3,00$ min) é o canferol-O-rhamnosídeo com $[M - H]^-$ em 609 m/z e absorção no espectro UV de 358 nm. O **pico 16** ($Tr= 3,08$ min) com $[M - H]^-$ em 463 m/z, foi identificado pela primeira vez na *T. catappa*. A molécula desprotonada foi detectada em 302 m/z com um fragmento em 162 m/z, caracterizando a herbacetina-O-glucosídeo. Essa identificação foi confirmada através de Kaneria *et al.* (2018) que constatou o composto herbacetina nas cascas de *T. catappa*. O **pico 17** ($Tr= 3,14$ min) é a orientina -O-galato com $[M - H]^-$ em 599 m/z. O **pico 18** ($Tr= 3,48$ min) é a vitexina -O-galato com $[M - H]^-$ em 583 m/z e absorção máxima de aproximadamente 394 nm. O **pico 19** ($Tr= 3,77$ min) é a isorhamnetina com $[M - H]^-$ em 315 m/z e absorção máxima em 360 nm. O **pico 22** ($Tr= 4,68$ min) é a luteolina com $[M - H]^-$ em 285 m/z e absorção máxima de aproximadamente 386 nm. O **pico 24** ($Tr= 6,26$ min) é a herbacetina-O-acetato com $[M - H]^-$ em 343 m/z e absorção máxima de 375 nm.

Os flavonoides citados acima, como a isorhamnetina, apresentam potencial antioxidante e efeito anti-inflamatório, a partir da inibição da expressão da COX-2 (SEO *et al.*, 2016). A vitexina possui atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (KIM *et al.*, 2005). O canferol apresenta variadas atividades farmacológicas, entre elas, antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral e antifúngica (ZHANG *et al.*, 2015; ILK; SAGLAM; ÖZGEN, 2016). A robinetina apresenta potente atividade antioxidante, como sequestrador do ânion superóxido (HIDEKI *et al.*, 1995). A herbacetina e seus derivados têm atividade antibacteriana, em especial sobre *Pseudomonas aeruginosa* (CAMPOS *et al.*, 2010). Luteolina e orientina apresentam forte potencial no tratamento de doenças inflamatórias, além de apresentar propriedade antioxidante (PRAVEENA, 2014).

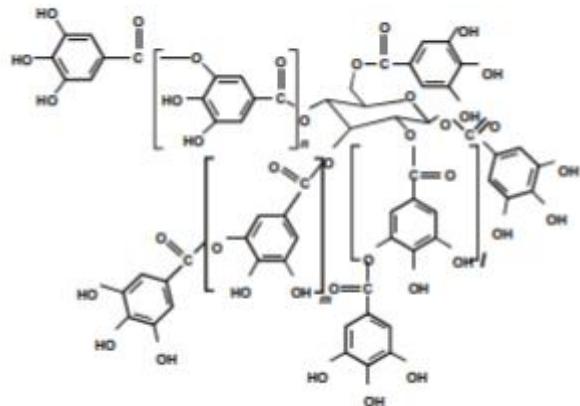
O **pico 20** ($Tr= 4,30$ min) é o ácido arjunólico com $[M - H]^-$ em 487 m/z. O **pico 26** ($Tr= 6,75$ min) é a arjungenina com $[M - H]^-$ em 503 m/z, já identificada em outros trabalhos com espécies do gênero *Terminalia* (ZHOU *et al.*, 2020), no entanto, o presente estudo relata pela primeira vez a presença desse composto na espécie *Terminalia catappa*.

Os triterpenos citados acima, como a arjungenina, apresentam como principal efeito a capacidade antibacteriana (SINGH *et al.*, 2014). O ácido arjunólico,

apresenta propriedades anti-inflamatória (SANTOS *et al.*, 2010) e antioxidante (MAU; KO; CHYAU, 2003).

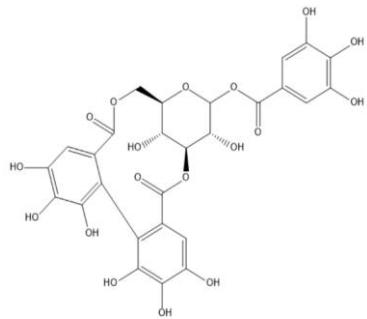
As estruturas moleculares dos compostos caracterizados na análise por UPLC/QTOF MS foram desenhadas no programa *ChemDraw*. De acordo com as diferenças estruturais, os taninos podem ser classificados como taninos hidrolisáveis, taninos condensados ou taninos complexos. Os taninos hidrolisáveis (Figura 7) são constituídos por um núcleo poliol (geralmente glicose), multiesterificados com ácido gálico ou seus derivados. Suas ligações ésteres são prontamente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas, formando os galotaninos (provenientes do ácido gálico) e os elagitaninos (provenientes do ácido elágico) (HAGERMAN, 1987).

Figura 7 - Estrutura básica dos taninos hidrolisáveis.

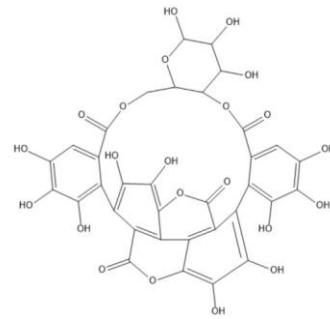


Fonte: NAKAMURA; TSUJI; TONOGAI, 2003.

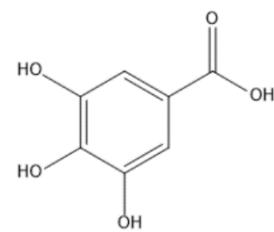
Os compostos 1-13, 21, 23 e 25, identificados neste trabalho, são taninos hidrolisáveis; 3 e 13 são as unidades estruturais dos taninos hidrolisáveis; 1, 2, 4, 5, 7, 10, 11, 21 e 25 são elagitaninos. O 23 é o galotanino.



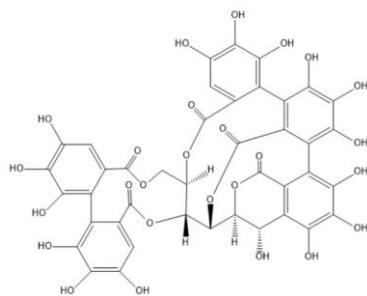
(1) Corilagina



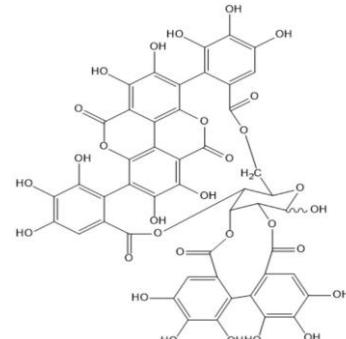
(2) Punicalina



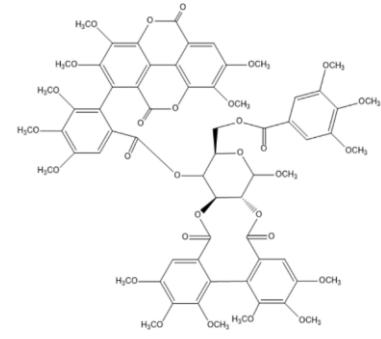
(3) Ácido gálico



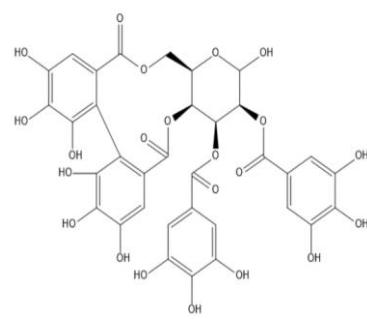
(4) Castalagina



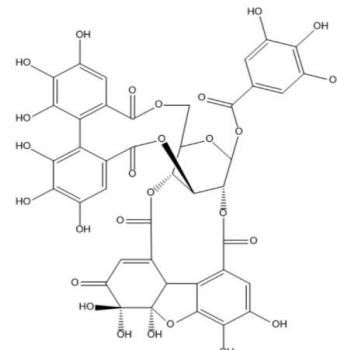
(5) Punicalagina



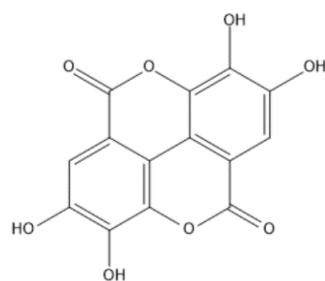
(7) Terflavina A



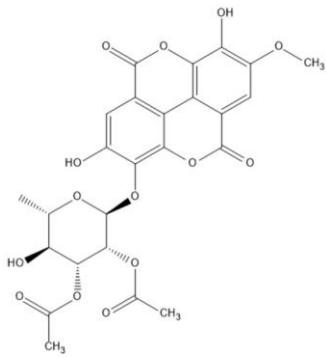
(10) Telimagrandina I



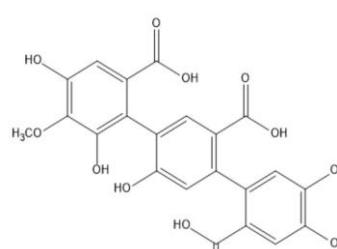
(11) Geraniina



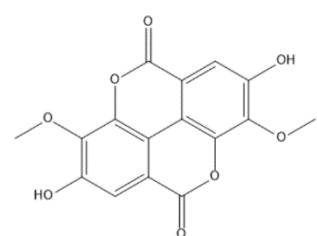
(13) Ácido elágico



(21) Ácido diacetil rhamnosil O- metil elágico



(23) Ácido metil-flavogalônico

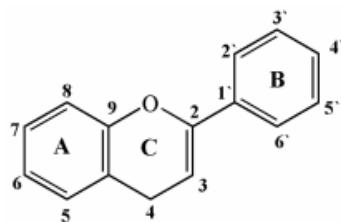


(25) Ácido dimetil elágico

Fonte: A autora (2021).

Os flavonoides apresentam uma estrutura básica (Figura 8) que consiste de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis denominados A, C e B (MARAIS *et al.*, 2006). Os anéis aromáticos A e B estão ligados a um anel heterocíclico C, o qual se apresenta sob diferentes estados de oxidação, em especial entre as posições 2 e 3 (SIMÕES *et al.*, 2007).

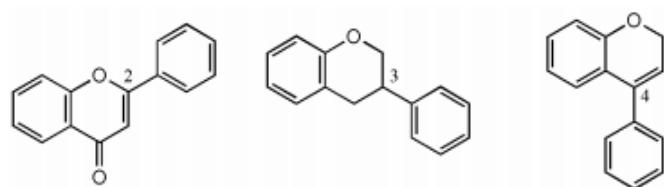
Figura 8 - Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002.

Conforme a posição da ligação do anel aromático B ao anel heterocíclico C, os flavonoides podem ser classificados de três formas distintas (STOBIECKI; KACHLICKI, 2006). Segundo a nomenclatura da IUPAC, os que derivaram de 2-fenilcrom-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirano), são classificados de flavonoides (9A), os que derivaram de 3-fenilcromon-4-ona (3-fenil-1,4-benzopirano) de isoflavonoides (9B) e os que derivaram de 4-fenilcumarina (4-fenil-1,2-benzopirano) de neoflavonoides (9C) (DIXON; PASINETTI, 2010).

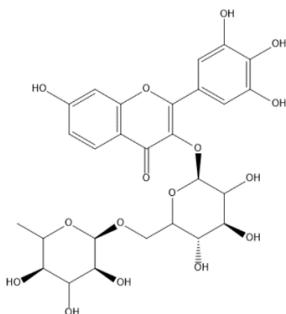
Figura 9 - Estrutura dos núcleos A, B e C, respectivamente.



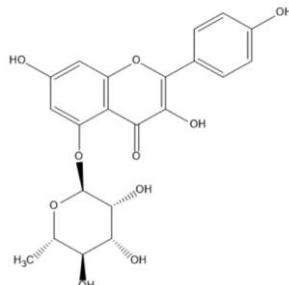
Fonte: IUPAC (2012).

De acordo com o grau de oxidação e insaturação do anel C, os flavonoides podem ser subdivididos em grupos de: flavonas, flavonois, flavanonas, flavanois e antocianinas (MARAIS *et al.*, 2006). Os compostos 15, 16, 18, 19 e 24, identificados

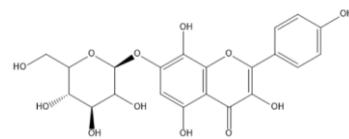
nesta pesquisa, são flavonoides do grupo flavonoides, os compostos 17 e 22 pertencem ao grupo das flavonas e o composto 14 ao grupo flavanol.



