



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA

Soraia Lins de Arruda Costa

**Avaliação da ação cicatrizante de extratos orgânicos
do muco produzido pelo Zoantídeo *Palythoa*
*caribaeorum***

Vitória de Santo Antão

2013

Soraia Lins de Arruda Costa

**Avaliação da ação cicatrizante de extratos orgânicos
do muco produzido pelo Zoantídeo *Palythoa*
*caribaeorum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra Noemia Pereira da Silva Santos

Coorientador: Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira

Vitória de Santo Antão

2013

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Lúcia Feliciano dos Santos, CRB4: 1650

C837a Costa, Soraia Lins de Arruda.

Avaliação da ação cicatrizante de extratos orgânicos do muco produzido pelo
Zoantídeo Palythoa caribaeorum. / Soraia Lins de Arruda Costa. Vitória de Santo
Antão: O Autor, 2013.

xiv, 56 folhas: il.; fig.

Orientador: Noemia Pereira da Silva Santos.

Co-orientador: Mariane Cajubá de Britto Lira.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade
Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2013.

Inclui bibliografia.

1. *Palythoa caribaeorum*. 2. Zoantídeo. 3. Reparo tecidual. I. Santos, Noemia
Pereira da Silva (Orientador). II. Lira, Mariane Cajubá de Britto (Co-orientador).
III. Título.

616.01 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-006/2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE - MESTRADO ACADÊMICO



Dissertação de Mestrado apresentada por **Soraia Lins de Arruda Costa** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título **"AVALIAÇÃO DA AÇÃO CICATRIZANTE DE EXTRATOS ORGÂNICOS DO MUCO PRODUZIDO PELO ZOANTÍDEO *PALYTHOA CARIBAEORUM*"**, orientada pela Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos, aprovada no dia 28 de fevereiro de 2013 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr. Emerson Peter da Silva Falcão
Núcleo de Nutrição - CAV/UFPE

Dra. Marcela Silvestre Outtes Wanderley
Departamento de Bioquímica - UFPE

Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira
Núcleo de Nutrição - CAV/UFPE

Autor

Soraia Lins de Arruda Costa

Dedico,

Ao meu Deus que tem me proporcionado
mais do que mereço.

Aos meus pais, meus pilares e maiores
incentivadores das minhas conquistas.

Ao meu esposo pela paciência, amor,
auxílio e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus supremo e eterno, que com sua infinita bondade me concedeu a oportunidade de concluir mais essa etapa da minha vida, “a ti Senhor toda honra e glória, tudo vem de ti”.

A minha mãe, Lindalva Lins, que com suas palavras sempre me sustentou na caminhada deste projeto me incentivando e nunca me deixando desfalecer, “À senhora minha querida mãe, dedico todo meu afeto e companhia em tudo que necessário”.

Ao meu pai, Reginaldo Costa, que me apoiou e me ajudou de toda as formas, me concedendo sempre as melhores condições.

A Profa. Dra Noemia Pereira da Silva Santos pela orientação e paciência ao desenvolver da pesquisa.

A Profa. Dra. Mariane Cajubá de Brito Lira pela co-orientação e importantes contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva pela valiosa colaboração nas extrações e cromatografias, seus ensinamentos foram preciosos.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás pela paciência e preciosa colaboração.

Aos Prof. Dr. Carlos Perez e Profa. Jeanne Claine pelas valiosas contribuições na obtenção do material analisado (“baba-de-boi”).

Ao Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami LIKA/UFPE, Prof. Dr José Luiz Filho pela colaboração, permitindo a realização de etapas fundamentais na execução deste trabalho.

As acadêmicas de Iniciação Científica do curso de Ciências Biológicas, Maria Claudiana e Marllyn Marques, pela sua valorosa contribuição para realização de grande parte deste trabalho. Agradeço muito a você Claudiana, aos momentos fora do laboratório concedidos, que me mostraram um refúgio.

A Sr. João, técnico do laboratório de produtos naturais do departamento de bioquímica da UFPE, que sempre esteve disposto a ajudar e a contribuir, sua ajuda foi bastante relevante para o meu crescimento.

A todos os animais que participaram desta pesquisa doando suas vidas em prol deste estudo científico.

Ao meu esposo Sérgio Magalhães, que nunca me deixou desistir me mostrando sempre a melhor alternativa, te amo demais e agradeço a Deus por te ter sempre por perto.

Ao meu irmão Joctã Lins, que sempre esteve ao meu lado no traslado Recife-Vitória, pela paciência de me esperar quando necessário e até mesmo chegar a passar o dia inteiro ao meu dispor, chegando a participar de algumas etapas desta pesquisa, coletas do material analisado.

A minha irmã Michele Lins e meu cunhado Jean Marcos, que com suas palavras sempre me incentivaram a seguir em frente e erguer a cabeça nos piores momentos de desânimos.

Ao meu sobrinho lindo que titia tanto ama, Marcus Vinícius, que sempre enche minha vida de felicidade, e que nos momentos mais difíceis com apenas um sorriso me fez esquecer de tudo que me cercava.

Aos amigos Audenes Melo, Janice Oliveira, Juliana Castro e Gisele Barros que me ajudaram com palavras de incentivo e com momentos de descontrações.

A minha sogra Neide, que me auxiliou na condução da minha vida extra-acadêmica.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
1.3 Revisão da Literatura	4
1.3.1 Pele	4
1.3.2 Reparo tecidual	6
1.3.2.2 Fase Inflamatória	7
1.3.2.2 Fase de Proliferação	7
1.3.2.3 Fase de Maturação	9
1.3.3 Produtos Naturais	11
1.3.4 Cnidários	13
1.3.4.1 Zoantídeos	14
CAPÍTULO 2	19
Investigação do reparo tecidual de extratos orgânicos obtidos a partir do muco produzido pelo Zoantídeo <i>Palythoa caribaeorum</i>	
2.1. Resumo	20
2.2 Abstract	21
2.3 Introdução	22
2.4 Material e Métodos	23
2.4.1 Coleta e armazenamento do material biológico	23
2.4.2 Estudos de Reparo tecidual <i>in vivo</i>	24
2.4.2.1 Preparação de extratos etanólico a partir do muco produzido pelo	24

Zoantídeo <i>Palythoa Caribaeorum</i>	
2.4.2.2 Preparação das formulações semi-sólidas tipo gel	24
2.4.2.3 Estudo do reparo tecidual	25
2.4.3 Abordagem Bioquímica e Fitoquímica	26
2.4.3.1 Preparação de extratos orgânicos	26
2.4.3.2 Determinação de proteínas	27
2.4.3.3 Determinação de carboidratos	28
2.4.3.4 <i>Screening</i> Fitoquímico	28
2.5 Resultados e Discussão	30
2.5.1 Estudo do reparo tecidual em lesões induzidas em ratos Wistar	30
2.5.2 Análises histopatológicas e histomorfométricas das feridas cirúrgicas durante o reparo tecidual	34
2.5.3 Abordagem bioquímica e fitoquímica de extratos orgânicos obtidos do muco produzido pelo Zoantídeo <i>Palythoa caribaeorum</i>	39
2.5.3.1 Determinação de proteínas	39
2.5.3.2 Determinação de carboidratos	39
2.5.3.3 <i>Screening</i> fitoquímico	40
2.6 Conclusões	45
2.7 Agradecimentos	45
2.8 Referências	46
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	xvi

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Diagrama esquemático da estrutura da pele (OLIVEIRA, 2009).	04
Figura 1.2	Diagrama esquemático das camadas da epiderme (OLIVEIRA, 2009).	05
Figura 1.3	Representação esquemática das fases da cicatrização de feridas cutâneas (VITORINO FILHO, 2011).	10
Figura 1.4	<i>Palythoa caribaeorum</i> . a) Colônias organizadas em tapetes na superfície do recife, b) Pólipos abertos (colônias submersas) c) Pólipos retraídos (colônias expostas) (MELO et al., 2012)	15
Figura 1.5	Praias localizadas no litoral sul do estado de Pernambuco, que possuem colônias de <i>Palythoa caribaeorum</i> . a) Piedade, b) Guadalupe, c) Suape (MELO et al., 2012).	16
Figura 2.1	Microfotografia da ferida cirúrgica após o PO ao longo do tratamento: (1) = 3 dias PO; (2) = 7 dias PO; (3) = 14 dias PO. Grupos experimentais: A= Gel - base; B= Gel-extrato etanólico obtido a partir do muco produzido pelo zoantídeo <i>Palythoa caribaeorum</i> .	32
Figura 2.2	Avaliação das áreas calculadas das feridas cirúrgicas nos grupos experimentais: Gel base; Gel:extrato etanólico obtido a partir do muco produzido pelo Zoantídeo <i>Palythoa caribaeorum</i> . Os dados representados em $M \pm D.P$ (n=3)	33
Figura 2.3	Análise histológica de feridas cirúrgicas ao 7º dia PO: (A) Controle (Gel –base), (B) Tratado (Gel- extrato etanólico). Legenda: Crosta fibrino-leucocitária (C), Tecido de Granulação (G), Fibroblasto (FB), célula inflamatória (CI) e vaso sanguíneo (VS), Fibras colágenas (FC). Coloração H.E e Picrosírius (40X e 400X).	35
Figura 2.4	Análise histológica de feridas cirúrgicas ao 14º dia PO: (A) Controle (Gel base), (B) Tratado (Gel: extrato etanólico). Legenda: Crosta fibrinoleucocitária (C), Reepitelização (R), Fibroblasto (FB). Coloração H.E e Picrosírius (40X e 400X).	36
Figura 2.5	Análise histomorfométrica das feridas cirúrgicas obtidas a partir dos grupos experimentais controle e tratado. Os animais foram tratados com: A= Células inflamatórias, B= Vasos sanguíneos, C=Fibroblastos,	38

D= Fibras colágenas.

Figura 2.6	Fotografia dos extratos após análise qualitativa de carboidrato pelo método de DNS: (A) DNS, (B) DNS + extrato etanólico (C) DNS + extrato aquoso.	40
Figura 2.7	Fotografia dos extratos após análise qualitativa de carboidrato pelo método de DNS: (A) DNS (B) DNS + extrato hidrometanólico.	40
Figura 2.8	Cromatograma dos extratos para determinação de Proantocianidina. Legenda: 1- Extrato N-butanol; 2- Extrato Metanólico; 3- Extrato de Acetato de Etila; 4- Extrato Aquoso; 5- Padrão: Epicatequina.	41
Figura 2.9	Cromatograma dos extratos para determinação de Alcalóide. Legenda: 1- Extrato N-butanol; 2- Extrato Metanólico; 3- Extrato de Acetato de Etila; 4- Extrato Aquoso; 5- Padrão: Pilocarpina.	41
Figura 2.10	Cromatograma dos extratos para determinação de Ácido Gálico. Legenda: 1- Extrato N-butanol; 2- Extrato Metanólico; 3- Extrato de Acetato de Etila; 4- Extrato Aquoso; 5- Padrão: Ácido Gálico.	42
Figura 2.11	Cromatograma dos extratos para determinação de Terpeno. Legenda: 1- Extrato N-butanol; 2- Extrato Metanólico; 3- Extrato de Acetato de Etila; 4- Extrato Aquoso; 5- Padrão: β -sitosterol.	42
Figura 2.12	Cromatograma dos extratos para determinação de Flavanóides. Legenda: 1- Extrato N-butanol; 2- Extrato Metanólico; 3- Extrato de Acetato de Etila; 4- Extrato Aquoso; 5- Padrão: Luteolina; 6 Padrão: Quercetina.	42
Figura 2.13	Cromatograma dos extratos para determinação de Açúcares. Legenda: 1- Extrato N-butanol; 2- Extrato Acetato de Etila; 3- Extrato de Aquoso metanólico; 4- Extrato Aquoso Final; Padrões: 5 - Glicose; 6 – Sacarose; 7 – Galactose; 8 - Manose; 9 – Ribose.	43
Figura 2.14	Cromatograma dos extratos para determinação de Açúcares depois da Hidrólise. Legenda: 1- Extrato Etanólico; 2- Extrato Aquoso final; 3- Extrato Aquoso metanólico. 4- Extrato Etanólico antes da hidrólise. Padrões: 5 - Galactose; 6 – Sacarose; 7 - Maltose; 8 - Glicose	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Preparação da formulação semi-sólida tipo gel de Natrosol (50 g)	25
Tabela 2.2	Identificação dos metabólitos do muco produzido pelo <i>Palythoa caribaeorum</i> em CCD, tipo de extratos, sistemas de solventes, reveladores e padrões.	30
Tabela 2.3	Percentual médio de contração da ferida nos grupos experimentais (n=2) (M±DP).	33
Tabela 2.4	Determinação de proteínas totais dos extratos orgânicos obtidos a partir do muco produzido pelo zoantídeo pelo método colorimétrico de Lowry.	39
Tabela 2.5	<i>Screening</i> fitoquímico dos extratos orgânicos obtidos do muco produzido pelo zoantídeo <i>Palythoa caribaeorum</i> : Legenda: (X) Não realizado, (-) Ausência do metabólito,(+) Presença do metabólito.	44

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Grama
ml	Militro
mg	Miligrama
%	Por cento
m	Metro
mm	Milimetro
Na	Sódio
K	Potássio
Kg	Kilograma
DL ₅₀	Dose Letal
µg	Micrograma
°C	Grau Celsius
±	Mais/menos
rpm	Rotação por minuto
nm	Nanometro
p/v	Peso por volume
h	Hora
mm ³	Milimetro Cúbico
pH	Potencial Hidrogeniônico
R _f	Relação de frente

LISTA DE ABREVIATURAS

PMN	Polimorfonucleares
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
TGF- β	Fator Beta de Crescimento Transformante
PDGF	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
PN	Produtos Naturais
QPN	Química de Produtos Naturais
PNM	Produtos Naturais Marinhos
PS	Polissacarídeos Sulfatados
PTX	Palitoxina
DNS	Ácido Dinitrossalicílico
PEG	Propilenoglicol
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
H.E.	Hematoxilina-Eosina
PO	Pós-operatório
PPT	Proteínas Totais

RESUMO

Palythoa caribaeorum é um zoantídeo abundante no litoral pernambucano que produz um muco, popularmente conhecido como “baba-de-boi”, capaz de proteger a colônia da dessecação. Estudos demonstram relevante ação microbiológica, hemaglutinantes e importante ação inibitória da hemorragia induzida por peçonhas de jararacas. Ademais, relatos populares descrevem a sua ação cicatrizante. Desta maneira, este trabalho visa avaliar a ação cicatrizante de extratos orgânicos do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa Caribaeorum* em ratos Wistar e investigar os componentes destes extratos através de uma abordagem fitoquímica. Para tal proposta o muco foi coletado na Praia de Suape localizada no litoral sul do estado de Pernambuco. As amostras foram concentradas por centrifugações e liofilizadas. Para os estudos fitoquímicos, o líofilo foi submetido à extração em metanol, n-butanol, acetato de etila e água e em seguida analisado por cromatografia em camada delgada. Para os ensaios de cicatrização, o material liofilizado foi submetido à extração a frio em etanol (85%) e em seguida o extrato foi incorporado em formulações semi-sólidas tipo gel de Natrosol®. O tratamento tópico foi realizado diariamente após o procedimento cirúrgico utilizando 0.04g de extrato/1g de gel e as áreas das lesões foram aferidas com um paquímetro digital. Em tempos pré-determinados (3, 7 e 14 dias) os animais foram sacrificados, as áreas das lesões removidas, fixadas e processadas para análises histológicas. Os resultados evidenciaram que a cada 1g/ml de amostra bruta liofilizada, havia uma concentração de proteínas totais de $1,857 \pm 0,05$ mg/ml no liofilizado, $0,493 \pm 0,004$ mg/ml no extrato etanólico, $1,074 \text{ mg/ml} \pm 0,013$ mg/ml no extrato aquoso metanólico, $0,982 \pm 0,027$ mg/ml no extrato aquoso final e $0,718 \pm 0,026$ mg/ml no extrato metanólico. Após estudo fitoquímico foi observada a presença de terpeno no extrato acetato etílico e uma marcante presença de açúcares redutores nos extratos aquosos, metanólico, n-butanólico e etanólico. Os resultados demonstraram negativos para proantocianidinas, flavonoides e ácido gálico. O estudo de reparo tecidual com formulações semi-sólidas contendo extrato etanólico revelou a presença de crosta, aumento da proliferação fibroblástica e vascular, além de evidente reepitelização e colagenização ao longo do tratamento. Assim, o extrato do muco do *Palythoa caribaeorum* demonstrou ser capaz de auxiliar o reparo tecidual em feridas cutâneas aberta em ratos Wistar.

PALAVRAS-CHAVE: Zoantídeo, *Palythoa caribaeorum*, reparo tecidual, fitoquímica.

ABSTRACT

Palythoa caribaeorum is a zoanthid abundant in Pernambuco coast that produces mucus, popularly known as "bull's-baba", that can protect the colony from desiccation. Studies demonstrate relevant microbiological action, binder in human erythrocytes and important inhibitory action of venom-induced hemorrhage of pit vipers. Moreover, popular accounts describe their healing action. Thus, this study aims to evaluate the healing action of organic extracts of mucus produced by zoanthid *Palythoa caribaeorum* in rats and investigate the components of these extracts through a phytochemical approach. To this proposal the sputum was collected at Praia de Suape located on the southern coast of the state of Pernambuco. The samples were concentrated by centrifugation and lyophilized. In the phytochemical studies, the liofilo was subjected to extraction with methanol, n-butanol, ethyl acetate and water and then analyzed by thin layer chromatography. For assays healing, the lyophilized material was subjected to extraction with cold ethanol (85%) and then the extract was incorporated into semi-solid formulations of gel-like Natrosol®. Topical treatment was performed daily after surgery using 0.04g of extrato/1g gel and the areas of the lesions were measured with a caliper. At predetermined times (3, 7 and 14 days) the animals were sacrificed, the areas of the lesions removed, fixed and processed for histological analysis. The results showed that in each 1g/ml crude lyophilized sample, there was a total protein concentration of 1.857 ± 0.05 mg / ml in lyophilized, 0.493 ± 0.004 mg / ml in ethanol extract, 1.074 mg / ml ± 0.013 mg / ml methanol in aqueous extract, 0.982 ± 0.027 mg / ml in the final aqueous extract and 0.718 ± 0.026 mg / ml in methanol extract. After phytochemical study was observed the presence of terpene ethyl acetate extract and a marked presence of sugars in aqueous extracts, methanol, ethanol and n-butanolic. The results showed negative for proanthocyanidins, flavonoids and gallic acid. The study of tissue repair with semi-solid formulations containing ethanol extract revealed the presence of crust, increased fibroblast proliferation and vascular as well as significant reepithelialization and collagen throughout the treatment. So, extract the mucus *Palythoa caribaeorum* proved able to assist tissue repair in skin wounds open in Wistar rats.

Keywords: Zoanthid, *Palythoa caribaeorum*, tissue repair, phytochemistry.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

A principal barreira de proteção do organismo humano é a pele, desenvolvendo além da função de proteção física, a defesa contra agentes externos e nocivos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Uma ferida é instalada quando há interrupção da continuidade da pele, estando associada ao processo inflamatório. Normalmente esse processo é autolimitante, envolvendo algumas etapas como: remoção de células mortas, depuração de células de resposta aguda e regeneração da matriz extracelular, a qual culmina com a cicatrização tecidual (OLIVEIRA, 2009).

Uma das características universais dos organismos vivos é a capacidade de autoregeneração. A cicatrização de feridas é um dos fatos que têm despertado bastante interesse e várias são as pesquisas que visam compreender este evento, e desta forma otimizar este processo (VITORINO FILHO, 2011).