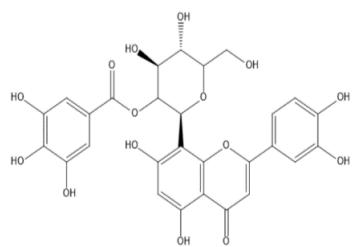
(14) Robinetina-O-rutinosídeo



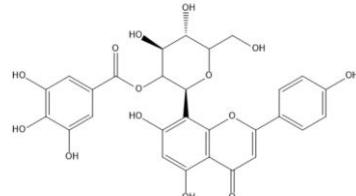
(15) Canferol-O-rhamnosídeo



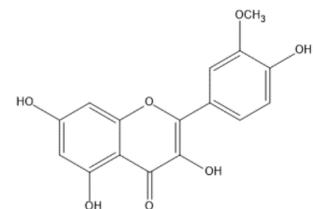
(16) Herbacetina-O-glucosídeo



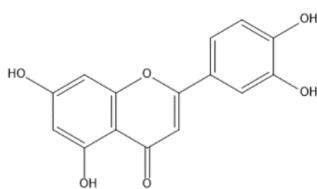
(17) Orientina -O-galato



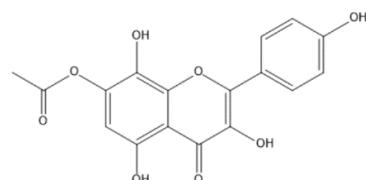
(18) Vitexina -O-galato



(19) Isorhamnetina



(22) Luteolina

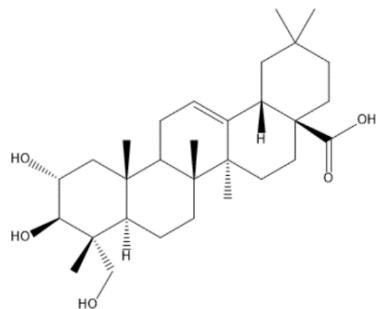


(24) Herbacetina-O-acetato

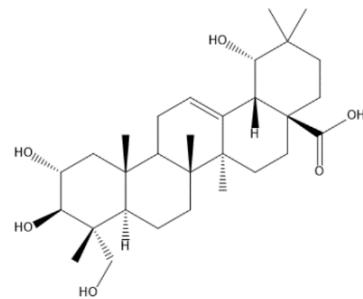
Fonte: A autora (2021).

Os terpenos são formados a partir de duas vias de biossíntese: a via do mevalonato, responsável pela formação dos sesquiterpenos (C15) e triterpenos (C30) e a via alternativa, conhecida como via do metileritritol fosfato (MEP), que origina os monoterpenos (C10), diterpenos (C20) e tetraterpenos (C40) (VERPOORTE, 2000).

Os compostos 20 e 26 apresentam estrutura pentacíclica com 30 carbonos, sendo assim classificados como triterpenos.



(20) Ácido arjunólico



(26) Arjungenina

Fonte: A autora (2021).

4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS, TANINOS TOTAIS E FLAVONOÍDES NO EHTC

O extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* apresentou teor de fenóis totais (3,79 g EAG/ g), taninos totais (2,16 g EAT/ g) e flavonoides (2,34 g EQ/ g), de acordo com o apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Doseamento de fenóis totais, taninos totais e flavonoides do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa*.

Classes de compostos	Teores (Média ± D.P.)
Fenóis totais (g EAG/ g)	3,79 ± 0,08
Taninos totais (g EAT/ g)	2,16 ± 0,31
Flavonoides (g EQ/ g)	2,34 ± 0,02

Fonte: A autora (2021). g EAG/g = gramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato; g EAT/g = gramas equivalentes de ácido tântico por grama de extrato; g EQ/g = gramas equivalentes de quercetina por grama de extrato.

Os dados quantitativos desta pesquisa indicaram altos teores de compostos fenólicos, em especial, taninos e flavonoides nas folhas de *T. catappa*. Corroborando os nossos resultados, Pandya *et al.* (2013) realizaram a quantificação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu e observaram a presença de 354,02 mg EAG/g para fenóis totais e 51,67 mg EQ/g de flavonoides no extrato etanólico das folhas de

T. catappa. Rajesh *et al.* (2015) determinaram o conteúdo de taninos totais do extrato metanólico (50,46 mg EAT/g) das folhas de *T. catappa* utilizando o método de Folin-Ciocalteu e o ácido tânicoo como padrão.

A afinidade dos compostos fenólicos pelos solventes polares melhora sua extração, pois a maioria dos compostos fenólicos não é encontrada na natureza no seu estado livre, mas sob forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005).

Os compostos fenólicos que possuem um ou mais grupos hidroxilas ligados a um anel aromático destacam-se de outras classes de metabólitos secundários porque são amplamente distribuídos e possuem inúmeras atividades farmacológicas, cientificamente comprovadas, sendo bem representadas por taninos e flavonoides (AMORIM *et al.*, 2008).

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO EHTC

Estudos demonstram que não existe um ensaio único capaz de avaliar o potencial antioxidante de forma quantitativa e com precisão (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005), sendo essencial o uso de no mínimo dois métodos (SCHLESIER *et al.*, 2002). Portanto, a atividade de eliminação de radicais livres DPPH, atividade de eliminação de radicais livres ABTS e atividade antioxidante total (AAT) foram realizadas para determinar a capacidade antioxidante do EHTc, como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* pelos métodos DPPH, ABTS e AAT.

Extrato/Padrões	DPPH ⁺	ABTS ⁺	AAT
	Cl ₅₀ (µg/mL)	Cl ₅₀ (µg/mL)	Cl ₅₀ (µg/mL)
EHTc	42,30 ± 3,56	407,10 ± 9,99	2.209,98 ± 206,92
Trolox®	28,13 ± 0,11	214,00 ± 5,00	N.A.
Ácido ascórbico	N.T.	N.T.	500,00 ± 0,00

Fonte: A autora (2021). Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. EHTc: Extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa*; DPPH: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ABTS:

Radical 2,2-azobis- (3-etylbenzotiazolina-6-sulfonato); AAT: atividade antioxidant total; N.A. – Não Aplicável; N.T. – Não Testado.

O método de eliminação dos radicais livres DPPH é amplamente utilizado por ser um procedimento simples, rápido, sensível e reproduzível. O radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) de coloração violeta, quando entra em contato com substâncias antioxidantes capazes de doar elétrons para o radical, é neutralizado em 2,2-difenil-1-picrilhidrazina e muda de cor para o amarelo (ZOU; LU; WEI, 2004). O resultado é expresso em Cl_{50} que determina a concentração da amostra capaz de neutralizar 50% da concentração inicial de DPPH, e quanto menor o valor da Cl_{50} , maior é a sua capacidade antioxidante. No ensaio de eliminação dos radicais livres DPPH, o EHTc apresentou Cl_{50} (42,30 $\mu\text{g/mL}$) próxima aos valores do padrão Trolox® (Cl_{50} = 28,13 $\mu\text{g/mL}$).

O ensaio de eliminação do radical ABTS é frequentemente utilizado para avaliar a capacidade anti-radicalar de antioxidantes de natureza hidrofílica e lipofílica, pois pode ser usado tanto para sistemas de solventes orgânicos como sistemas aquosos. Este método consiste na formação do cátion radical livre ABTS^{•+}, por meio da reação de oxidação do 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) com o persulfato de potássio, e sua neutralização na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio é medida espectrofotometricamente a 734 nm, quando é convertido para uma forma não radical (RAKHOLIYA *et al.*, 2011). Neste ensaio, o EHTc apresentou Cl_{50} (407,10 $\mu\text{g/mL}$) capaz de neutralizar os radicais livres ABTS^{•+} próxima ao padrão Trolox® (Cl_{50} de 214,00 $\mu\text{g/mL}$).

A formação do complexo fosfomolibdênico determina a atividade antioxidant total (AAT) de uma amostra frente a uma reação de óxido-redução. Este método se fundamenta na redução do molibdênio⁺⁶ a molibdênio⁺⁵ na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante com formação de um complexo fosfato/molibdênio⁺⁵ esverdeado (ZENGİN *et al.*, 2014). No teste de redução do molibdênio⁺⁶, o EHTc apresentou Cl_{50} (2.209,98 $\mu\text{g/mL}$) relativamente alta em relação ao padrão ácido ascórbico (Cl_{50} de 500,00 $\mu\text{g/mL}$).

O extrato desempenhou melhor atividade nos ensaios de eliminação dos radicais DPPH e ABTS, possivelmente atuando mais por neutralização do que por redução do radical livre. Alguns estudos relatados anteriormente comprovam os nossos resultados, um exemplo é o estudo de Chanda *et al.* (2013) no qual

investigaram a atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas de *T. catappa* por meio do teste de remoção de radicais livres DPPH e observaram uma IC_{50} de 23 $\mu\text{g/mL}$, próxima ao padrão ácido ascórbico (IC_{50} de 11,4 $\mu\text{g/mL}$) utilizado. Quanto à remoção de radicais livres ABTS, o extrato metanólico das folhas de *T. catappa* apresentou uma IC_{50} de 8,25 $\mu\text{g/mL}$ também próxima ao padrão ácido ascórbico (IC_{50} de 6,25 $\mu\text{g/mL}$), revelando um potencial antioxidante promissor da *T. catappa*.

Krishnaveni *et al.* (2015), utilizando o teste do fosfomolibdênio para determinação da atividade antioxidante total (AAT), observou que o extrato aquoso das folhas de *T. catappa* apresentou uma IC_{50} de 256,66 mg/g equivalentes de ácido ascórbico, desempenhando considerável atividade antioxidante por este método.

Sabe-se que os tecidos lesados e inflamados produzem grandes quantidades de radicais livres, em decorrência da ação do sistema imunológico, para destruir corpos estranhos e células infectadas por bactérias ou vírus (BEDARD; KRAUSE, 2007). Quando a taxa de produção de radicais livres ultrapassa a taxa de remoção pelos antioxidantes naturais do sistema de defesa celular, há um desequilíbrio e, consequentemente, ocorre o estresse oxidativo, proporcionando a peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas, inativação enzimática e danos graves ao DNA celular (BERRA; MENCK, 2006).

Existe uma relação entre os teores de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante em diversas espécies de plantas. Por exemplo, os flavonoides podem agir por captura e neutralização das espécies oxidantes como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ou peróxido e, ainda, atuar por sinergismo com outros antioxidantes como as vitaminas C e E (SIMÕES; ALMEIDA, 2015) e os taninos atuam como captadores de radicais livres e interceptam o oxigênio ativo, formando radicais estáveis (MELLO; SANTOS, 2001), o que justifica a atividade antioxidante das folhas de *T. catappa* pelos três métodos empregados nesse estudo.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DO EHTC

4.5.1 Avaliação da atividade hemolítica

No estudo biológico e toxicológico de extratos vegetais, existe a necessidade da verificação do potencial hemolítico das espécies analisadas, uma vez que a lise das hemácias permite a liberação de ferro do grupamento heme, proveniente da

hemoglobina livre no plasma, podendo ocasionar danos em órgãos vitais, como fígado e rins (BEDNARCZUK *et al.*, 2010).

Por meio do ensaio hemolítico realizado, verificou-se que o EHTc apresentou CH_{50} superior a 200 $\mu\text{g/mL}$ e, portanto, não foi capaz de induzir hemólise quando comparado ao grupo controle. Esse resultado indica que o extrato de *T. catappa* não apresentou potencial hemolítico sobre os eritrócitos nas concentrações testadas, provavelmente pela baixa quantidade de compostos hemolíticos presentes no extrato, como exemplo as saponinas, dando margem de segurança para sua utilização nos testes *in vivo*.

Os resultados da pesquisa realizada por Wen *et al.* (2011) corroboram os nossos, pois demonstram a capacidade de proteção do extrato hidrofílico das folhas de *T. catappa* sobre os eritrócitos submetidos à hemólise oxidativa *in vitro* induzida pelo 2,2 azobis amidinopropano (AAPH). Assim, é possível associar esta proteção à presença dos compostos fenólicos no extrato, e seu consequente, efeito antioxidante.

4.5.2 Avaliação da viabilidade celular

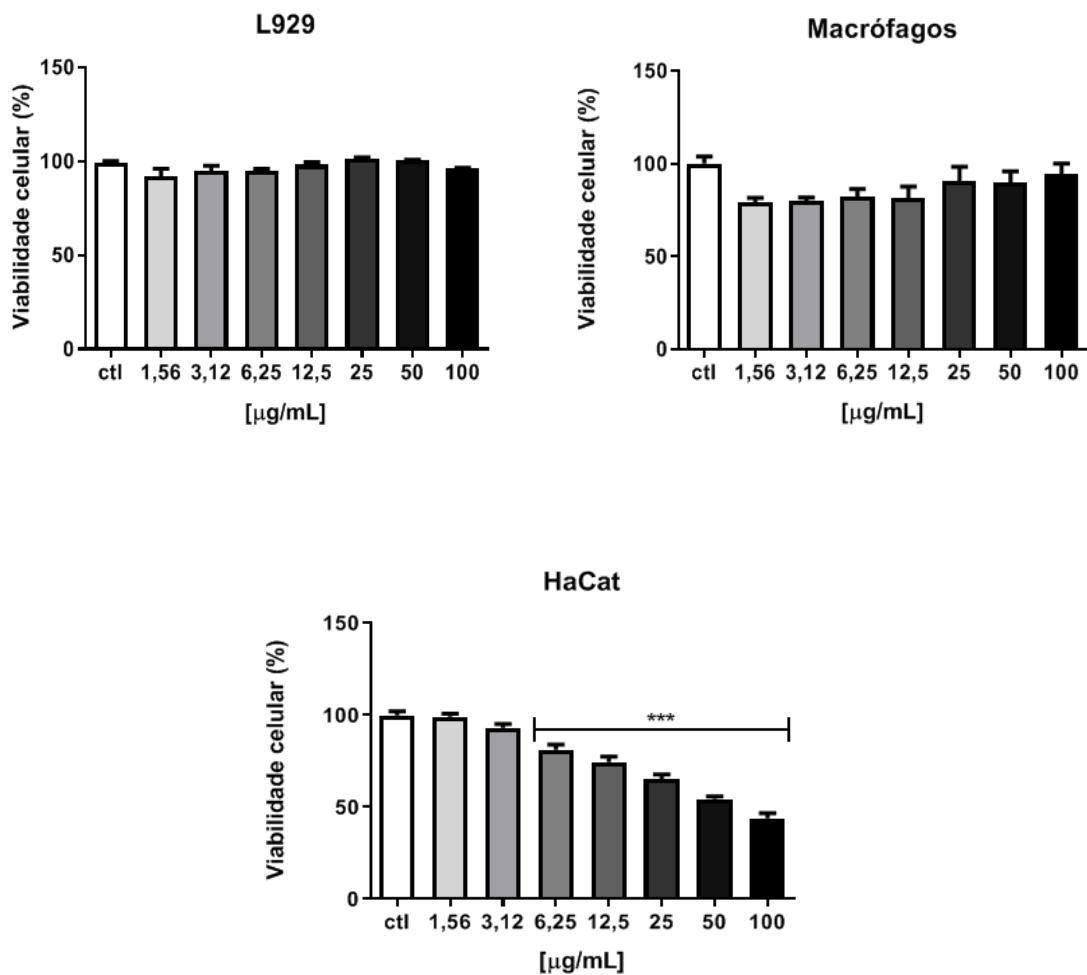
Os testes de toxicidade celular fornecem informações preliminares sobre a segurança dos compostos a serem testados e utilizados terapeuticamente (OSÓRIO *et al.*, 1998). Essas técnicas de bioensaios avaliam e definem a concentração de uma substância capaz de causar morte celular como consequência de danos às funções básicas celulares (RANG *et al.*, 2004; GHOSH *et al.*, 2012).