Apesar da diversidade terapêutica de substâncias sintéticas existentes e disponíveis atualmente no mercado, nos últimos anos tem surgindo um maior interesse, por parte de profissionais de saúde, no que se refere à substâncias oriundas de produtos naturais provenientes tanto de vegetais como animais. Os produtos naturais são parte das atividades sociais, econômicas e culturais das comunidades costeiras do Brasil, sendo utilizados como fonte de alimento, de produtos cosméticos e da medicina popular. O Nordeste brasileiro possui a maior costa tropical e consequentemente uma grande quantidade de animais marinhos, possuindo assim uma rica medicina popular, sendo os animais marinhos usados desde o século 17 para esses fins (MELO, et al 2012).

Os zoantídeos são animais pertencentes aos cnidários, exclusivamente marinhos e que habitam os recifes costeiros. A espécie *Palythoa caribaerum* é o zoantídeo mais abundante no litoral pernambucano, se destacando pelo fato de que quando expostos a baixa

maré produzem através de seus pólipos um muco popularmente conhecido como “baba-de-boi”, que tem como finalidade proteger a colônia da dessecação (SOARES et al., 2006).

A comunidade de pescadores do litoral sul pernambucano tradicionalmente utiliza este muco com a finalidade de atuação analgésica, anti-inflamatória, além do tratamento de feridas tópicas (MELO et al, 2012).

Considerando-se os constantes tipos de traumas a que todos são submetidos, considera-se que os estudos que possam contribuir para o conhecimento acerca do processo de reparação de lesões revestem-se de importância.

No início na década de 60, produtos naturais marinhos começaram a ser pesquisados, porém são escassas as informações e publicações científicas sobre substâncias que compõem esses produtos e suas possíveis ações biológicas (SOARES et al., 2006).

Em recentes estudos realizados avaliando o uso tópico do muco bruto no processo de reparo tecidual em ratos Wistar, evidenciou-se um aumento relativo da proliferação fibroblástica e vascular nos tecidos tratados, além de uma evidente reepitelização e colagenização. Estes dados comprovam o efeito benéfico deste muco no processo cicatricial de feridas cutâneas aberta em ratos (SILVA et al., 2010). Dessa forma, o estudo deste muco liberado pelo *P. caribaeorum* no processo de cicatrização de feridas cutâneas permanece ainda campo aberto a estudos. Além disso, é necessário que se amplie o estudo experimental em animais com frações isoladas de componentes presentes neste muco, responsáveis pela influência positiva no processo de reparação de tecidos.

Baseado neste fato, o objetivo desta trabalho foi avaliar a propriedade cicatrizante de extratos orgânicos obtidos a partir do muco produzido pelo *P. caribaeorum* e investigar seus componentes através de uma abordagem fitoquímica.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Avaliação da propriedade cicatrizante de extratos orgânicos do muco produzido pelo Zoantídeo *Palythoa Caribaeorum* em ratos Wistar.

1.2.2. Objetivos específicos

- Realizar a coleta do muco produzido Zoantídeo *Palythoa Caribaeorum*;
- Preparar extratos orgânicos do muco produzido pelo Zoantídeo *Palythoa Caribaeorum*;
- Avaliar o processo de reparo de extratos orgânicos obtidos em ratos;
- Realizar a abordagem bioquímica e fitoquímica de extratos orgânicos.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 PELE

A pele é o maior órgão do organismo humano recobrindo todo o corpo, sendo dividida em duas camadas diferenciadas, porém unidas entre si, através de uma camada basal, a epiderme mais externa, e a derme mais interna (BLANES, 2004).

Segundo Junqueira e Carneiro (2004) a pele desempenha várias funções como a proteção do organismo contra o atrito e a desidratação, recebe informações do ambiente e transfere para o sistema nervoso central, participa da termorregulação e excreção de substâncias, protege o corpo dos raios ultravioletas, sintetiza vitamina D₃, apresenta células do sistema imunológico protegendo o corpo contra microrganismos.

A epiderme é constituída por três tipos de células: Queratinócitos, Melanócitos e células de Langerhans, já a derme é formada por tecido conjuntivo, conforme esquematizado na Figura 1.1 (BLANES, 2004).

A depender da espessura da epiderme podemos classificar a pele em espessa e fina, sendo a primeira encontrada na palma da mão, planta dos pés e em algumas articulações, e a última é comum nas outras partes do corpo. A hipoderme localizada logo abaixo da derme tem como função ligar a pele aos órgãos subjacentes, além de outras funções. (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

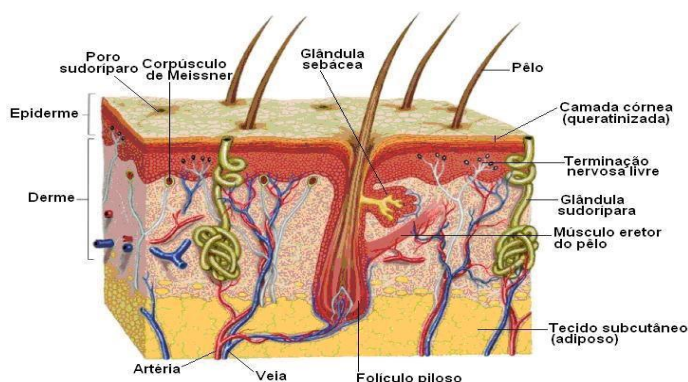


Figura 1.1 Diagrama esquemático da estrutura da pele

Fonte: OLIVEIRA, 2009

A epiderme se divide em cinco subcamadas (Figura 1.2) denominadas: camada basal (segundo Junqueira e Carneiro, 2006, também é denominada germinativa), espinhosa, granulosa, lúcida e córnea, sendo um importante órgão sensorial. A derme por sua vez apresenta vasos sanguíneos e linfáticos, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, pêlos e terminações nervosas, além de diversas células como: fibroblastos, mastócitos, monócitos, macrófagos, plasmócitos entre outros (ALVES, MACHADO, NORONHA, 2011).

As camadas basal e espinhosa são responsáveis pela renovação da epiderme, provável a cada 15 a 30 dias, possuindo grande atividade mitótica (bem maior na basal do que na espinhosa). Essas camadas mais internas contêm filamentos de queratina. Ademais, a camada espinhosa possui desmossomos que juntamente com a queratina mantêm a coesão das células da epiderme e resistência ao atrito (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

A camada córnea possui em sua constituição células escamosas (composta de queratina), que gera uma proteção contra traumas em geral, já os melanócitos protegem a pele dos efeitos dos raios ultravioleta, e os queratinócitos por sua vez formam uma barreira de proteção aos microrganismos e regulam a entrada de água (BLANES, 2004).

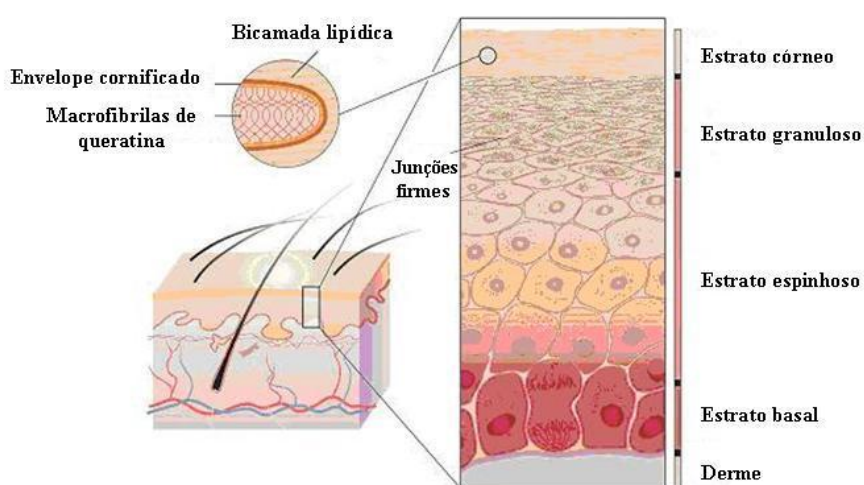


Figura 1.2. Diagrama esquemático das camadas da epiderme

Fonte: OLIVEIRA, 2009.

A membrana basal está presente entre a derme e a epiderme que é constituída por proteínas que se originam tanto de queratinócitos como de fibroblastos dérmicos, além de vários tipos de colágeno, subunidades de integrinas e proteoglicanos. A derme é uma camada de tecido conjuntivo onde se situa os anexos da pele, muitos vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos, além de conter uma malha de colágeno, sendo essa

menos compacta que a membrana basal, além de possuir a maior concentração de imunócitos da pele, particularmente visível dentro das áreas perivasculares, fibroblastos, fibrócitos e células inflamatórias como macrófagos, mastócitos e leucócitos (BLANES, 2004; OLIVEIRA, 2009).

Tendo em vista o funcionamento fisiológico da pele e as determinadas funções de seus componentes, é importante conhecer quais são os danos ocorridos durante a instalação de um ferimento, e a partir daí definir a atuação de alguns compostos, neste caso o muco produzido pelo *P. caribaeorum*, sobre o processo cicatricial.

1.3.2 REPARO TECIDUAL

Uma ferida se caracteriza pela lesão de um tecido corpóreo, em variadas extensões, podendo ser causada por traumas físicos, químicos, mecânicos ou por afecções clínicas. Podem ser classificadas em agudas e crônicas, levando em consideração o tempo para que haja reparação tecidual, as agudas são derivadas de processos cirúrgicos ou traumas ocorrendo reparo tissular em tempo estabelecido sem complicações. Por outro lado, as crônicas não são capazes de ser reparadas em tempo definido, podendo apresentar complicações (BLANES, 2004).

Segundo Sampaio (2009) as feridas podem acometer a epiderme, parte da derme ou toda a derme e a camada subcutânea da pele, gerando assim lesões superficiais, de espessura parcial ou total, respectivamente. A depender da profundidade da lesão, vão ser iniciados diferentes eventos para efetivação da cicatrização. Assim, em feridas superficiais e de espessura parcial ocorre migração de células epidérmicas em direção à superfície e restabelecimento das células epiteliais.

A cicatrização de ferida ocorre por primeira intenção, havendo junção imediata das bordas, segunda intenção ficando as bordas separadas necessitando de tecido cicatricial, e terceira intenção com fechamento secundário de uma ferida através de suturas (VITORINO FILHO, 2011).

A reparação de feridas consiste em uma perfeita e organizada sequência de eventos celulares e moleculares interligados que objetivam a restauração do tecido danificado. Esse evento se caracteriza como um processo eficaz que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportem de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular (HENRIQUE MANDELBAUM, DI SANTIS e SANT'ANA MANDELBAUM, 2003).

Após um traumatismo tecidual, os processos dinâmicos que denominam a cicatrização têm início com uma resposta inflamatória aguda, edema e presença de exsudato seroso que

provoca a morte celular e de estruturas como vasos sanguíneos, sendo este evento continuado com a coagulação (ALVES, MACHADO, NORONHA, 2011).

Nos organismos superiores após a formação da ferida ocorre o reparo do tecido de duas formas: (1) pela regeneração com a recomposição da atividade funcional do tecido ou (2) pela cicatrização com restabelecimento da homeostasia do tecido com perda da sua atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005).

Os eventos ocorridos no processo de cicatrização não possuem marcos específicos que demonstram o início ou término da fase em questão, porém existem acontecimentos que os caracterizam e assim definem as fases para que haja uma melhor apresentação didática, gerando assim várias definições de fases do processo de cicatrização, variando entre autores suas definições para que se tenha uma melhor explanação sobre o assunto.

Classicamente o processo cicatricial é dividido em três processos distintos: fase inflamatória, proliferativa e de remodelagem ou maturação, ocorrendo simultaneamente, porém, de forma independente (OLIVEIRA, 2009).

1.3.2.1 FASE INFLAMATÓRIA

Esta fase configura-se pela ocorrência de fenômenos vasculares e químicos, ocorrendo, entre eles o aumento da permeabilidade vascular, liberando localmente histamina e serotonina, bradicinina e a chegada de granulócitos e monócitos, sendo os primeiros importantes na remoção de resíduos celulares no local da agressão (AMORIM *et al.*, 2006).

O aumento do fluxo sanguíneo no local gera os sinais flogísticos que caracterizam a inflamação, como calor e rubor, associado a isso a permeabilidade capilar causa extravasamento de líquido gerando edema (TAZIMA, VICENTE, MORIYA, 2008).

A fase inflamatória tem duração de 48 a 72 horas, sendo um dos primeiros eventos a hemostasia, que se prolonga por até 15 minutos, ocorrendo após a ocorrência da ferida, preenchendo a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas (OLIVEIRA, 2009).

Simultaneamente à ocorrência da lesão, a estimulação nervosa e a ação de mediadores, ocorre a vasoconstrição, iniciando uma sequência de processos que começam com a deposição de plaquetas. Posteriormente há ativação de plaquetas, ao passo que novas plaquetas vão sendo recrutadas, desta forma origina-se com função de tamponar a lesão endotelial. Este trombo logo é invadido por fibrina passando a ser

denominado como trombo fibrinoso que captam eritrócitos formando o trombo vermelho responsável pela oclusão do vaso sanguíneo rompido (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005).

A inflamação depende de alguns mediadores químicos e células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos. Os leucócitos polimorfonucleados responsáveis pela fagocitose das bactérias, chegam no momento da injúria e ficam até cerca de três a cinco dias. Os macrófagos presente do terceiro ao décimo dia pós lesão, fagocitam bactérias e corpos estranhos além de orientar a formação do tecido de granulação. Já os linfócitos possuem importante influência sobre a atuação dos macrófagos aparecendo no sítio da ferida por volta de uma semana pós trauma (HENRIQUE MANDELBAUM, DI SANTIS e SANT'ANA MANDELBAUM, 2003).

Os macrófagos se destacam por serem células grandes, originadas dos monócitos, que agem de forma fundamental para que haja o processo de reparo tecidual, pois este além de atuarem na eliminação de bactérias juntamente com os neutrófilos, fagocitam o tecido necrótico promovendo assim o desbridamento da ferida e liberam sinalizadores que favorecem a chegada de mais macrófagos no local, intensificando a migração e proliferação de fibroblastos e células endoteliais, além de produzir fatores de crescimento (entre eles fator de crescimento endotelial). Os Fibroblastos são importantes para a cicatrização sendo o principal componente do tecido de granulação e as células epiteliais são eficazes em gerar a angiogênese (VITORINO FILHO, 2011).

Segundo Carvalho (2002) a migração e coordenação dos fibroblastos e macrófagos para a cicatrização, são influenciados por fatores de crescimento, onde pode-se destacar: fator de crescimento epidermal (EGF), fator beta de crescimento transformante (TGF- β) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (Figura 1.3).

1.3.2.2 FASE DE PROLIFERAÇÃO

A segunda fase, iniciada 72 horas após a instalação da ferida, caracteriza-se por reepitelização, neo-angiogênese, deposição de matriz e síntese de colágeno (VITORINO FILHO, 2011). Nesta fase, ocorrem intensa migração e proliferação celular, principalmente de fibroblastos e queratinócitos (OLIVEIRA, 2009).

Na fase de reepitelização ocorre a migração, de queratinócitos não danificados das bordas da ferida, sendo este fato dependente da quantidade de água no leito da ferida, neste momento os fatores de crescimento são responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio (HENRIQUE MANDELBAUM, DI SANTIS e SANT'ANA

MANDELBAUM, 2003). As células da primeira camada formada sofrem divisão mitótica originando camadas adicionais (VITORINO FILHO, 2011).

A angiogênese se destaca por ser uma fase fundamental do processo cicatricial, onde novos vasos sanguíneos são formados a partir dos já existentes com a função de participarem da formação do tecido de granulação provisório, suprindo o mesmo de nutrientes e oxigênio (MENDONÇA, COUTINHO-NETO, 2009).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é responsável por estimular a fase da angiogênese, que se caracteriza pela migração de células endoteliais e formação de capilares fundamentais para o processo cicatricial (CAMPOS, BORGES-BRANCO e GROTH, 2007). Segundo o mesmo autor, a fase proliferativa finaliza com a formação de tecido de granulação, sendo os fibroblastos e as células endoteliais as principais células da fase.

Na ferida que já se encontra em procedimento de cura, os fibroblastos das margens saudáveis da ferida, que são sintetizadores de colágeno que dão origem ao tecido de granulação, começam a migrar para o leito da ferida, determinando a ocorrência de um processo denominado de fibroplasia (CARVALHO, 2002). Os fibroblastos se destacam não só por ser produtor de colágeno, mas por sintetizarem também elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, que exercem a atividade de desbridamento e remodelamento fisiológico (HENRIQUE MANDELBAUM, DI SANTIS e SANT'ANA MANDELBAUM, 2003).

1.3.2.3 FASE DE MATURAÇÃO

Esta é a última fase da cicatrização que se caracteriza pela oclusão da ferida, organização dos capilares, diminuição do número de fibroblastos, ao passo que o colágeno vai sendo produzido (AMORIM *et al.*, 2006).

O colágeno recém-formado possui uma estrutura mais fina do que o presente no tecido normal, porém com o passar do tempo é reabsorvido e um colágeno mais espesso é formado e organizado ao longo das linhas de tensão, aumentando a força tênsil da ferida. Simultaneamente a esta fase, os fibroblastos e leucócitos produzem collagenases que promovem a lise da matriz antiga, desta forma diz-se que a cicatrização obteve sucesso quando há um equilíbrio entre a formação da nova matriz e a ruptura da antiga, sendo sempre a deposição superior a deteriorização (CAMPOS, BORGES-BRANCO e GROTH, 2007).

Alguns eventos favorecem o aumento da força cicatricial e diminuir a espessura, como: reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas, reabsorção de água. Ao passo que a cicatriz vai se consolidando a neovascularização diminui, e tardiamente a cicatriz é considerada avascular (HENRIQUE MANDELBAUM, DI SANTIS e SANT'ANA MANDELBAUM, 2003).

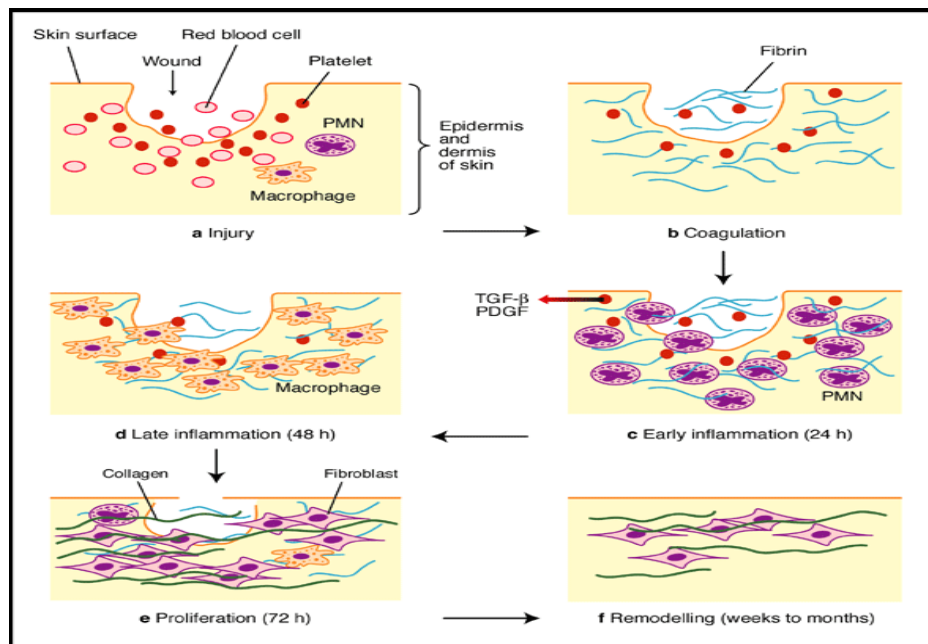


Figura 1.3 Representação esquemática das fases da cicatrização de feridas cutâneas

Fonte: VITORINO FILHO, 2011.