O efeito citotóxico do extrato hidroalcoólico de *T. catappa* foi investigado através de ensaios de redução do MTT, técnica utilizada por ser um método rápido, econômico e eficaz para avaliar a viabilidade celular de diferentes linhagens, baseando-se em uma reação colorimétrica. Nas células viáveis, a enzima succinato desidrogenase converte o MTT (coloração amarela) em cristais de formazan (coloração púrpura) na mitocôndria, que vai ser quantificado por medição colorimétrica (MOSMANN, 1983).

O extrato não apresentou citotoxicidade significativa frente às linhagens de fibroblastos murinos (L929) e macrófagos peritoneais murinos nas concentrações testadas (1,56 - 100 $\mu\text{g/mL}$). Com relação aos queratinócitos humanos (HaCaT), causou uma redução da viabilidade celular nas concentrações de 6,25 à 100 $\mu\text{g/mL}$

quando comparado ao grupo controle (100% das células viáveis) e desempenhou baixa citotoxicidade por ter apresentado uma $Cl_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$. Estes resultados podem ser observados na Figura 10.

Figura 10 - Avaliação citotóxica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* frente às linhagens L929, macrófagos peritonais murinos e HaCat após 72 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT.



Fonte: A autora (2021). Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** diferença estatisticamente significante ($p < 0,001$) em relação ao controle (ctl).

Huang *et al.* (2018), utilizando o ensaio colorimétrico de MTT para avaliar a capacidade citotóxica do extrato metanólico das folhas de *T. catappa* (5 - 100 $\mu\text{g/mL}$) frente à linhagem de fibroblastos humanos (Hs68), perceberam aumento da proliferação celular em todas as concentrações testadas. Abiodun *et al.* (2016), por meio do ensaio de MTS, observaram que não houve alteração na viabilidade celular

de macrófagos murinos RAW 264.7 frente às diferentes concentrações (5 - 100 µg/mL) do extrato etanólico das cascas de *T. catappa*. Outro estudo realizado por Singh *et al.* (2014), utilizando o extrato metanólico das frutas de *T. chebula* (10 - 100 µg/mL), também concluíram que com o aumento das concentrações do extrato houve uma diminuição gradual da proliferação dos queratinócitos, embora não tenha apresentado citotoxicidade significativa.

De acordo com Martins *et al.* (2009), os macrófagos e os fibroblastos são células fundamentais para a evolução de todo o processo cicatricial. Os macrófagos participam ativamente da fase inflamatória, contribuindo para o desenvolvimento do tecido de granulação, além de fagocitar as bactérias presentes nas feridas. Os fibroblastos têm como função a síntese de elastina, fibronectina, proteases e fibras colágenas, tornando-se encarregados pela remoção do tecido desvitalizado presente nas feridas e o remodelamento total da área lesionada (HILDEBRAND *et al.*, 2005). Por outro lado, os queratinócitos desempenham funções estruturais na epiderme por meio da síntese de queratina, que garante impermeabilidade, elasticidade e resistência a pele, importante no controle homeostático do órgão (ECKERT; EAKS, 1989) e ainda podem interagir com as células do sistema imunológico, participando das respostas imunes e inflamatórias que acometem o tecido epitelial (BARKER, 1998). Dessa forma, por apresentar baixa toxicidade frente às linhagens celulares testadas, o extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* pode facilitar o processo de cicatrização tecidual.

4.6 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

4.6.1 Microdiluição em caldo

O ensaio de microdiluição em caldo utilizado é uma técnica simples, rápida e sensível para pesquisa de novas drogas antimicrobianas, uma vez que várias concentrações do extrato podem ser testadas em um único ensaio (LIBANORE, 2008).

Segundo Aligiannis *et al.* (2001), extratos de plantas que apresentam atividade antimicrobiana com valores de CMI até 500 µg/mL são considerados fortes inibidores. Para valores de CMI entre 600 - 1500 µg/mL, o extrato tem inibição moderada e, quando maior que 1600 µg/mL, é considerado inibidor fraco. Diante do

exposto, o EHTc apresentou inibição moderada frente às bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis* (CMI e CMB de 1024 µg/mL), Gram-negativas *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* (CMI e CMB de 1024 µg/mL) e frente ao fungo *C. albicans*, com CMI de 512 µg/mL e CMB de 1024 µg/mL (Tabela 7).

Tabela 7 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa*.

Microrganismos	CMI	CMB
	(µg/mL)	(µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1024	1024
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1024	1024
<i>Streptococcus pyogenes</i>	>1024	>1024
<i>Enterococcus faecalis</i>	>1024	>1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1024	>1024
<i>Escherichia coli</i>	>1024	>1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1024	1024
<i>Proteus mirabilis</i>	1024	1024
<i>Candida albicans</i>	512	1024

Fonte: A autora (2021).

Ajiboye *et al.* (2016), testaram diferentes concentrações (100, 80, 60, 40 e 20 mg/mL) dos extratos acetato de etila e aquoso das cascas de *T. catappa* e observaram efeito antibacteriano contra isolados de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. O extrato acetato de etila apresentou melhor desempenho com CMI de 80 mg/mL e CMB de 100 mg/mL, enquanto o aquoso, uma CMI de 100 mg/mL e CMB > 100 mg/mL para todos os isolados bacterianos. Estes achados podem ser relacionados à capacidade deste solvente conseguir extrair mais compostos ativos da casca do que no caso o solvente aquoso (MARMONIER, 1990).

O potencial antimicrobiano de *T. catappa* está provavelmente relacionado à presença dos compostos fenólicos como os flavonoides - os quais agem na membrana ou parede celular do microrganismo, causando danos funcionais e estruturais (SCAZZOCCHIO *et al.*, 2005), e os taninos pela formação de um complexo enzimático capaz de inibir a troca de íons essenciais para a sobrevivência microbiana (ANDRADE *et al.*, 2006).

Se um material vegetal em teste para cicatrização cutânea apresentar também atividade antimicrobiana, este pode se tornar uma excelente opção terapêutica, uma vez que a pele lesionada fica exposta à invasão por microrganismos potencialmente patogênicos que podem ocasionar um processo infecioso, sendo a infecção o principal fator responsável por retardar o reparo tecidual (SCHMIDT *et al.*, 2009). Diante do exposto, o uso do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* como componente ativo de uma formulação tópica pode contribuir significativamente no tratamento de feridas.

4.6.2 Inibição e remoção de biofilme

As espécies de *Candida* apresentam notável capacidade de aderência aos tecidos e células do hospedeiro, permitindo a colonização e, consequentemente, a formação de biofilmes, fator preocupante para hospitais e indústrias, uma vez que a presença de biofilme maduro dificulta a ação dos antifúngicos e pode se tornar reservatório de células resistentes às drogas disponíveis. Além disso, as células em biofilmes são capazes de resistir à fagocitose e outros mecanismos de defesa do sistema imunológico do indivíduo (VERSTREPEN; KLIS, 2006; HOIBY *et al.*, 2010).

Para avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* sobre os biofilmes de *Candida* spp., foram inicialmente selecionadas as espécies com maior capacidade em produzir biofilme. Em seguida, foram realizados os ensaios para avaliar a capacidade do extrato em inibir a formação de biofilme e remover o biofilme pré-formado, como apresentado nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8 - Efeito antimicrobiano do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* na inibição da formação dos biofilmes de *Candida* spp.

Microrganismos	EHTc	Fármaco padrão
<i>Candida albicans</i>	55,90% \pm 0,64	78,15% \pm 8,11
<i>Candida parapsilosis</i>	55,92% \pm 2,08	55,58% \pm 10,73
<i>Candida krusei</i>	54,62% \pm 2,17	75,00% \pm 5,62
<i>Candida glabrata</i>	55,87% \pm 1,47	93,09% \pm 1,13
<i>Candida tropicalis</i>	59,22% \pm 0,69	75,97% \pm 1,91

Fonte: A autora (2021). % de inibição da formação de biofilme.

Tabela 9 - Efeito antimicrobiano do extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* na remoção de biofilmes pré-formados de *Candida* spp.

Microrganismos	EHTc	Fármaco padrão
<i>Candida albicans</i>	58,10% \pm 0,38	78,94% \pm 1,95
<i>Candida parapsilosis</i>	53,65% \pm 1,44	45,82% \pm 1,09
<i>Candida krusei</i>	58,07% \pm 0,45	74,75% \pm 0,93
<i>Candida glabrata</i>	57,45% \pm 0,94	93,09% \pm 3,16
<i>Candida tropicalis</i>	55,12% \pm 2,02	74,47% \pm 3,73

Fonte: A autora (2021). % de remoção do biofilme pré-formado.

O extrato apresentou inibição e remoção significativa dos biofilmes em relação ao controle não tratado, o qual foi normalizado para 100% de formação de biofilme. No entanto, foi mais eficaz na inibição da formação dos biofilmes de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, uma vez que a concentração necessária para inibição de $\geq 50\%$ do biofilme foi de 124 $\mu\text{g/mL}$ e 256 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Enquanto que para inibição dos biofilmes de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* e no ensaio de remoção dos biofilmes pré-formados de *Candida* spp., a dose efetiva foi a de 512 $\mu\text{g/mL}$.

Os diferentes graus de hidrofobicidade da superfície celular das espécies de *Candida* avaliadas neste trabalho justificam o maior potencial do EHTc no controle da formação dos biofilmes de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Sabe-se que *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* são mais hidrofóbicas e as espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis* são as menos hidrofóbicas (MIYAKE *et al.*, 1986). No entanto, alguns estudos observaram que a *C. albicans* apresenta a estrutura da membrana celular mais complexa com maior capacidade de adesão e formação de biofilmes (CALDERONE; BRAUN, 1991), em comparação a espécie *C. tropicalis* que apresenta menor capacidade de formação de biofilmes (MINAGI *et al.*, 1985).

Existem poucos estudos sobre as propriedades antifúngicas do gênero *Terminalia* e sobre a atividade anti-*Candida* das folhas de *T. catappa*. Um estudo mais recente de Gonçalves *et al.* (2019), utilizando a fração n-butanol das folhas de *T. catappa*, revelou que a concentração de 2500 $\mu\text{g/mL}$ do extrato reduziu a formação do biofilme de *C. albicans* em relação ao controle, enquanto que para *C.*

glabrata a concentração efetiva foi de 250 µg/mL. Ambas as espécies foram suscetíveis ao extrato, no entanto, o n-butanol por ser uma fração apolar apresentou maior afinidade pelas membranas hidrofóbicas, como é o caso da *C. glabrata* (SILVA *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2018), resultando em maior efeito antifúngico.

A atividade antifúngica das folhas de *T. catappa* pode ser relacionada à sua composição química. Sabe-se que os taninos hidrolisáveis, em especial punicalina e punicalagina, agem na membrana celular dos microrganismos, precipitam suas proteínas e modificam os processos metabólicos vitais (ENDO *et al.*, 2010; ANIBAL *et al.*, 2013). Ácido gálico e flavonoides estão relacionados à inativação de enzimas responsáveis pela adesão celular, considerada pré-requisito para a colonização e estabelecimento de infecção por *Candida* spp. Além disso, eles podem impedir o transporte de proteínas e provocar lises na célula fúngica (KINOSHITA *et al.*, 2007; TERÇAS *et al.*, 2017).

4.7 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO HIDROGEL DE *Terminalia catappa*

Em termos farmacotécnicos, foi possível incorporar o extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* no hidrogel-base de Carbopol®. A não ocorrência de separação de fases foi indicativa de estabilidade das amostras ensaiadas.

No dia do preparo, foram avaliadas as propriedades organolépticas, pH e a viscosidade das formulações desenvolvidas. O hidrogel-base apresentou aspecto homogêneo, incolor, transparente e sem cheiro; e os hidrogéis de EHTc a 5% e 10% apresentaram aspecto homogêneo, coloração esverdeada e odor característico do extrato de *T. catappa* (Quadro 2).

Ao submeter às amostras para medição do pH, obteve-se 5,75; 6,26 e 6,38 unidades para o hidrogel-base, hidrogel de EHTc a 5 e 10%, respectivamente. O pH das formulações encontram-se dentro do intervalo permitido de 5,5 - 6,5, que é a faixa de pH normal da pele (BRASIL, 2004; BRASIL, 2008). A viscosidade para ambas as formulações desenvolvidas foi de 13.300 centPoises, apresentando boa percepção sensorial e fácil espalhabilidade quando testada na superfície da pele.

Quadro 2 - Parâmetros organolépticos, pH e viscosidade das formulações desenvolvidas.

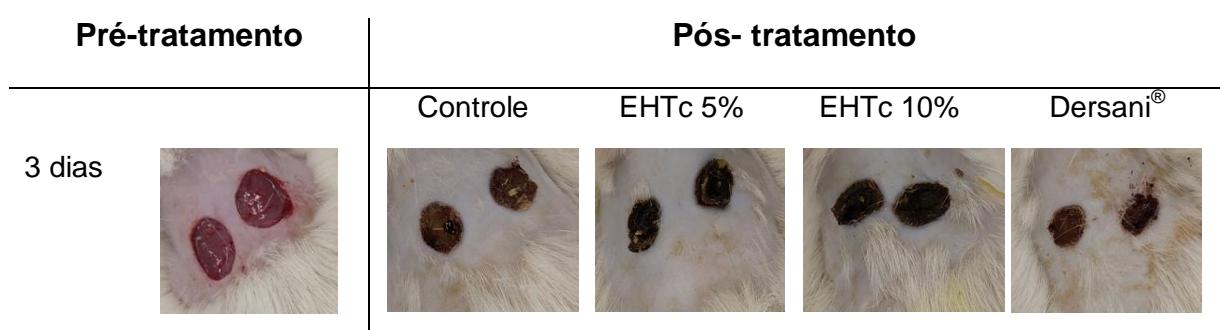
Tipo de formulação	Características organolépticas	pH	Viscosidade
Hidrogel-base	Cor: Incolor Aspecto: Homogêneo Odor: Sem cheiro	5,75	13.300 cP
Hidrogel com o EHTc 5%	Cor: Esverdeada Aspecto: Homogêneo Odor: Característico do extrato de <i>T. catappa</i>	6,26	13.300 cP
Hidrogel com o EHTc 10%	Cor: Esverdeada Aspecto: Homogêneo Odor: Característico do extrato de <i>T. catappa</i>	6,38	13.300 cP

Fonte: A autora (2021).

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EHTC SOBRE LESÕES CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR

O potencial cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* (EHTc) foi analisado por um período de 3, 7 e 14 dias. Ao longo desse período, a evolução das áreas das lesões foi analisada macroscopicamente, indicando uma melhor reepitelização nos grupos tratados com EHTc 5% e Dersani®, quando comparados ao grupo controle (Figura 11).

Figura 11- Aspectos macroscópicos das lesões cutâneas antes do tratamento e após o tratamento com hidrogel-base (controle), EHTc 5%, EHTc 10% e Dersani® durante um período de 3, 7 e 14 dias.





Do 1º ao 3º dia de tratamento com o EHTc 5%, EHTc 10% e Dersani® foi observada a presença de exsudato e pouco edema, enquanto o grupo controle, apresentou exsudato e edema moderado. A presença de exsudação faz parte da fisiologia da fase inflamatória da cicatrização, ocasionada pela vasodilatação (OLIVEIRA *et al.*, 2010). O exsudato contém nutrientes e fatores de crescimento que estimulam o desenvolvimento de células endoteliais e fibroblastos (KATZ *et al.*, 1991).

Com a retirada de um fragmento de pele, constituindo a lesão cutânea, ocorre a formação de uma solução de continuidade que é preenchida por fibrina, coágulo e exsudato inflamatório, dando origem à formação da crosta que vai recobrir a ferida (MARTINS *et al.*, 2006).

No 7º dia, todos os grupos apresentaram crosta, especialmente os grupos tratados com o hidrogel-base e o EHTc 10%, além da ausência de exsudato e edema. O aparecimento de crosta ocorre em razão do contato da lesão tecidual com o ar, promovendo seu ressecamento e desidratação celular e que muitas vezes mascaram o tamanho real da ferida. O papel da crosta é conter a hemorragia na área lesada e liberar mediadores químicos inflamatórios, que por sua vez irão auxiliar no processo de angiogênese (REINKE; SORG, 2012), mas em excesso pode comprometer a contração da ferida e ainda dificultar a absorção do produto pela pele, interferindo na evolução do processo de cicatrização (LIMA, 2010).

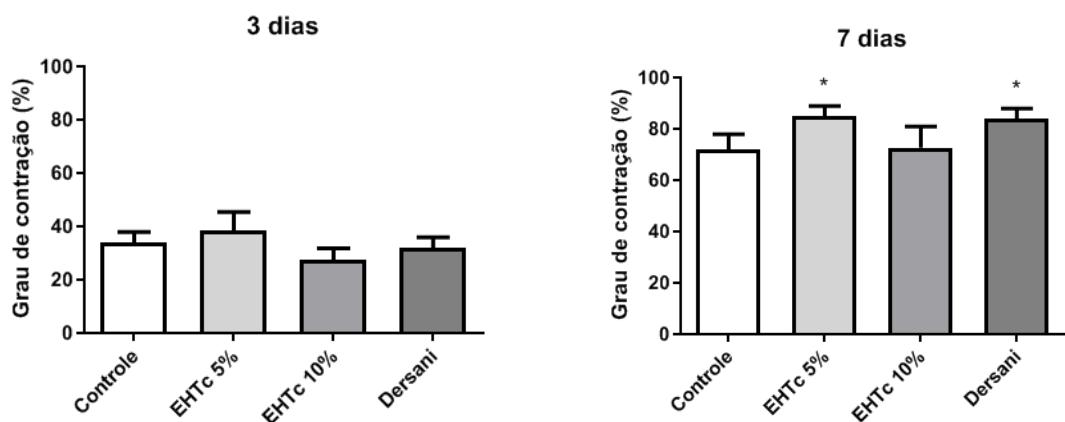
As crostas exuberantes presentes no grupo tratado com o EHTc 10% podem ser atribuídas aos altos níveis de taninos presentes na formulação, uma vez que está mais concentrado do que o EHTc 5%. Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados,

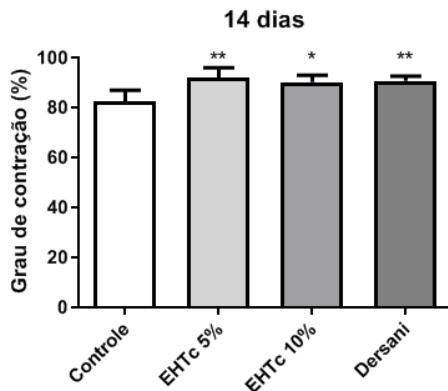
permitindo que, logo abaixo dessa camada, o processo de reparação tecidual ocorra naturalmente (VIEIRA, 2015).

No período entre o 9º e 14º dias, os grupos tratados com Dersani®, EHTc 5% e 10% apresentaram desprendimento da crosta com formação do tecido cicatricial e presença de pelos na área da tricotomia. Enquanto que os animais do grupo controle ainda apresentavam fragmentos de crosta, caracterizando uma lenta formação do tecido cicatricial.

Em relação ao grau de contração das lesões teciduais, no período de 3 dias não foi observado diferença significativa entre os grupos tratados, pois entre 48 a 72 horas as feridas ainda se encontravam na fase inflamatória da cicatrização, sem redução significativa de sua área (MITTAL; SATISH; ANIMA, 2013). Após 7 dias, os grupos tratados com EHTc 5% e Dersani® reduziram significativamente a área das lesões apresentando grau de contração de 84,81% e 83,98%, respectivamente, em comparação ao grupo controle de 72,07%. Ao 14º dia, o grau de contração dos grupos tratados com EHTc 5% (91,83%), EHTc 10% (90,13%) e Dersani® (90,72%) foi significativo em relação ao grupo controle (82,39%), sendo os tratamentos com EHTc 5% e Dersani® os de maiores significância (Figura 12).

Figura 12- Efeito cicatrizante das formulações semi-sólidas contendo o extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* (EHTc) nas concentrações de 5 e 10% sobre lesões cutâneas em ratos Wistar (n=5 animais/grupo).





Fonte: A autora (2021). Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão e a diferença entre grupos foram determinados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

O animal escolhido foi o rato da linhagem Wistar, por possuir cicatrização semelhante aos humanos, sendo todos machos e adultos jovens, com o propósito de evitar interferência de variações hormonais do ciclo das fêmeas no mecanismo cicatrizante (MARTINS *et al.*, 2006).

O modelo de ferida aberta, com cicatrização por segunda intenção, é o modelo de escolha quando se quer saber a influência de substâncias de ação tópica, pois assim as feridas podem ser avaliadas quanto à presença de células inflamatórias, formação de colágeno, grau de reparação e tecido de granulação (COHEN; MAST, 1990).

As lesões cutâneas, principalmente as queimaduras e as úlceras, têm a capacidade de destruir a conservação fluídica normal da pele (WU *et al.*, 1996), sendo assim, os curativos a base de hidrogel mantém o leito da ferida úmido, promovendo o amolecimento e remoção do tecido desvitalizado, auxiliando no reparo tecidual (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

A utilização de fitoderivados tem demonstrado atividades promissoras no processo de reparo das feridas cutâneas, pois os compostos que são isolados de plantas podem atuar em diversas fases da cicatrização, o que possibilita a contração das feridas de forma mais eficaz e ágil em relação a outros fármacos comercializados (NETO *et al.*, 2015). Os taninos, especialmente punicalina e punicalagina, participam ativamente do processo de cura das feridas, auxiliando na formação de uma camada protetora devido à precipitação das proteínas dos tecidos lesionados favorecendo a regeneração tecidual, promovem aumento da

vascularização, bem como auxiliam na contração da ferida, na formação do tecido de granulação e no remodelamento cicatricial (MELLO; SANTOS, 2001; LI *et al.*, 2011). Os flavonoides, por sua vez, auxiliam na cicatrização de feridas devido a seus efeitos terapêuticos como anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

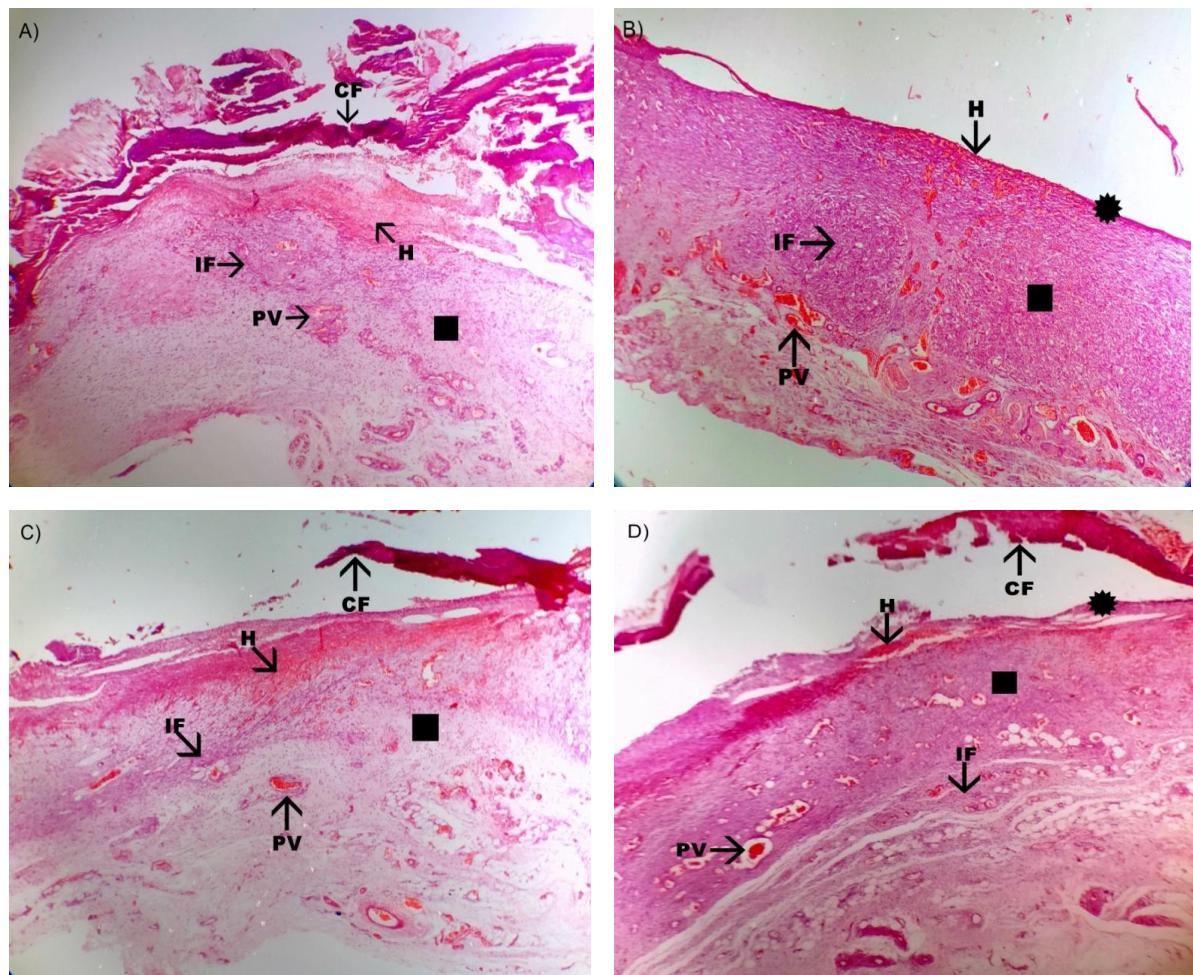
Resultados semelhantes a este trabalho foram encontrados por Khan *et al.* (2014), que afirmam que o tratamento com cremes produzidos a partir do extrato metanólico das cascas de *Terminalia catappa* reduziu em 97% o tamanho da ferida em ratos Wistar comparado a 81% do controle.