Nota: (a) Logo após instalação da ferida, há o extravasamento de vasos sanguíneos danificados e aminas vasoativas migram para dentro da derme. Aumenta-se por um tempo a permeabilidade vascular para permitir que PMN, plaquetas e proteínas plasmáticas se infiltrem no ferimento. Logo em seguida ocorre vasoconstrição em resposta aos fatores liberados por estas células. (b) Ocorre a coagulação do agregado plaquetário com fibrina depositada na ferida, esta última quando convertida em fibrinogênio. (c) Vários fatores são liberados pelas plaquetas, dentre eles o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformante β (TGF- β), que atraem neutrófilos PMN para a ferida, sinalizando o início da inflamação. (d) Após 48 horas, macrófagos substituem os neutrófilos PMN tornando-se a principal célula inflamatória. Juntos, macrófagos e neutrófilos PMN removem detritos da ferida, liberam fatores de crescimento e iniciam a reorganização da matriz extracelular. (e) A fase de proliferação inicia por volta de 72 horas com os fibroblastos, recrutados para a ferida por fatores de crescimento liberados pelas células inflamatórias, iniciando a síntese de colágeno. (f) Embora a taxa de síntese de colágeno desacelere após cerca de três semanas, a reticulação e reorganização do colágeno ocorrem por meses após a injúria na fase de remodelação do reparo.

Fonte: Adaptado de Vitorino Filho, 2011.

O tratamento das feridas tem como objetivo evoluir para a cicatrização, um processo fisiológico cujo objetivo é reparar os tecidos agredidos, porém isso dependerá da medicação escolhida, que na maior parte visa cuidar e prevenir infecções (CARNEIRO, SOUSA, GAMA, 2010). Deste modo, é de grande interesse o desenvolvimento ou extração de compostos que favoreçam partes do processo de cicatrização, no intuito de utilizá-los nas terapêuticas como objetivo a redução de feridas cutâneas.

1.3.3 PRODUTOS NATURAIS

Plantas medicinais e/ou produtos oriundos de animais são utilizados desde a antiguidade até os dias atuais em todo o mundo para o tratamento de enfermidades humanas. Esta opção medicamentosa, fitoterapia, tem se mostrado uma alternativa eficaz para a maioria dos povos do mundo. Principalmente no Brasil, esta expansão se demonstrou por vários motivos como: existência de efeitos colaterais de fármacos sintéticos, preferência de tratamentos naturais, validação de princípio ativo de espécies vegetais, menor custo, novos métodos analíticos a dispor de controles de qualidade, aperfeiçoamentos dos produtos fitoterápicos (MARTINS et al, 2007).

Atualmente a pesquisa com produtos naturais (PN) tem se tornado uma das mais produtivas na área da química no Brasil, principalmente por conta da biodiversidade atribuída a este país, além de fatores históricos. Este fato é favorecido pela formação atual dos pesquisadores, associado à infraestrutura dos laboratórios que contribuem para o desenvolvimento de pesquisas de qualidade na área (PUPO, GALLO E VIEIRA, 2007).

Devido à grande extensão de seu litoral, flora e maior floresta equatorial e tropical úmida do mundo, o Brasil tem se destacado nessa área, sendo a química dos produtos naturais (QPN) a área mais antiga e com maior número de pesquisadores dentro da química. Nesta vertente, com maior número de trabalhos, se destacam a área de isolamento e identificação de substâncias, podendo ser associados a ensaios biológicos (PINTO et al., 2002).

Os povos primitivos e indígenas proporcionaram um aprofundado conhecimento sobre características químicas de produtos advindos da natureza, o que foi de fundamental importância para a descoberta de substâncias tóxicas e também de outras medicamentosas. Desta forma a pesquisa com PN se desenvolveu, trazendo a tona o saber sobre estruturas químicas, relações entre elas e propriedades biológicas das mesmas. Pode ser que o grande marco para o desenvolvimento dos fármacos, a partir de produtos naturais, tenha

sido a descoberta de propriedades analgésicas e antipiréticas do extrato de *Salix Alba*, através de observações clínicas (VIEGAS JÚNIOR, BOLZANI e BARREIROS, 2006).

Nas décadas 70 e 80, um grande número de metabólitos secundários de algas foram isoladas e caracterizadas com uma ampla diversidade estrutural advinda de vários tipos diferenciados de algas, na qual a maioria apresentou diversas atividades biológicas (TEIXEIRA, KELECOM e GOTTLIEB, 1991).

Ainda muito recentemente, início da década de 60, os produtos naturais marinhos começaram a ser pesquisados, porém são escassas as informações e publicações científicas sobre substâncias que compõem esses produtos e suas possíveis ações biológicas (SOARES et al., 2006).

As pesquisas pioneiras em busca de produtos naturais marinhos (PNM) focavam na presença de polissacarídeos sulfatados (PS) em algas marinhas. As algas marinhas apresentam grande quantidade de PS, moléculas que se destacam por suas funções biológicas, como: anticoagulante, antitrombótica, antiviral, antitumoral, antiproliferativa e anti-inflamatória (SABOYA, et al., 2012). Desta forma se inicia a pesquisa com PNM com atividade biológica.

A síntese de compostos como polissacarídeos, tem despertado grande interesse na biotecnologia de PN, tendo em vista as suas propriedades geleificantes, espessantes e estabilizantes de misturas aquosas e emulsões na indústria de alimentos na bioprospecção de novos agentes farmacológicos e na prevenção do estresse no cultivo de organismos aquáticos (RODRIGUES et al., 2010).

O estudo dessas macromoléculas é justificado devido suas diversas atividades biológicas, tais como anticoagulante, antitrombótica e imunoestimulante, despertando assim grande interesse nas ciências médicas e na biotecnologia de organismos aquáticos (FARIAS et al., 2009).

Nos últimos anos tem ocorrido a maior intenção em incorporar extratos vegetais de ação farmacológica comprovada e características conhecidas, em produtos de aplicação tópica. Para uma eficaz utilização, esses produtos devem ser padronizados qualitativamente e quantitativamente, exigindo rigoroso estudo que determinem suas condições de obtenção do extrato, composição e outros fatores importantes, com rigorosos controles de qualidade (BANOV et al., 2006).

Garros et al. (2006) utilizou extrato de *Passiflora edulis* em feridas produzidas em ratos, e pôde concluir que o uso tópico deste extrato estimulou uma maior colagenização nos animais, além de aumentar a proliferação fibroblástica. Estudo semelhante observou efeito favorável do extrato aquoso do mesocarpo do babaçu em nível microscópico do

processo de cicatrização, nas variáveis mononucleares e fibras colágenas, em todos os dias e entre os grupos testados (MARTINS *et al.*, 2006).

Pesquisa recente mostrou a eficácia do uso de extrato da *Musa sapientum* no leito das feridas, com grande poder de cicatrização quando comparado ao grupo controle, além disso o estudo em questão comparou este extrato com *Aloe Vera*, colagenase, substâncias utilizadas em protocolos definidos no tratamento de feridas (ALVES, MACHADO, NORONHA, 2011).

Atualmente há um grande interesse no isolamento e identificação de compostos ativos naturais, os quais apresentam diversas e potentes atividades biológicas.

Ainda assim, há uma baixa produtividade e pesquisas no que se refere à identificação de PN que poderão ser útil como instrumento para pesquisa biológica ou como protótipos de fármacos e outras substâncias de interesse (PUPO, GALLO E VIEIRA, 2007).

Dentre as substâncias naturais utilizadas no auxílio da cicatrização de feridas cutâneas destacam-se a tintura de confrei (*Symphytum officinale* L.) (CARVALHO *et al.*, 1991), a papaína (SANCHEZ NETO, 1993; NOGUEIRA *et al.*, 2005), a babosa (*Aloe vera*) associada ao própolis (DORNELES *et al.*, 2003), o açúcar adicionado ao mel (PRATA *et al.*, 1988) a calêndula (*Calendula officinalis*) (FERNANDES, 2003; NETO *et al.*, 1996), extrato aquoso do trigo (*Triticum vulgare*) (MATERA *et al.*, 2002), óleo de girassol (*Helianthus annuus*) (MARQUES *et al.*, 2004), a arnica (*Solidago microglossa* DC) (NETO, 2001), rosa mosqueta (*Rosa aff. rubiginosa*) (MARCHINI *et al.*, 1988).

Na última década o estudo químico e farmacológico de organismos marinhos tem despertado o interesse de muitos, e desta forma favorecendo a descoberta de novas substâncias químicas bioativas que possam apresentar um uso terapêutico. Este tipo de pesquisa foi negligenciado por muitos anos no Brasil, embora este seja um país com um vasto território, porém possui como principal foco de estudo as plantas. Assim sendo, a fauna brasileira tão pouco conhecida, ainda tem muito a ser trilhada, a partir de estudos que visem à caracterização de PNM bioativos inovadores (KOSSUGA *et al.*, 2007).

1.3.4 CNIDÁRIOS

O termo Cnidaria origina-se do grego “knide”, que significa “urtiga”, denominando assim o filo que se caracteriza por animais em cujo tecido encontram-se células urticantes denominadas cnidócitos. Estes animais vêm causando interesse farmacológico devido à sua composição química já conhecida (NEVES *et al.*, 2007).

São animais diploblásticos, com apenas dois epitélios (epiderme e gastroderme) separados por uma camada denominada mesogléia. Possuem apenas uma cavidade corpórea denominada cavidade gastrovascular com apenas uma abertura para o ambiente, a boca (RABELLO, 2007)

Em sua predominância, os cnidários habitam águas rasas, e as formas sésseis são abundantes nas costas rochosas ou nas formações coralinas nas águas tropicais, além de ser um grupo de animais marinhos, porém apresentam representantes, como hidras e alguns poucos hidrozoários, que são dulcícolas (RUPPERT, 2004).