No presente estudo, os animais que receberam tratamento com o hidrogel do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa*, principalmente na concentração de 5%, apresentaram redução mais acelerada dos ferimentos quando comparado ao grupo controle. O potencial antioxidante, antimicrobiano e cicatrizante do EHTc pode se relacionar à presença dos compostos fenólicos que somados com as propriedades terapêuticas dos hidrogéis podem auxiliar no reparo tecidual, tornando-se uma alternativa promissora no tratamento de feridas cutâneas uma vez que se trata da planta nativa de nossa flora, de fácil aquisição e de baixo custo.

4.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após o tratamento de 3 dias (Figura 13) com o hidrogel de EHTc 5% e Dersani® foi possível observar: presença moderada de infiltrados inflamatórios, intensa proliferação vascular e consequentemente um quadro de hiperemia, presença de crosta fibrinosa, início da reepitelização e reestruturação da derme com formação do tecido de granulação. O grupo tratado com o hidrogel de EHTc 10% mostrou presença moderada de infiltrados inflamatórios, moderada proliferação vascular, hiperemia, presença de crosta fibrinosa, sem reconstituição do epitélio e reestruturação da derme com formação do tecido de granulação, enquanto o grupo tratado com o hidrogel-base mostrou presença intensa de infiltrados inflamatórios, pouca proliferação vascular, hiperemia, presença de crosta fibrinosa, sem reconstituição do epitélio e a derme não estruturada com formação do tecido de granulação.

Figura 13- Fotomicrografias dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional após 3 dias de tratamento (aumento de 40 X).

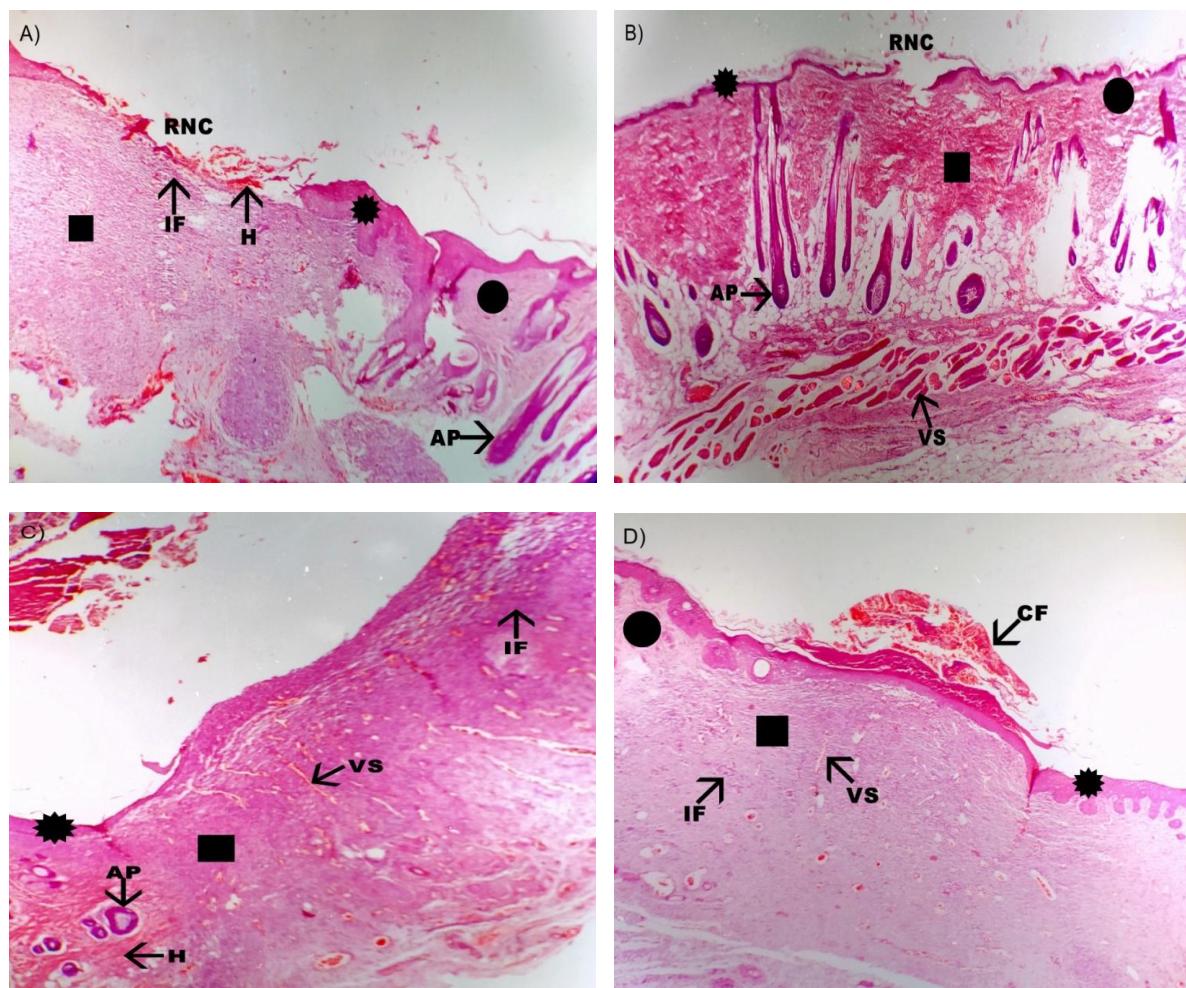


Fonte: A autora (2021). Os grupos são representados por (A) hidrogel-base, (B) EHTc 5%, (C) EHTc 10% e (D) Dersani®. CF: Crosta de Fibrina, IF: Infiltrado inflamatório, H: Hiperemia, PV: Proliferação vascular, Estrela: Formação do epitélio, Quadrado: Tecido de granulação. Coloração H. E.

Após o tratamento de 7 dias (Figura 14), observou-se no grupo tratado com hidrogel-base: presença moderada de infiltrados inflamatórios, reepitelização não contínua na região cicatricial, formação do tecido conjuntivo frouxo e dos anexos da pele, pouca presença de vasos sanguíneos, presença do tecido de granulação na área da lesão e hiperemia. No grupo tratado com o hidrogel de EHTc 5% observou-se reepitelização não contínua com área da lesão menor, formação do tecido conjuntivo frouxo com seus anexos, presença do tecido de granulação na área da lesão, intensa presença de vasos sanguíneos e poucos infiltrados inflamatórios. O grupo tratado com o hidrogel de EHTc 10% apresentou lenta formação do epitélio, presença do tecido de granulação sem formação do tecido conjuntivo frouxo, anexos

da pele em desenvolvimento, presença moderada de vasos sanguíneos, hiperemia e poucos infiltrados inflamatórios. Enquanto que o grupo tratado com Dersani® apresentou reepitelização avançada e reestruturação do tecido conjuntivo frouxo, presença do tecido de granulação, presença moderada de vasos sanguíneos, poucos infiltrados inflamatórios e indícios da formação dos anexos da pele.

Figura 14- Fotomicrografias dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional após 7 dias de tratamento (aumento de 40 X).

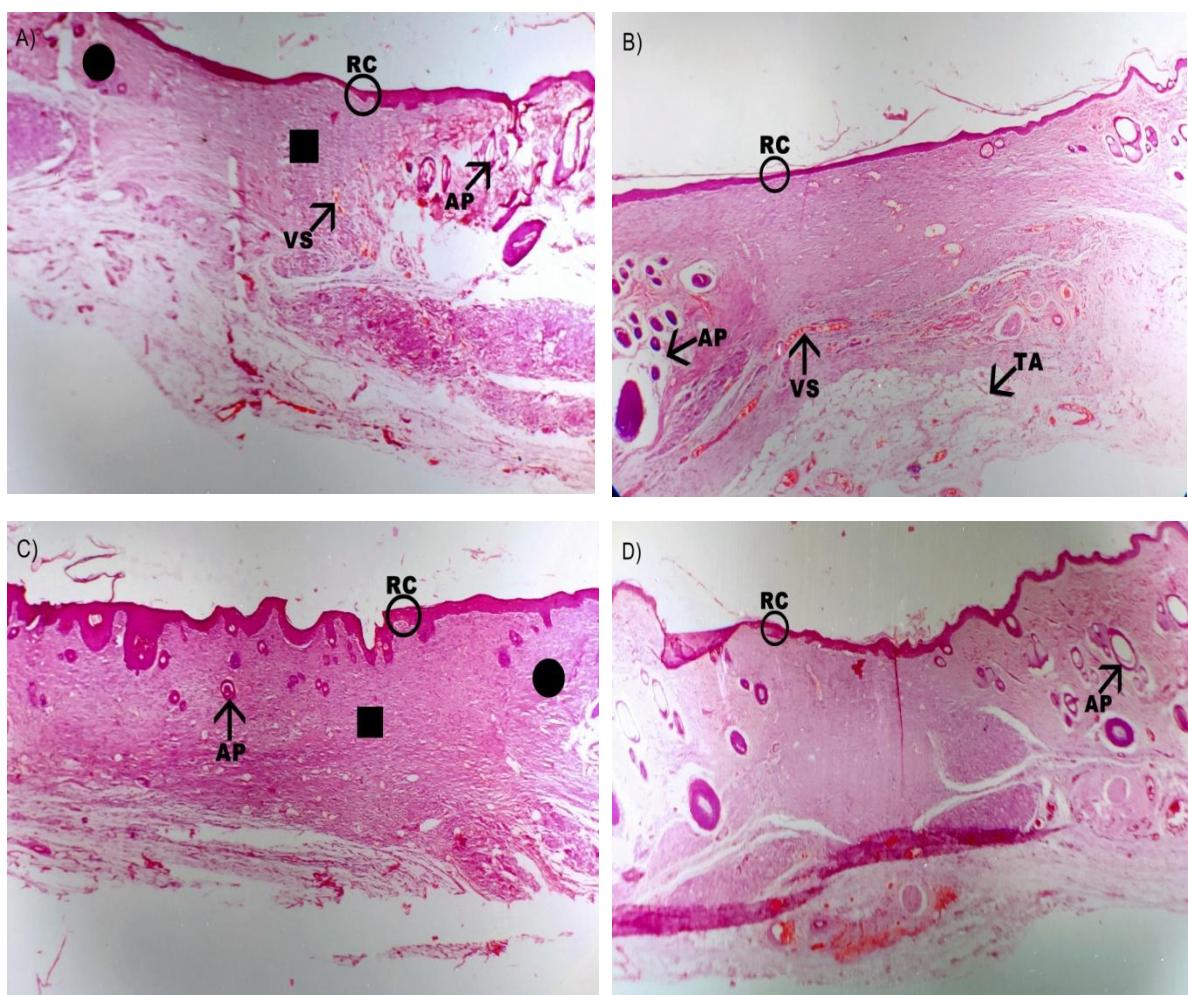


Fonte: A autora (2021). Os grupos são representados por (A) hidrogel-base, (B) EHTc 5%, (C) EHTc 10% e (D) Dersani®. CF: Crosta de Fibrina, IF: Infiltrado inflamatório, H: Hiperemia, VS: Vasos Sanguíneos, AP: Anexos da Pele, RNC: Reepitelização não Contínua, Estrela: Formação do epitélio, Quadrado: Tecido de granulação, Círculo: Tecido conjuntivo frouxo. Coloração H. E.

Após o tratamento de 14 dias (Figura 15), observou-se nos grupos tratados com o hidrogel-base e com o hidrogel do EHTc 10%: reepitelização completa da região cicatricial e reorganização do tecido conjuntivo frouxo, porém ainda apresenta

tecido de granulação, sinalizando processo de cicatrização lento. No grupo tratado com o hidrogel do EHTc 5% foi observado a reepitelização completa da região cicatricial, reorganização do tecido conjuntivo frouxo com arranjo modelado das fibras colágenas próximas ao epitélio e intensa presença de vasos sanguíneos. O tratamento com Dersani® se assemelhou ao tratamento com o hidrogel do EHTc 5%, exceto pela presença moderada de vasos sanguíneos.

Figura 15 - Fotomicrografias dos tecidos de ratos Wistar submetidos ao modelo de ferida excisional após 14 dias de tratamento (aumento de 40 X).



Fonte: A autora (2021). Os grupos são representados por (A) hidrogel-base, (B) EHTc 5%, (C) EHTc 10% e (D) Dersani®. VS: Vasos Sanguíneos, AP: Anexos da Pele, RC: Reepitelização Completa, TA: Tecido Adiposo, Quadrado: Tecido de granulação, Círculo: Tecido conjuntivo frouxo. Coloração H. E.

Segundo Kant *et al.* (2014), o processo inflamatório é necessário para fornecer proteção contra microrganismos e preparar a ferida para as fases seguintes da cicatrização. Essa resposta inflamatória é caracterizada pelos eventos

vasculares, observando-se a vasodilatação local e o aumento da permeabilidade vascular, e a migração celular com a presença de infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares (LEE *et al.*, 2010).