O filo Cnidaria é subdividido em 4 classes: Hydrozoa (hidras, hidróides, hidromedusas, caravelas), Scyphozoa (águas-vivas), Cubozoa (medusas altas, cubiformes) e Anthozoa (anêmonas-do-mar, corais, gorgonáceos) (BARNES et al., 1995).

Os animais que representam o filo Cnidário são bastante diversificados apresentando uma organização corporal que pode ser em forma de pólipos e/ou de medusa. Alguns se destacam por possuírem apenas a forma de pólipos no ciclo de vida, como é o caso do subfilo Anthozozoa, com a classe Anthozoa, outros apresentam alternância entre pólipos e medusa o subfilo Medusozoa, com as classes Cubozoa, Hydrozoa, Scyphozoa e Staurozoa (DA SILVEIRA e MORANDINI, 2011).

Os Cnidários antozoários são um grupo de organismos que apresenta grande variedade de formas, tamanhos e cores, presentes em todo o mundo de formas coloniais ou solitárias, abissais ou em regiões costeiras (SOARES et al., 2006).

O litoral tropical é definido por dois grupamentos principais: estuários e recifes, este último são cerca de 15% do fundo marinho entre 0 e 30 m de profundidade, se destacando pelo aspecto físico – protegendo as regiões costeiras da ação do mar; Biológico – pela abundância de organismos; e Bioquímico – Produzindo matéria-prima para pesquisa na área da química e farmacologia (RABELLO, 2007).

1.3.4.1 Zoantídeos

A Família Zoanthidae refere-se a um grupo de organismos sésseis predominantes nas regiões tropicais, especialmente em formações de recifes, estes organismos ficam expostos a alteração da maré (subida e descida), podendo ficar por longo período emersos (RABELLO, 2007).

Segundo Soares et al. (2006), os zoantídeos são cnidários polipóides que habitam as zonas costeiras, sendo exclusivamente de vida marinha, sendo o gênero *Palythoa* caracterizado pela incorporação de grão de sedimento nos tecidos da parede corporal, já a

espécie *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) forma suas colônias como um “tapete” que ficam submersos (Figura 1.4 – a), porém quando expostos ao longo da maré baixa, tem a capacidade de produzir um muco (popularmente conhecido como baba-de-boi) com a finalidade de proteger-se da dessecação.

O *P. caribaeorum* (Figura 1.4 – b) é o antozoário com a maior taxa de crescimento, podendo crescer sobre quase todos os invertebrados sésseis no recife, sendo considerado um ótimo competidor nos ecossistemas (SUCHANEK e GREEN, 1981). Existe unicamente sob a forma pólipos e vive em colônia de ambientes recifais até 10 m de profundidade (KOEHL, 1977). Os pólipos, com medidas entre 5 e 10 mm de diâmetro, formam um tapete unidos firmemente uns aos outros pelo cenénquima espesso onde só o disco oral é aparente (Figura 1.4 – c) (BOSCOLO e SILVEIRA, 2005).



Figura 1.4 - *Palythoa caribaeorum*. a) Colônias organizadas em tapetes na superfície do recife, b) Pólipos abertos (colônias submersas) c) Pólipos retraídos (colônias expostas).

Fonte: MELO *et al.*, 2012

A espécie *P. caribaeorum* é comum na zona entre marés rasa e na região sublitoral (RABELLO, 2007). Esta espécie possui uma ampla distribuição no atlântico, sendo um concorrente agressivo à animais que convivam no mesmo ambiente, competindo por recursos vitais, além de ser mais tolerante à variabilidade ambiental alta, porém ainda existem diversos processos ecológicos e efeitos que este poderia cumprir na estrutura de comunidades de recifes, que abrangem seu domínio, que ainda permanecem desconhecidos (MEDONCA-NETO *et al.*, 2008).

As colônias de *P. Caribaeorum* são bem desenvolvidas e distribuídas nos recifes brasileiros, sendo que sua distribuição e composição variam conforme o ambiente geral e geográfico, diferenciando os processos ecológicos e os diversos tipos de comunidades, assim, se apresentam em recifes rochosos na costa sudeste brasileiro, já no litoral nordestino, os elementos dominantes são recifes de corais e de arenito (MEDONCA-NETO *et al.*, 2008).

Os três locais onde o *P. Caribaeorum* tem maior predominância no litoral pernambucano apresentam características diferentes: Piedade (Figura 1.5 – a) é uma praia urbana influenciada pela atividade humana; Guadalupe (Figura 1.5 – b) é uma área protegida ambientalmente, e Suape (Figura 1.5 – c) é uma praia, sob a influência de um complexo industrial portuário. Resultados de estudo desenvolvido por Melo *et al.* (2012), confirmam a hipótese de que diferentes formas de pressão ambiental exerce uma influência direta sobre a biossíntese de metabólitos secundários e são responsáveis pela inibição, produção, ou ambos, de substâncias tóxicas, bem como as alterações na estrutura química de moléculas bioativas.



Figura 1.5 - Praias localizadas no litoral sul do estado de Pernambuco, que possuem colônias de *Palythoa caribaeorum*. a) Piedade, b) Guadalupe, c) Suape

Fonte: MELO *et al.*, 2012

Há relatos populares, principalmente de pescadores, que utilizam o “baba-de-boi” como analgésico e antiinflamatório tópico, sendo o muco aplicado diretamente sobre as feridas. Porém estudos sobre a espécie *P. caribaeorum* e seus componentes bioativos ainda são poucos explorados, tendo como objetivo central nesta área o estudo da palitoxina (PTX) e seus análogos, que são metabólitos secundários não protéicos altamente tóxico, que tem como ação principal o bloqueio da Na⁺/K⁺-ATPase e formação de poros permeáveis a cátions nas membranas plasmáticas (NOBRE *et al.*, 2008).

A PTX, é descrita como a mais potente toxina marinha, sendo encontrada (ou produzida) principalmente em zoantídeos, ela não afeta todas espécies, certamente pela diferença de resistência/tolerância à metabólitos secundários tóxicos (MEDONCA-NETO *et al.*, 2008).

Os estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos realizados com organismos marinhos baseiam-se no estudo dos metabólitos secundários (terpenos, alcalóides, esteróides, alguns peptídeos cíclicos, etc.). Os estudos com cnidários tiveram um aumento a partir do início dos anos 60 com o descobrimento das prostaglandinas em várias espécies

de corais moles do Caribe, em particular *Plexaura homomalla* (Weinheimer & Spraggins, 1969), colocando em evidência o potencial destes organismos como produtores de compostos de interesse biológico e farmacológico (SOARES *et al.*, 2006).

Há alguns anos, amostras de *P. caribaeorum* vêm sendo coletadas em diferentes trechos do litoral sul pernambucano e submetidas a estudos farmacológicos. Em 2006, Soares *et al.* observaram que as populações pernambucanas de *P. caribaeorum* não apresentavam toxicidade em camundongos (nenhuma mortalidade observada com doses de até 2000 mg/Kg) e não induziam efeitos deletérios nos sistemas nervoso central e autônomo. Ainda neste estudo, os pesquisadores identificaram uma significativa atividade analgésica em camundongos quando tratados com extratos hidroacoólicos deste zoantídeo.

Dando continuidade aos estudos toxicológicos, ainda em 2006, Melo *et al.* testou amostras das praias de Piedade, Suape e Guadalupe frente a *Artemia salina*, observando toxicidade relevante (DL_{50} de 24,2 $\mu\text{g/mL}$) em apenas uma amostra coletada em Guadalupe, em época chuvosa. Entretanto, análises cromatográficas dos extratos da amostra não demonstraram a presença de palitoxina ou análogos. Por outro lado, estas análises demonstraram moléculas majoritárias de baixa toxicidade, correspondente à uma mistura ternária de esteróides do núcleo colestano.

A baixa toxicidade das amostras coletadas no litoral pernambucano corrobora com os relatos populares. Segundo Soares *et al.* (2006), principalmente pescadores do litoral sul, utilizam o muco liberado pelo *P. caribaeorum* para estancar sangramentos e como analgésico e antiinflamatório tópicos, sendo o muco aplicado diretamente sobre as feridas abertas. Os relatos afirmam que o muco também acelera a cicatrização destas feridas.

Além do efeito direto sobre o processo de cicatrização, Nobre *et al.* (2008), trabalhando com amostras dializadas e não dializadas do muco obtiveram interessantes efeitos, traduzidos por uma forte atividade aglutinante sobre hemácias humanas e ainda uma importante ação inibitória de hemorragia.

Recentes ensaios realizados utilizando o uso tópico do muco bruto produzido pelo zoantídeo em questão, sobre o processo de reparo tecidual, demonstraram um aumento relativo da proliferação fibroblástica e vascular nos tecidos tratados, além de uma evidente reepitelização e colagenização (SILVA *et al.*, 2010).

Estas descrições ressaltam a riqueza deste material como fonte de compostos biologicamente ativos, se fazendo necessárias investigações mais profundas sobre as propriedades farmacológicas deste muco liberado pelo *P. caribaeorum*. Estudos nesta vertente se mostram inovadores, tendo grande impacto econômico e social (já que utiliza

produto natural e bastante abundante no litoral brasileiro), além de utilizar inovações biotecnológicas aplicadas à saúde.

CAPÍTULO 2

ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY

Investigação do reparo tecidual de extratos orgânicos do muco produzido pelo Zoantídeo *Palythoa caribaeorum*

Soraia Lins de Arruda Costa ^{1,2,5}, Francisco Carlos Amanajás ², Jeanne Claine de
Albuquerque Modesto², Carlos Daniel Perez³; Nicácio Henrique da Silva³, Mariane Cajubá
de Britto Lira⁵, Noemia Pereira da Silva Santos^{2,5*}

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente - Centro Acadêmico de
Vitória/UFPE; ²Laboratório de Biotecnologia e Fármacos - Centro Acadêmico de
Vitória/UFPE; ³Laboratório de Biodiversidade - Centro Acadêmico de Vitória/UFPE;
⁴Laboratório de Química de Produtos Naturais - Departamento de Química/UFMS;
⁵Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)/UFPE, Recife-PE, Brasil.

* Autor para correspondência:

Dra. Noemia Pereira da Silva Santos
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Centro Acadêmico de Vitória (CAV)
Laboratório de Biotecnologia e Fármacos
Rua Alto do Reservatório, S/N, Bela Vista,
55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil
Tel: +55-81-3523 3351 (fone/fax)
E-mail: noemia.santos@pq.cnpq.br

2.1 RESUMO

Palythoa caribaeorum é um zoantídeo abundante no litoral pernambucano que produz um muco, capaz de proteger a colônia da dessecação, popularmente conhecido como “baba-de-boi”. Estudos demonstram relevante ação microbiológica, aglutinante em hemácias humanas e importante ação inibitória da hemorragia induzida por peçonhas de jararacas. Ademais, relatos populares descrevem a ação cicatrizante. Este trabalho visa avaliar a ação cicatrizante de extratos orgânicos do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa Caribaeorum*. O muco foi coletado na Praia de Suape, litoral sul de Pernambuco. As amostras foram concentradas por centrifugações e liofilizadas. Para os ensaios de cicatrização, o líófilo foi submetido à extração a frio em etanol (85%) e em seguida incorporada em formulações semi-sólidas tipo gel de Natrosol®. O tratamento tópico foi realizado diariamente após o procedimento cirúrgico utilizando solução tópica tipo gel com 4% de extrato. Em tempos pré-determinados, os animais foram sacrificados, as áreas das lesões removidas, fixadas e processadas para análises histomorfológicas. Para os estudos fitoquímicos, o líófilo foi submetido à extração por esgotamento a frio em metanol, n-butanol, acetato de etila e água e em seguida analisado por cromatografia em camada delgada. O estudo de reparo tecidual revelou a presença de crosta, aumento da proliferação fibroblástica e vascular, além de evidente reepitelização e colagenização ao longo do tratamento. Nos ensaios fotoquímicos foram evidenciadas a presença de terpeno e uma marcante presença de frações de açúcares redutores. Os resultados demonstraram negativos para proantocianidinas, flavonoides e ácido gálico. Assim, o extrato do muco do *Palythoa caribaeorum* demonstrou ser capaz de auxiliar o reparo tecidual de feridas abertas em ratos Wistar.

PALAVRAS-CHAVE: Zoantídeo, *Palythoa caribaeorum*, reparo tecidual, fitoquímica.

2.2 ABSTRACT

Palythoa caribaerum is a zoanthid abundant in Pernambuco coast that produce mucus, which can protect the colony from desiccation, popularly known as "baba-de-boi". Studies demonstrate relevant microbiological action, binder in human erythrocytes and important inhibitory action of venom-induced hemorrhage of pit vipers. Moreover, popular accounts describe the healing action. This study aims to evaluate the healing action of organic extracts of mucus produced by zoanthid *Palythoa caribaeorum*. The mucus was collected at Praia de Suape, southern coast of Pernambuco. The samples were concentrated by centrifugation and lyophilized. For tests with cicatrization, liófilo was subjected to extraction with cold ethanol (85%) and then incorporated into semi-solid formulations of gel-like Natrosol®. Topical treatment was performed daily after surgery using gel with 4% de extract. At predetermined times, animals were sacrificed, the areas of the lesions removed, fixed and processed for histomorphological analysis. For phytochemical studies, the lyophilo was subjected to extraction by depletion cold methanol, n-butanol, ethyl acetate and water and then analyzed by thin layer chromatography. The study of repair tissue revealed the presence of crust, increased fibroblast proliferation and vascular as well as significant reepithelialization and collagen throughout the treatment. In photochemical tests showed the presence of terpene and a marked presence of fractions of reducing sugars. The results showed negative for proanthocyanidins, flavonoids and gallic acid. So, extract the mucus *Palythoa caribaeorum* proved able to assist tissue repair open wounds in Wistar rats.

Keywords: Zoanthid, *Palythoa caribaeorum*, tissue repair, phytochemistry.

2.3 INTRODUÇÃO

O objetivo do processo de cicatrização, após uma lesão nos tecidos é o de restaurar a continuidade entre as margens da lesão e restabelecer a função dos tecidos lesados (RIBAS *et al.*, 2006). A principal barreira de proteção do organismo humano é a pele, desenvolvendo além da função de proteção física, a defesa contra agentes externos e nocivos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Uma ferida é instalada quando há interrupção da continuidade da pele, estando associada a processo inflamatório. Normalmente esse processo é autolimitante, envolvendo algumas etapas como: remoção de células mortas, depuração de células de resposta aguda e regeneração da matriz extracelular, a qual culmina com a cicatrização tecidual (OLIVEIRA, 2009).

Uma das características comuns aos organismos vivos é a capacidade de autoregeneração. A cicatrização de feridas é um dos fatos que têm despertado bastante interesse e várias são as pesquisas que visam compreender este evento e desta forma otimizar este processo (VITORINO FILHO, 2011).

Apesar de uma vasta diversidade terapêutica de substâncias sintéticas existentes e disponíveis atualmente no mercado, nos últimos anos tem surgindo um maior interesse por parte de profissionais de saúde no que se refere a substâncias oriundas de produtos naturais, provenientes tanto de vegetais como animais (GARROS *et al.*, 2006). Nas últimas décadas, novas pesquisas vêm sendo desenvolvidas no intuito de elucidar a ação de novos agentes naturais no processo de reparo de tecidos.

Os zoantídeos são animais pertencentes aos cnidários, exclusivamente marinhos e que habitam os recifes costeiros (SOARES *et al.*, 2006). A espécie *Palythoa caribaeorum* é o zoantídeo mais abundante no litoral pernambucano, se destacando pelo fato de que quando expostos a baixa maré produzem através de seus pólipos um muco popularmente conhecido como “baba-de-boi”, que tem como finalidade proteger a colônia da dessecação.

Há alguns anos, amostras de *P. caribaeorum* vêm sendo coletadas em diferentes trechos do litoral sul pernambucano e submetidas a estudos farmacológicos. Em 2006, Soares e colaboradores observaram que as populações pernambucanas de *P. caribaeorum* não apresentavam toxicidade em camundongos até a dose de 2000 mg/Kg. Foi observado que as amostras não induziam efeitos deletérios nos sistemas nervoso central e autônomo. Ainda neste estudo, os pesquisadores identificaram uma significativa atividade analgésica em camundongos quando tratados com extratos hidroacoólicos deste zoantídeo. Esta baixa

toxicidade das amostras coletadas no litoral pernambucano corrobora com os relatos populares.

Segundo Soares e colaboradores (2006), pescadores do litoral sul, utilizam o muco liberado pelo *P. caribaeorum* para estancar sangramentos e como analgésico e antiinflamatório tópicos. Conforme relatos, quando o muco é aplicado diretamente sobre as feridas abertas são visualizados uma rápida aceleração da cicatrização do tecido lesado. Recentes estudos relatam o uso tópico do muco bruto produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, conhecido vulgarmente como “baba-de-boi”, sobre o processo de reparo tecidual em ratos Wistar. Nestes ensaios foram observados um aumento relativo da proliferação fibroblástica e vascular nas feridas cirúrgicas dos animais tratados, além de uma evidente reepitelização e colagenização, demonstrando assim ser capaz de auxiliar no processo de regeneração tecidual (SILVA *et al.*, 2010).

Nobre e colaboradores (2008) também relatam potente atividade aglutinante sobre hemácias humanas e relevante ação inibitória de hemorragia quando foram utilizadas amostras do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum* dializadas e não dializadas.

Desta forma, a busca de componentes bioativos presentes neste muco é de grande interesse para que haja a comprovação de sua ação farmacológica. Com isso, esse estudo objetiva investigar a ação de extrato orgânico (etanólico) do muco produzido pelo *P. caribaeorum* no reparo tecidual.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum* foram coletadas na praia de Suape, situada no litoral sul do estado de Pernambuco. A etapa de coleta foi realizada com a colaboração do Profº Dr. Carlos Daniel Perez (Laboratório de Biodiversidade da UFPE-CAV). O muco foi coletado a partir das colônias, através de estimulação digital (com auxílio de luvas). O material coletado foi transportado em caixas térmicas hermeticamente fechadas e lacradas à 4°C, até o local final do armazenamento (Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami -LIKA/UFPE). As amostras biológicas de muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* coletadas foram submetidas a três ciclos de centrifugação a 5.000 rpm, -4°C, durante 10 minutos, com a finalidade de concentrar a amostra coletada. O material sedimentado foi submetido a congelamento (-80°C), e em seguida liofilizado.

2.4.2 ESTUDOS DE REPARO TECIDUAL *IN VIVO*

2.4.2.1 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS ETANÓLICO A PARTIR DO MUCO PRODUZIDO PELO ZOANTÍDEO *PALYTHOA CARIBAEORUM*

As amostras liofilizadas foram submetidas à extração a frio com etanol a 85%, no intuito de remover tanto os pigmentos como os lipídeos presentes. Desta forma, 1g da amostra liofilizada foi transferido para um recipiente contendo etanol (85%), de forma que toda massa fosse coberta pelo solvente orgânico. Em seguida, o material foi submetido à agitação mecânica do tipo oblíqua, durante 24h a 25°C. Esta etapa foi repetida por duas vezes em todas as amostras. Em seguida, o material resultante foi filtrado com o auxílio de papel de filtro. A amostra em pó resultante foi submetida à evaporação do solvente em dissecador e armazenada para posterior análise de proteína e carboidrato e consequentemente utilizada para preparação das formulações semisólidas tipo gel para uso tópico nos ensaios *in vivo* de reparo tecidual em ratos Wistar.