A reepitelização trata-se da reconstrução do epitélio através da proliferação endotelial levando ao fechamento da ferida e pode ser observada pela contração das suas bordas, juntamente com a fase de fibroplasia que além de promover a formação de tecido de granulação, é um grande produtor de colágeno e elastina visando o preenchimento da ferida e por último a fase da angiogênese responsável pela formação dos novos vasos sanguíneos a partir do brotamento das células epiteliais para que o tecido em formação receba oxigênio e nutrientes (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Kamamoto (2007) discorre que no leito de uma ferida, a organização das fibras colágenas é fundamental no processo de contração e reparo tecidual, determinando a qualidade final da cicatriz.

Com base nas análises histopatológicas, foi possível observar cicatrização mais lenta do grupo tratado com o hidrogel de EHTc 10% quando comparado ao EHTc 5%, uma vez que a intensa formação de crostas pode ter dificultado a contração das feridas dos animais tratados com o EHTc 10% e, consequentemente, comprometido sua reepitelização. De acordo com Mandelbaum, Di Santis e Mandelbaum (2003), feridas que formam crostas exuberantes, epitelizam mais lentamente. Sendo assim, a aplicação tópica do hidrogel de *Terminalia catappa* na concentração de 5% parece ser a concentração ideal por possibilitar reepitelização mais rápida e eficaz, além da reorganização do tecido conjuntivo com fibras colágenas e aumento de vascularização tecidual.

Resultados semelhantes foram encontrados na avaliação do efeito do látex de *Euphorbia tirucalli* (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12% e 1,6%) na cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas em ratos. Ao 3º dia de experimento foi visto que os animais do grupo tratado com a concentração de 3,12% apresentaram formação de uma crosta fina e presença discreta de infiltrados inflamatórios, enquanto que os grupos de 50% e 25% apresentaram formação de uma crosta mais espessa e enegrecida e processo inflamatório mais evidente. Ao 15º dia de experimento os animais do grupo tratado com 3,12% do extrato apresentaram reepitelização acentuada quando comparado aos demais grupos, destacando-se por apresentar evolução mais rápida em todas as avaliações (BATISTA *et al.*, 2014).

Li *et al.* (2011) realizaram ensaios de cicatrização em rato Wistar com extrato das frutas de *Terminalia chebula*. Os resultados das análises histopatológicas demonstraram formação de tecido de granulação, moderada quantidade de fibras colágenas organizadas e reepitelização completa do tecido lesionado.

Adewumi *et al.* (2020) observaram nas análises histológicas de animais tratados com a fração em acetato de etila das folhas de *Terminalia avicennioides* melhor reepitelização, restauração dos anexos da pele e reorganização do tecido conjuntivo com rearranjo das fibras de colágeno enquanto que a cicatrização foi retardada no grupo controle, além da presença intensa de infiltrados inflamatórios. Todos esses resultados explanados corroboram os achados no presente trabalho.

5 CONCLUSÕES

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

- ✓ O extrato hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* apresentou, na avaliação fitoquímica, a presença de taninos hidrolisáveis, flavonoides, alcaloides e triterpenos, confirmados através da análise em UPLC- DAD-QTOF MS, em que os taninos hidrolisáveis são a classe de metabólitos majoritários presentes no extrato, seguidos por flavonoides e triterpenos;
- ✓ O extrato apresentou teores de fenóis totais (3,79 g EAG/g), taninos totais (2,16 g EAT/g) e flavonoides (2,34 g EQ/g), sugerindo sua relevante atividade antioxidante;
- ✓ O extrato desempenhou baixa citotoxicidade frente às hemárias, fibroblastos, macrófagos e queratinócitos;
- ✓ O extrato revelou atividade antimicrobiana moderada frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, e frente ao fungo *Candida albicans*, além de ter apresentado capacidade de inibição e remoção dos biofilmes de *Candida* spp;
- ✓ Os hidrogéis desenvolvidos com o EHTc nas concentrações de 5% e 10% apresentaram-se dentro dos padrões permitidos para formulações tópicas;
- ✓ As feridas tratadas com o EHTc 5% apresentaram maior grau de contração quando comparadas ao grupo controle no período de 7 e 14 dias; enquanto que o EHTc 10% foi significativo no período de 14 dias;
- ✓ Na análise histopatológica, o grupo tratado com o EHTc 5% promoveu uma melhor reepitelização tecidual, com reconstituição do tecido conjuntivo frouxo e rearranjo das fibras de colágeno, caracterizando uma evolução mais rápida do processo cicatricial quando comparado aos outros tratamentos;
- ✓ Portanto, os resultados alcançados revelaram o potencial antioxidante, antimicrobiano e cicatrizante das folhas de *Terminalia catappa*, possivelmente relacionado à presença dos compostos fenólicos, o que torna esta espécie uma alternativa terapêutica no tratamento de infecções e no reparo de lesões cutâneas.

REFERÊNCIAS

- ABIODUN, O.O. *et al.* Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae): *In vitro* and *in vivo* evidences. **Journal of Ethnopharmacology**, v.192, p.309-319, 2016.
- ABREU, E. S.; MARQUES, M. E. A. Histologia da Pele Normal. *In: JORGE, S.A.; DANTAS, S. R. P. E. Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas*. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 17-29.
- ADEWUMI, S.S. *et al.* Studies on wound healing potentials of the leaf extract of *Terminalia avicennioides* (Guill. & parr.) on wistar rats. **South African Journal of Botany**, v.133, p.285-297, 2020.
- AJIBOYE, A.E. *et al.* Antibacterial Potency and Phytochemical Screening of the Bark of *Terminalia catappa* Against some Clinical Isolates. **International Journal of Phytomedicine**, v.8, n.2, p.193-201, 2016.
- AKBIK, D. *et al.* Curcumin as a wound healing agent. **Life Sciences**, v. 116, n. 1, p. 1-7, 2014.
- ALBERNAZ, L. C. *et al.* Investigation of plants extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116-121, 2010.
- ALCHÉ, L. E. *et al.* An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia azedarach* L. leaf aqueous extract restrains herpes simplex vírus type1 propagation. **Phytotherapy Research**, v. 16, n.4, p. 348 – 352, 2002.
- ALIGIANNIS, N. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.9, p. 4168-4170, 2001.
- ALLEY, M. C. *et al.* Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, n. 3, p. 589-601, fev.1988.
- ALMEIDA, R.B.; SCHEFFER, T.P. Estudo sobre a utilização de recursos vegetais com potencial terapêutico. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, v.5, n.1, p.59-71, 2012.
- AL-SAYED, E.; ESMAT, A. Hepatoprotective and antioxidant effect of ellagitannins and galloyl esters isolated from *Melaleuca styphelioides* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. **Pharmaceutical Biology**, v.54, n.9, p.1727–1735, 2016.
- AMORIM, E. L. C. *et al.* A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and

ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 2, n. 1, p. 88-94, 2008.

ANDRADE, C.A. et al. Disease-Consensus Index as a tool of selecting potential hypoglycemic plants in Chikindzonot, Yucatan, México. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, n.2, p.199-204, 2006.

ANGEL, M.H. et al. Almendro de La índia: potencial biológico valioso. **Revista Cubana Investigación Biomédica**, v. 22, n. 1, p. 41-7. 2003.

ANIBAL, P.C. et al. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.3, p.839-848, 2013.

ANNEGOWDA, H. V. et al. Evaluation of phenolic content and antioxidant property of hydrolysed extracts of *Terminalia catappa* L. leaf. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 9, p. 479-485, 2010.

ARAÚJO, C. S. T. et al. *Moringa oleifera* Lam. Seeds as a Natural Solid Adsorbent for Removal of Agl in Aqueous Solutions. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 21, n.9, p. 1727-1732, 2010.

ARAÚJO, L. C. J. et al. Flavonoids from *Combretum lanceolatum* Pohl. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 49, p. 37–38, 2013.

ARJARIYA, S.; NEMA, N.; TIWARI, S. Investigate the toxicological effect on extract of *Terminalia catappa* Linn. in rat. **International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences**, v.2, p. 596-601, 2013.

BABAYI, H. et al. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. **Biokemistri**, v.16, n.2, p.106-111, 2004.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 25-51, 2005.

BARKER, D. J. P. In utero programming of chronic disease. **Clinical Science**, v. 95, n. 2, p.115–128, 1998.

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

BATISTA, E.K.F. et al. Avaliação do efeito de formulações com o látex da *Euphorbia tirucallina* terapêutica tópica de feridas cutâneas: aspectos clínicos e histopatológicos. **Medicina Veterinária**, v.8, n.2, p.1-11, 2014.

- BATISTUZZO, J. A. O.; ITAYA, M.; ETO, Y. **Formulário médico-farmacêutico**. 4^a edição. São Paulo: Farmabooks Editora, 2011.
- BAUM, C.L.; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatology Surgery**, v.31, n.6, p.674-686, 2005.
- BEANES, S. R. *et al.* Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . **Expert reviews in molecular medicine**, v.5, n.8, p. 1-11, 2003.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX Family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. **Physiology Review**, v. 87, n. 1, p. 245 – 313, 2007.
- BEDNARCZUK, V. O. *et al.* Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 43-50, 2010.
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**. v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.
- BIONDO-SIMÕES, M. L. P. *et al.* Cicatrização de feridas: estudo comparativo em ratos hipertensos não tratados e tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 2, p. 74-78, 2006.
- BLANES, L. **Tratamento de feridas. Cirurgia Vascular**: guia ilustrado. São Paulo: Baptista-Silva J.C.C., 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerencia Geral de Cosméticos - **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2^a edição. Brasília: Anvisa, 2008.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerencia Geral de Cosméticos - **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 2^a edição. Brasília: Anvisa, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília, 2006.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.117, n.7, p.12-34, 2006.
- BOWLER, P.G.; DUERDEN, B.I.; ARMSTRONG, D.G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.2, p.244-269, 2001.
- BUDOVSKY, A.; YARMOLINSKY, L.; BEN-SHABAT, S. Effect of medicinal plants on wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 2, p. 171–183, 2015.
- CALDERONE, R. A.; BRAUN, P.C. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. **Microbiological Reviews**, v.55, n.1, p.1-20, 1991.

CAMPOS, J. R. R. *et al.* Pedochronology and development of peat bog in the environmental protection area Pau-de-Fruta - Diamantina, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, n.6, p.1965-1975, 2010.

CARVALHO, A. V. *et al.* Características físicas e químicas de Frutos de pupunheira no estado do Pará. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n.3, p. 763-768, 2013.

CASTRO, P.R.C. *et al.* Ação de bioestimulantes em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* cv. IAC – Carioca Tybatã). **Revista de Agricultura**, v. 79, n. 2, p. 215-225, 2004.

CECHINEL, F.V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHANDA, S. *et al.* Antimicrobial, antioxidant, and synergistic properties of two nutraceutical plants: *Terminalia catappa* L. and *Colocasia esculenta* L. **Turkish Journal of Biology**, v.37, n.1, p.81-91, 2013.

CHANDRASEKHAR, E.M. Y. *et al.* Antidepressant like effects of hydrolysable tannins of *Terminalia catappa* leaf extract via modulation of hippocampal plasticity and regulation of monoamine neurotransmitters subjected to chronic mild stress (CMS). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.86, p.414–425, 2017.

CHANG, Z. *et al.* A Comprehensive Review of the Structure Elucidation of Taninns from *Terminalia* Linn. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-16, 2019.

CHANWITHEESUK, A. *et al.* Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p.1044-1048, 2007.

CHYAU, C. C.; KO, P. T.; MAU, J. L. Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves. LWT. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 1099-1108, 2006.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th. ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

COHEN, I. K.; MAST, B. A. Models of wound healing. **The Journal of Trauma**, v. 30, n. 12, p.149-155, 1990.

CONDELLI, N. *et al.* Prediction of the antioxidant activity of extra virgin olive oils produced in the Mediterranean area. **Food Chemistry**, v. 177, p. 233–239, 2015.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Journal of the International Society on Toxicology**, v. 40, n.8, p.1231–1234. 2002.

COSTA, L.S.F. *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula*. **Marine Drugs**. v. 9, n. 6, p. 952–966, 2011.

- DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G. Microbial biofilms: from ecology to. **Molecular genetics microbiology**, v.64, n.4, p. 847 – 867, 2000.
- D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 813- 824, 2007.
- DAVIES, C.E. *et al.* A prospective study of the microbiology of chronic venous leg ulcers to reevaluate the clinical predictive value of tissue biopsies and swabs. **Wound Repair and Regeneration**, v.15, n.1, p.17-22, 2007.
- DHARMASIRI, M.G.; RATNASOORIYA, W. D.; THABREW, M. I. Water extract of leaves and stems of preflowering but not flowering plants of anisomeles indica possesses analgesic and antihyperalgesic activities in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n.1, p. 37–44, 2003.
- DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**. v. 9, n. 1, p. 283-289, 2004.
- DI MEGLIO, P.; PEREIRA, G.K.; NESTLE, F.O. The multitasking organ: recent insights into skin immune function. **Immunity**, v.35, n.6, p.857-869, 2011.
- DIXON, R. A.; PASINETTI, G. M. Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience, **Plant Physiology**, v. 154, n.2, p. 453–457 2010.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n.2, p.167-193, 2002.
- DOUGHTY, D. B.; SPARKS-DeFRIESE, B. Wound healing physiology. *In:* BRYANT, R. A.; NIX, D. P. **Acute and chronic wounds: current management concepts**. 4^a edição. Missouri: Mosby; 2012. p. 63-82.
- ECKERT, J. W.; EAKS, I. L. Postharvest Disorders and Diseases of Citrus Fruits. *In:* ECKERT, J. W. **The Citrus Industry**. California: UCANR; 1989.
- EDWARDS, S.L. Innate Defences. *In:* MONTAGE, S.E.; WATSON, R.; HERBERT, R.A. **Physiology for nursing practice**. 3rd edition. Spain: Elsevier; 2005. p.635-683.
- EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 514–525, 2007.
- ENDO, E.H. *et al.* Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v.161, n.7, p.534-544, 2010.
- FAN, Y. M. *et al.* Phytochemical and anti-inflammatory studies on *Terminalia catappa*. **Fitoterapia**, v.75, n. 3-4, p.253-260, 2004.

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

FERREIRA, A. O. **Guia prático da farmácia magistral**. 4^a edição. São Paulo: Editora Pharmabooks, 2010.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 203-206, 2008.

GAO, J. *et al.* Inhibitory effect of TCCE on CCl₄-induced overexpression of IL-6 in acute liver injury. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.36, n.11, p.767-772, 2004.

GENTILHOMME, E. *et al.* Modulation of a fibrotic process induced by transforming growth factor beta-1 in dermal equivalents. **Cell Biology and Toxicology**, v.5, n.3, p.54-59, 1999.

GERMOSÉN-ROBINEAU, L. **Farmacopea Vegetal Caribeña**. México: CICY editorial, 2014.

GHOSH, P. K.; GABA, A. Phyto-extracts in wound healing. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 5, p. 760-820, 2013.

GHOSH, S. *et al.* Evaluation of the wound healing activity of methanol extract of Pedilanthus tithymaloides (L.) Poit leaf and its isolated active constituents in topical formulation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 714 –722, 2012.

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

GONÇALVES, L.M. *et al.* Effects of *Terminalia catappa* Linn. Extract on *Candida albicans* biofilms developed on denture acrylic resin discs. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v.10, n.7, p. 642-647, 2018.

GONÇALVES, L.M. *et al.* Effect of *Terminalia catappa* Linn. on Biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata* and on Changes in Color and Roughness of Acrylic Resin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-8, 2019.

GREAVES, N. S. *et al.* Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, n. 3, p. 206-217, 2013.

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

- GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 2008.
- HAGERMAN, A.E. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. **Journal of Chemical Ecology**, v.13, n.3, p.437-448, 1987.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4^a edição. Oxford: Clarendon Press, 2006.
- HARDING, K. G.; MORRIS, H. L.; PATEL, G. K. Science, medicine and the future: healing chronic wounds. **British Medical Journal**, v. 324, n.7330, p. 160-163, 2002.
- HASLAM, E. Plant Polyphenols, Vegetable Tannins Revisited. **Chemistry and Pharmacology of Natural Products**. Cambridge University Press, Cambridge, p.1-240, 1989.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, n.10, p. 572-584, 2002.
- HESS, C. T. **Enfermagem Prática**: Tratamento de feridas e úlceras. 4^a edição. Rio de Janeiro: Reichmann Affonso, 2002.
- HIDEKI, M. *et al.* Endoscopic cross-infection with *Helicobacter pylori*. **The Lancet**, v.345, n. 8947, p. 464, 1995.
- HILDEBRAND, K. A.*et al.* The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v. 13, n. 3, p. 136-144, 2005.
- HOFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 149-169, 2016.
- HOIBY, N. *et al.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.35, n.4, p. 322-332, 2010.
- HOSGOOD, G. Reparo de Feridas e Resposta Tecidual Específica à Lesão. *In:* SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3^a edição. São Paulo: Manole; 2007. p.66-86.
- HUANG, Y.H. *et al.* Protective effects and mechanisms of *Terminalia catappa* L. methenolic extract on hydrogen-peroxide-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.18, n. 266, p. 1-9, 2018.
- ICHÔRON, N.; TOR-ANYIIN, T.A.; IGOLI, J.O. Arjunolic Acid from the Root Bark of *Terminalia catappa* Linn. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v.2, n.11, p.494 - 497, 2018.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria journal of medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

ILK, S.; SAGLAM, N.; ÖZGEN, M. Kaempferol loaded lecithin/chitosan nanoparticles: preparation, characterization, and their potential applications as a sustainable antifungal agent. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 5, p. 907-916, 2016.

IUPAC. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, 2012. Flavonoids (isoflavonoids and neoflavonoids). Disponível em: < <http://goldbook.iupac.org/PDF/F02424.pdf> >

JADHAV, S. *et al.* Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, v.29, n.1, p.125-130, 2013.

JAUL, E. Non-healing wounds: The geriatric approach. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 49, n.2, p.224-6, 2009.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAMAMOTO, F. **Contração de feridas: revisão bibliográfica e estudo da contração geradaa por fibroblastos normais e de queloides**. [Dissertação de Mestrado]. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, São Paulo, 2007.

KANERIA, M. J. *et al.* Nontargeted metabolomics approach to determine metabolites profile and antioxidant study of Tropical Almond (*Terminalia catappa* L.) fruit peels using GC-QTOF-MS and LC-QTOF-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.160, p.415-427, 2018.

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

KATZ, M.H. *et al.* Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.25, n.6, p.1054-1058, 1991.

KENDALL, A.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n.1, p. 141-164, 2013.

KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. **Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia**. 3^a edição. São Paulo: Elsevier, 2012.

KHAN, A. A. *et al.* Evaluation of wound healing property of *Terminalia catappa* on excision wound models in Wistar rats. **Drug Research**, v. 64, n. 5, p. 225-228, 2014.

KIM, M.J. *et al.* *Citrus Reticulata* blanco induces apoptosis in human gastric cancer cells SNU-668. **Nutrition and Cancer**, v. 51, n.1, p.78-82, 2005.

- KINGSLEY, A. A proactive approach to wound infection. **Nursing Standard**, v. 15, n. 30, p. 50-58, 2001.
- KINOSHITA, S. *et al.* Antioxidant andhepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island andits tannin corilagin. **Phytomedicine**, v. 14, n.11, p. 755-762, 2007.
- KOTRESHA, D. *et al.* Effect of *Terminalia catappa* on lipid profile in transplanted fibrosarcoma in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v.44, n.3, p. 390-393, 2012.
- KRISHNAVENI, M. *et al.* Gas chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry analysis of *Terminalia catappa* l. nut and antimicrobial assay. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research** , v.8, n.4, p.168-170, 2015.
- KUMAR, M. S. *et al.* Triphala promotes healing of infected full-thickness dermal wound. **Journal of Surgical Research**, v.144, n.1, p. 94-101, 2008.
- LEE, Y. J. *et al.* Inhibitory Effect of *Thuja orientalis* on TNF- α induced Vascular Inflammation. **Phytotherapy Research**. v. 24, n. 10, p. 1489–1495, 2010.
- LIBANORE, D. Z. **Efeitos da terapia a laser de baixa intensidade (685 e 830 nm) na taxa de proliferação bacteriana e na cicatrização de feridas cutâneas em modelo animal.** 2008. [Dissertação de Mestrado]. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- LI, C. Y. *et al.* Gastroprotective effect of cyanidin 3-glucoside on ethanol-induced gastric lesions in rats. **Alcohol**, v.40, n.8, p.683-687, 2008.
- LI, K. *et al.* Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz promote cutaneous wound healing in rats. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 11, n. 1, p. 86, 2011.
- LIMA, C. R. O. **Reparação de feridas cutâneas incisionais em coelhos após o tratamento com barbatimão e quitosana.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
- LIN, C. C.; HSU, Y. F.; LIN, T. C. Effects of punicalagin and punicalin on carrageenan-induced inflammation in rats. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 27, p. 371-376, 1999.
- LIN, C.C. *et al.* Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Punicalagin and Punicalin on Acetaminophen-Induced Liver Damage in Rats. **Phytotherapy Research**, v.15, n.3, p. 206-212, 2001.
- LINDSAY, D.; VON-HOLY, A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **Journal Hospital Infection**, v. 64, n.4, p.313-325, 2008.

LIN, S. *et al.* Antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow release device to disinfect dentinal tubules. **Journal of Endodontics**, v.29, n.6, p.416-418, 2016.

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

LI, X. *et al.* Corilagin, a promising medicinal herbal agent. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v.99, p.43-50, 2018.

LÓPEZ-DELIS, A. *et al.* Characterization of the cicatrization process in diabetic foot ulcers based on the production of reactive oxygen species. **Journal of Diabetes Research**, v.2018, 2018.

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

MACIEL, M.A.M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-38, 2002.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n.4, p. 393-410, 2003.

MARAIS, J. P. J. *et al.* The Stereochemistry of Flavonoids. In: GROTEWOLD, E. **The Science of Flavonoids**. EUA: Springer Science; 2006. p.1-46.

MARMONIER, A.A. Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. **Bactériologie Médicale**, p. 227-236, 1990.

MARQUES, M. R. *et al.* An in vitro analysis of the total phenolic content, antioxidant power, physical, physicochemical, and chemical composition of *Terminalia catappa* Linn fruits. **Food Science and Technology**, v. 32, n.1, p. 209-213, 2012.

MARTINS, M. D. *et al.* Comparative analysis between *Chamomilla recutita* and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 2, p. 274-278, 2009.

MARTINS, N. *et al.* Healing process in cutaneous surgical wounds in rats under the influence of *Orbignya phalerata* aqueous extract. **Acta cirúrgica brasileira**, v. 21, n. 3, p. 66–75, 2006.

MASSENO, A.P.B. *et al.* Miofibroblastos: revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.2, p. 177-190, 2010.

MASSON-MEYERS, D. *et al.* Topical Treatment with *Copaifera langsdorffii* oleoresin improves wound healing in rats. **International Journal of Phytomedicine**, v.5, n.3, p.378-386, 2013.

MAU, J.L.; KO, P.T.; CHYAU, C.C. Aroma characterization and antioxidant activity of supercritical carbon dioxide extracts from *Terminalia catappa* leaves. **Food Research International**, v.36, n.1, p.97-104, 2003.

MAVER, T. et al. A review of herbal medicines in wound healing. **International Journal of Dermatology**, v.54, n.7, p.740-751, 2015.

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

MENDES, K.F. et al. Interference of the association oxyfluorfen + flumioxazin and the addition of mineral oil on a phytosociological survey. **Planta Daninha**, v.36, p.1-9, 2018.

MENDONÇA, R. et al. Flora vascular do Cerrado. In: SANO, S.; ALMEIDA, S. **Cerrado. Ambiente e flora**. Planaltina; 1998. p. 288-556.

MENESES, C.H.S.G. et al. Análise da arborização dos bairros do Mirante e Vila Cabral na cidade de Campina Grande – PB. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 3, n. 2, p. 120-126, 2003.

MENON, S. N. et al. Modelling the interaction of keratinocytes and fibroblasts during normal and abnormal wound healing processes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1741, p. 3329-3338, 2012.

MINAGI, S. et al. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. **Infection and Immunity Journal**, v.47, n.1, p.11-14, 1985.

MININEL, J. F. et al. Characterization and Quantification of Compounds in the Hydroalcoholic Extract of the Leaves from *Terminalia catappa* Linn. (Combretaceae) and Their Mutagenic Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-11, 2014.

MITCHELL, R.N. et al. Inflamação aguda e crônica. In: ROBBINS; COTRAN. **Fundamentos de Patologia**. 7^a edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, p.29-44.

MITTAL, A.; SATISH, S.; ANIMA, P. Herbal boon for wounds. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, n.2, p.1-12, 2013.

MIYAKE, Y. et al. Surface hydrophobicity and adherence of Candida to acrylic surfaces. **Microbios**, v.46, n.186, p.7-14, 1986.

MOHALE, D.S. et al. Brief review on medicinal potential of *Terminalia catappa*. **Journal of Herbal Medicine and Toxicology**, v.3, n.1, p.7-11, 2009.

- MONGALO, N. I. *et al.* Ethnobotany, phytochemistry, toxicology and pharmacological properties of *Terminalia sericea* Burch. ex DC. (Combretaceae) – A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 789–802, 2016.
- MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U. O.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química a ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
- MONVISES, A. *et al.* The Siamese fighting fish: Well-known generally but little-known scientifically. **Science Asia**, v.35, n.1,p. 8–16, 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63,1983.
- MUDI, S.; MUHAMMAD, A. Phytochemical screening and antimicrobial activities of *Terminalia catappa* Leaf extracts. **Biochemistry**, v. 23, n.1, p. 35-39, 2011.
- NAGAPPA, A.N. *et al.* Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.1, p.45-50, 2003.
- NAITIK, P. *et al.* Effect of *Terminalia catappa* on lipid profile in transplanted fibrosarcoma in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v.44, n.3, p.390-392, 2012.
- NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.1, p.331-339, 2003.
- NEMA, N.; ARJARIYA, S.; TIWARI, S. In vivo wound healing potential of *Terminalia catappa* (Indian Almond) leaves extract on rats. **Asian Journal of Pharmacy and Medical Science**, v. 3, p. 54-57, 2013.
- NETO, L. G. *et al.* Effect of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene isolated from the leaves of *Combretum leprosum* Mart. on cutaneous wounds in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, n. 29, p.116-120, 2015.
- OLIVEIRA, D.A.A.P. *et al.* Laser 904nm action on bone repair in rats with osteoporosis. **Osteoporosis International**, v.21, n.12, p.2109-2114, 2010.
- OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p.641-650, 2010.
- OLIVEIRA, R.S. *et al.* Aplicação do processo de ultrassom na extração de catequinas nos resíduos de chá verde. **Brazilian Journal of Food Research**, v.7, n.3, p.29-40, 2016.
- OPARA, F.N. *et al.* Preliminary phytochemical screening and antibacterial activities of leaf extracts of *Terminalia catappa*. **Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences**, v.3, n.3, p. 424-428, 2012.
- OSÓRIO, R. M. *et al.* Cytotoxicity of endodontic materials. **Journal of Endodontics**,

v. 24, n. 2, p. 91-96, 1998.

PAGNANO, M.W. *et al.* Slower recovery after two-incision than mini-posterior-incision total hip arthroplasty: A randomized clinical trial. **Journal of Bone Joint Surgery**, v.90, n.5, p.1000-1006, 2008.

PANDYA, N.B. *et al.* Antitumor and antioxidant status of *Terminalia catappa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 45, n. 5, p.464-469, 2013.

PASQUA, I. C. Plantas Hortícolas Não Convencionais: Seus Potenciais nutracêuticos e medicinais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n.2, p. 4061–4073, 2009.

PASTOR- SÁNCHEZ, R. Alteraciones del nicho ecológico: resistencias bacterianas a los antibióticos. **Gaceta Sanitaria**, v. 20, n.1, p.175-181, 2006.

PATEL, D. K. *et al.* Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.2, n.3, p.239- 250, 2012.

PATTANAYAK, S. P.; SUNITA, P. Wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcate* (L.f) Ettingsh. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, n.2, p. 241-247, 2008.

PAZYAR, N. *et al.* Skin Wound Healing and Phytomedicine: A Review. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.27, n.6, p.303–310, 2014.

PEPPAS, N. A. Hydrogels. In: RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press; 1996. p.60-64.

PEREIRA, A. L.; BACHION, M. M. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.58, n.2, p. 208-213, 2005.

PRAVEENA, K. Phytochemical, anti-microbial and In-vitro antioxidant activity of *Terminalia catappa*. **International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences**, v. 5, n.2, p. 3325-3329, 2014.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

RABE, J.H. *et al.* Photoaging: mechanisms and repair. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 1-19, 2006.

RAJESH, B. R. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of leaves of *Terminalia catappa* and *Anacardium occidentale*: A comparative study. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.4, n.1, p.79-82, 2015.

RAKHOLIYA, K. *et al.* Vegetable and fruit peels as a novel source of antioxidants. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.5, n.1, p.63-71, 2011.

RAMAGE, G. *et al.* Candida biofilms: an update. **Eukaryot Cell**, v. 4, n.4, p. 633-638, 2005.

RAMALHO, L. N. Z. *et al.* Efeito de agentes anti-hipertensivos sobre as células estreladas durante a regeneração hepática em ratos. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.40, n.1, p. 40-44, 2003.

RAMSEY, D. T. *et al.* Effects of three occlusive dressing materials on healing of full thickness skin wounds in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n.7, p. 941-949, 1995.

RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia**. 5^a edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RATNASOORIYA, W.D. *et al.* Tender leaf extract of *Terminalia catappa* antinociceptive activity in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n.1, p.60-66, 2002.

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

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

REUTER, S. *et al.* Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v.49, n.11, p.1603–16, 2010.

RICKARD, A. H. *et al.* Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 94-100, 2003.

RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: A review of its features and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. 673-688, 2014.

RODRIGUES, C.S. *et al.* **Consórcio de girassol com milho e feijão no Agreste sergipano.** In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE A CULTURA DO GIRASSOL, 19, 2011, Aracaju- SE. Anais. Aracaju: 2011. p. 202-205.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A. *et al.* Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, 293-297, 2013.

ROGERO, S.O. *et al.* Biocompatibility study of polymeric biomaterials. **Artificial Organs**, v. 27, n. 5, p. 424-427, 2003.

- ROLEIRA, F. M. F. *et al.* Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235–258, 2015.
- ROLSTAD, B. S.; BRYANT, R. A.; NIX, D.P. Topical Management. *In: BRYANT, R. A.; NIX, D.P. Acute and chronic wounds.* 4th edition. Missouri: Elsevier Mosby, 2012.
- ROSIAK, J.M.; OLEJNICZAK, J. Medical Applications of Radiation Formed Hydrogels. **Radiation Physics and Chemistry**, v.42, n. 4-6, p. 903- 906, 1993.
- ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia**: texto e atlas. Em correlação com biologia celular e molecular. 6^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia**. 3^a edição. São Paulo: Artes Médicas, 2007.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLORL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n.2, p. 2–13, 2015.
- SANTOS, E. N. I. *et al.* Antiinflammatory, antinoceptive, and antipyretic effects of methanol extract of *Cariniana rubra* stem bark in animal models. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 2, p. 557-566, 2010.
- SANTOS, O. V. *et al.* Chemical evaluation and thermal behavior of Brazil nut oil obtained by different extraction processes. **Food Research International**, v.47, n.2, p.253-258, 2012.
- SAROJA, M.; ANNAPOORANI, S. In vitro antioxidant activity of flavonoid fractions of *Cynodon dactylon* and *Terminalia catappa* leaves. **International Research Journal of Pharmacy**, v.3, n.8, p.209-11, 2012.
- SATISH, C. S.; SATISH, K. P.; SHIVAKUMAR, H. G. Hydrogels as controlled drug delivery systems: synthesis, crosslinking, water and drug transport mechanism. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 2, p. 133- 140, 2006.
- SCAZZOCCHIO, F. *et al.* Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v.161, n.4, p.327-333, 2005.
- SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacological Research**, v. 58, n.2, p. 165-171, 2008.
- SCHLESIER, K. *et al.* Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. **Free Radical Research**, v. 36, n.2, p. 177-187. 2002.
- SCHMIDT, C. *et al.* Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n.3, p. 523–532, 2009.
- SEO, Y. J. *et al.* Isocyperol, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPSinduced inflammatory responses via suppression of the NF-κB and STAT3

pathways and ROS stress in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 61-69, 2016.

SHAI, A.; MAIBACH, H.I. Antibiotics, antiseptics and cutaneous ulcers. In: **Wound healing and ulcers of the skin. Diagnosis and Therapy – the practical approach**. Germany: Springer; 2005. p.135-150.

SIES, H. **Oxidative Stress**. London: Academic Press, 1985.

SILVA, C.M. et al. Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literatura. **Mycopathologia**, v.180, n.1-2, p.69-73, 2015.

SILVA, L.L.G.G. et al. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. **Archivos Zootecnia**, v.59 n.225, p.21- 30, 2010.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5^a edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6^a edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.

SIMÕES, R.C.; ALMEIDA, S.S.M.S. Estudo fitoquímica de *Bauhinia forficata* (Fabaceae). **Biota Amazônia**, v.5, n.1, p. 27-31, 2015.

SINGH, A. et al. Comparative profiling of phenolic compounds from different plantparts of six *Terminalia* species by liquid chromatography–tandemmass spectrometry with chemometric analysis. **Industrial Crops and Products**, v.87, p. 236–246, 2016.

SINGH, D. et al. Effect of Extracts of *Terminalia chebula* on Proliferation of Keratinocytes and Fibroblasts Cells: An Alternative Approach for Wound Healing. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-13, 2014.

SINGH, N. et al. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n.1, p. 18–45, 2014.

STACE, C.A. Combretaceae. In: N. SMITH, S.A.; MORI, A.; HENDERSON, D.W.; STEVENSON, S.V. **Flowering Plants of the Neotropics**. United Kingdom: The New York Botanical Garden. Princeton University Press; 2004. p. 110-111.

STANDRING, S. **Gray's Anatomia: The Anatomical Basis of Clinical Practice**. 40^a edição. New York: Churchill Livingstone, 2008.

STEPHENS, P. et al. Anaerobic cocci populating the deep tissues of chronic wounds impair cellular wound healing responses in vitro. **British Journal of Dermatology**, v.148, n.3, p.456-466, 2003.

STOBIECKI, M.; KACHLICKI, S. Isolation and identification of flavonoids. In: GROTEWOLD, E. **The Science of Flavonoids**. USA: Springer Science; 2006. p.1-46.

STOJADINOVIC, A. et al. Topical advances in wound care. **Gynecologic Oncology**, v.111, n.2, p.70-80, 2008.

STOTTS, N. Nutritional assessment and support. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. **Acute and Chronic Wounds: Current Management Concepts**. 4th edition. St Louis, MO: Elsevier Mosby; 2012. p. 388-399.

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

SUZUKI, C. L. **Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica**. Instituto de pesquisas energéticas nucleares. Autarquia associada à universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

TANAKA, T.; NONAKA, G. I.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. Isolation and characterization of four new hydrolyzable tannins, terflavins A and B, tergallagin and tercatain from the leaves of *Terminalia catappa* L. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.34, n. 3, p.1039-1049, 1986.

TAZIMA, M. F. G.S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina**, v. 41, n.3, p.259-264, 2008.

TEIXEIRA, H. L. **Composição química e perfil de ácidos graxos da castanha do fruto da castanhola (*Terminalia catappa* Linn)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA, 2010.

TERÇAS, A.G. et al. Phytochemical Characterization of *Terminalia catappa* Linn. Extracts and Their antifungal Activities against *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n.595, p.1-13, 2017.

THOMSON, L.A.J.; EVANS, B. *Terminalia catappa* (tropical almond). In: ELEVITCH, C.R. **Species profiles for pacific Island agroforestry: permanent agriculture resources (PAR)**, 2006.

VACHON, D. J.; YAGER, D.R. Novel sulfonated hydrogel composite with the ability to inhibit proteases and bacterial growth. **Journal of Biomedical Material Research Part A**, v. 76, n.1, p. 35 - 43, 2006.

VASCONCELOS, P. C. P. et al. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by Mouriri pusa treatment in acetic acid ulcer model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n.2, p. 293-301, 2008.

VENKATALAKSHMI, P.; VADIVEL, V.; BRINDHA, P. Identification of Flavonoids in Different Parts of *Terminalia catappa* L. Using LC-ESI-MS/MS ad Investigation of Their Anticancer Effect in EAC Cell Line Model. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.8, n.4, p.176-183, 2016.

VERAS, B.O. et al. Algrizea Minor Sobral, Faria & Proença (Myrteae, Myrtaceae): chemical composition, antinociceptive, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil. **Natural Product Research**, v. 23, p. 1-5, 2019.

VERAS, B.O. et al. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.247, n. 112265, p.1-9, 2020.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, p. 253-262, 2000.

VERSTREPEN, K.J.; KLIS, F.M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular Microbiology**, v.60, n.1, p.5-15, 2006.

VIEIRA, R.C. et al. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.8, p.358-366, 2008.

VIEIRA, R.F. et al. Uso de marcadores químicos no estudo da diversidade genética de *Ocimum gratissimum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n.1, p. 126-129, 2002.

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

VILLAS BOAS, G.K.; GADELHA, C.A.G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 23, n. 6, p. 1463-1471, 2007.

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

WANG, L.K. et al. Chemical precipitation. In: WANG, L.K.; HUNG, Y.T.; SHAMMAS, N.K. **Physicochemical Treatment Processes**. New Jersey: Humana Press; 2004. p. 141–198.

WARRINGER, R.; BURRELL, R. R. Infection and the chronic wound: A focus on silver. **Advances in skin and wound care**, v. 18, n.1, p.2-12, 2005.

WEN, K.C. et al. Inhibitory Effects of *Terminalia catappa* on UVB-Induced Photodamage in Fibroblast Cell Line. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-9, 2011.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecore for chemical fuality control. **Journal of Apicultural Research**, v.37, n.2, p.99-105, 1998.

WU, P.C. *et al.* "In vitro" percutaneous absorption of captopril through excised rabbit skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.143, p.119-123, 1996.

WYSOCKI, A. B. Anatomy and physiology of skin and soft tissue. *In: BRYANT, R. A.; NIX, D.P. Acute and chronic wounds*. 4th edition. Missouri: Elsevier Mosby; 2012. p. 40-62.

ZENGIN, G. *et al.* Survey of Phytochemical Composition and Biological Effects of Three Extracts from a Wild Plant (*Cotoneaster nummularia* Fisch. et Mey.): A Potential Source for Functional Food Ingredients and Drug Formulations. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1-13, 2014.

ZHANG, K. *et al.* Preparation and evaluation of kaempferol-phospholipid complex for pharmacokinetics and bioavailability in SD rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 114, p. 168–175, 2015.

ZHOU, K. *et al.* Analysis on Chemical Constituents from *Terminalia chebula* Retz. and *Terminalia bellerica* (Gaertn.) Roxb. By UPLC-Q-Exactive Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry. **Journal of Chinese Mass Spectrometry Society**, v.41, n.3, p.254-267, 2020.

ZOU, Y.; LU, Y.; WEI, D. Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.16, p. 5032-5039, 2004.

ANEXO A - OFÍCIO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife – PE – Brasil
 Fones: 2226 8842
 cema@ufpe.br

Recife, 05 de maio de 2020

Ofício nº 23/20

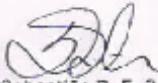
Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof. Teresinha Gonçalves da Silva
 Centro de Biociencias/ Depto. de Antibioticos
 processo nº0010/2020

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação das atividades antimicrobiana e cicatrizante das folhas DE *Terminalia catappa* L. (COMBRETACEAE).” registrado com o nº0010/2020 sob a responsabilidade da Prof. Teresinha Gonçalves da Silva que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 28/04/2020

Finalidade	(<input type="checkbox"/> Ensino (<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28/04/2020 a 24/08/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo
Nº de animais	100
Peso/Idade	200- 250g/ 90 dias
Sexo	Macho (100) e femea (27)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Atenciosamente


 Prof. Sebastião R. F. Silva

Presidente CEUA/UFPE
 SIAPe 2345691