2.4.2.2 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS TIPO GEL

Uma base galênica geleificante foi preparada, com característica hidrofílica empregando-se como polímero o hidroximetilcelulose (Natrosol®250) comumente empregado na farmacotécnica de formas farmacêuticas semisólidas. A esta base foi incorporado o extrato etanólico do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum*. Na preparação do gel base foi pesado separadamente o Natrosol®, Propilenoglicol (PEG), Propil Parabeno (Nipazol®), Metil Parabeno (Nipagin®) e água destilada (Figura 2.1). O Nipagin® e Niparsol® foram solubilizados com auxílio de álcool e adicionados juntamente com o Propilenoglicol ao recipiente contendo água destilada sob agitação e aquecidos a 60°C. Em seguida o Natrosol® foi adicionado aos poucos à mistura, o qual permaneceu em agitação por 2 horas até tornar-se completamente geleificada. Na preparação dos géis contendo o extrato etanólico de muco, este foi previamente solubilizado em água e adicionado ao gel sob agitação, ainda durante o processo de geleificação. Obtida a dissolução, a mistura permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 2 horas.

Tabela 2.1- Preparação da formulação semi-sólida tipo gel de Natroso®I (50 g)

COMPONENTES	PESO	%
HEC (Natrosol®)	0,5g	1,0
Nipagim®	0,09g	0,18
Nipazol®	0,01g	0,02
PEG	2,5g	5,0
H ₂ O	45,9g	91,8
Extrato etanólico	1,0g	2,0

2.4.2.3 ESTUDO DO REPARO TECIDUAL

Para os ensaios *in vivo* de reparo tecidual foram utilizados ratos machos Wistar pesando 200 a 300 g, procedentes do Biotério do Departamento de Nutrição, UFPE. Os animais foram mantidos em ambiente ventilado sob a temperatura controlada com ração e água *ad libitum*. Os animais foram acondicionados sob condições de controle de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e mantidos em ciclo de 12h:12h claro:escuro. Os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com o protocolo da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE, Processo nº 23076.022086/2009-90.

Os animais (n=18) foram marcados e separados aleatoriamente em dois grupos experimentais (n=9): A= animais que receberam o tratamento com o gel base (placebo); B= animais que receberam o tratamento com o gel contendo o extrato etanólico do muco. Os grupos experimentais (n=9) foram subdivididos em três subgrupos (n=3) (A, B e C) de acordo com o período de tratamento, 3, 7 e 14 dias, respectivamente. Os subgrupos de animais foram acondicionados em gaiolas plásticas apresentando dimensões de 60x50x22 cm.

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram previamente anestesiados com uma associação de ketamina/xilazina por via intramuscular na dose de 15 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente. Cada animal foi pesado, e disposto em decúbito dorsal sobre a mesa operatória e submetidos à depilação por tração manual. Com auxílio de uma *punch* metálico foi incisado o fragmento cutâneo de 7 mm³ de diâmetro, no centro da área depilada, até a exposição da fáscia muscular dorsal (PRATA et al., 1988). A hemostasia foi realizada através de leve compressão com auxílio de gaze sobre o leito cirúrgico, por cinco minutos (SEGUNDO et al., 2007). As aplicações do gel base e do gel contendo o extrato etanólico do muco (4% de extrato no gel) foram realizadas imediatamente após a cirurgia,

diariamente, uma vez ao dia e no mesmo horário durante os dias determinados (3, 7 e 14 dias).

Todos os animais foram examinados diariamente quanto as suas condições físicas (mobilidade, disenteria e ritmia). Ademais, as feridas foram avaliadas observando-se a presença de crosta, secreção ou necrose. As feridas foram medidas diariamente com o auxílio de um paquímetro digital. Para o cálculo da área das feridas, foi realizada a medição de suas bordas no momento da biópsia, observando-se o maior e menor diâmetro. A partir desses elementos, a área foi calculada, utilizando-se a equação matemática recomendada por Coelho *et al.*, (1999), $A = \pi \cdot R \cdot r$, onde A corresponde a área da ferida; R o raio maior da ferida e r o raio menor da ferida. Neste experimento R e r corresponderam ao raio de ferida no sentido crânio-caudal e látero-lateral, respectivamente. O cálculo do grau de contração foi expresso em percentual, utilizando-se as equações matemáticas propostas por Coelho *et al.* (1999), $100 \times (W_o - W_i) / W_o = M \pm DP$, onde : W_o = área inicial da ferida; W_i = área da ferida no dia da biópsia (3, 7 e 14 dias).

Em tempos pré-determinados os animais foram sacrificados por eutanásia com overdose de anestésico (urethane 1,25 g/kg), em seguida as áreas das lesões foram removidas e conservadas em solução de formaldeído tamponada a 10% e posteriormente submetidas à desidratação e diafanização. Os espécimes foram inclusos em blocos de parafina para a realização de cortes em micrótomo. Consecutivamente foram submetidas à coloração com Hematoxilina e Eosina (H.E.) para avaliação histológica do processo de cicatrização, contabilizando-se as células inflamatórias, fibroblastos, presença de vasos sanguíneos, e a coloração Picrosírius - Hematoxilina foi utilizada para subsequente avaliação da porcentagem de fibras colágenas existentes nos locais de fibrose do interstício.

A análise histopatológica foi realizada utilizando um sistema de captura de imagens composto por uma câmera fotográfica Nikon acoplada a um computador. Através do software ScopePhoto, foram definidos campos para contagem das células. Nas análises morfométricas, as células inflamatórias, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas foram contabilizados em software estatístico GMC .

Os dados foram expressos como média e desvio padrão, e testes com análise de variância (ANOVA). O teste T Student foi empregado para comparar as significâncias estatísticas entre os grupos controle e experimentais $P > 0.05$.

2.4.3 ABORDAGEM BIOQUÍMICA E FITOQUÍMICA

2.4.3.1 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS ORGÂNICOS

As amostras brutas, após processo de concentração por centrifugação e liofilização foram pesadas para o preparo dos extratos metanólico, aquoso, n-butanólico e acetato de etila. A extração se iniciou com a adição de metanol sob infusão, permanecendo sob agitação por 20 minutos. Em seguida o material foi filtrado e mantido em metanol. Ao material restante foi adicionada uma nova quantidade de metanol sendo repetido o processo por mais uma vez. O filtrado metanólico foi rotaevaporado até secura. O extrato metanólico foi ressuspenso com água destilada até um volume final de 80 mL. O extrato aquoso foi particionado em funil de decantação, onde foi adicionado o mesmo volume de acetato de etila (1:1). Após separação das fases, foi decantada a fração de acetato de etila e repetido, para o extrato aquoso, o procedimento com o n-butanol. Por fim, o extrato aquoso foi liofilizado, sendo este denominado de extrato aquoso final, e os extratos com acetato de etila e n-butanol foram rotaevaporados, até um volume final aproximadamente de 30 mL, em seguida estes extratos foram utilizados para a pesquisa fitoquímica, através de cromatografia de camada delgada (CCD).

2.4.3.2 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para se determinar a presença de proteínas totais nos extratos orgânicos obtidos do muco produzido *Palythoa caribaeorum* foi utilizado o método quantitativo de Lowry (1951). O princípio deste método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, reagente Folin-Ciocalteu, que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do cobre e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

Para determinação da curva padrão uma solução estoque de albumina (1 mg/mL) foi preparada. A partir da solução foram obtidas amostras nas concentrações finais de 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg/ml. A partir das diluições obtidas, foram retiradas alíquotas de 200 µl e distribuídas em 7 tubos de ensaio. Em seguida foram adicionado 2 mL da solução A [Tartarato de Sódio e Potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a 2% (p/v), Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 1% (p/v) e Carbonato de Sódio Anidro a 2% em NaOH 0,1M (Na_2CO_3)], permanecendo em repouso por 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados 200 µl da solução B (reagente de Folin com água destilada), colocando as amostras em repouso por 30 minutos.

Para amostra branca foi adicionado em tudo de ensaio, 200 µl de água destilada, 2 mL a solução A e 200 µl da solução B. Para quantificar a presença de proteínas presente nas amostras do muco, foi realizada uma pré-diluição da amostra em água destilada (obtendo uma concentração de 1mg/ml). Em um tubo de ensaio foram adicionados 200 µl da

amostra e acrescentaram-se 2 ml da solução A e 200 µl da solução B, obedecendo o tempo determinado para cada fase. Em seguida as alíquotas foram levadas ao espectrofotômetro para leitura em absorbância de 750 nm. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

2.4.3.3 DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS

As amostras brutas liofilizadas e extratos orgânicos obtidos do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, foram submetidas a método qualitativo do Ácido 3,5 Dinitrissalicílico (DNS), proposto por Miller (1959), no intuito de se detectar a presença de carboidratos. Este reagente é utilizado para detectar a redução de hidratos de carbono, detectando-se a presença de carboidratos em amostras biológicas. Este é um método qualitativo de coloração, que afirma se há ou não moléculas redutoras na amostra com base na cor da mistura e em sua absorbância. A cor inicial é modificada quando se mistura o reagente DNS e a amostra, submetendo a aquecimento em banho-maria a 100°C durante 10 minutos.

Para identificar a presença de carboidratos nas amostras do muco, foi realizada uma pré-diluição da amostra em água (10 mg amostra/10 ml H₂O). Em tubo de ensaio adicionou-se 1ml da amostra e em seguida 1 ml do reagente DNS. Consequentemente as amostras foram submetidas a aquecimento em banho-Maria a 100°C durante 10 minutos. No intuito de padronizar a análise, uma alíquota de 1 ml (1 mg/ml) de amido solubilizado em água foi adicionado a 1ml de reagente DNS. Este foi utilizado como controle (presença de açúcares redutores). Sabe-se, portanto, que um resultado positivo apresenta uma coloração escurecida (avermelhada), determinando assim a presença de açúcares redutores na amostra. A absorbância que caracteriza a presença de carboidrato redutor na amostra deve ser superior a 1,0 quando determinada a 540 nm por espectrofotometria. Quando não há redução, a cor se mantém amarela e a absorbância varia entre 0,03 – 0,5.

2.4.3.4 SCREENING FITOQUÍMICO

Para abordagem fitoquímica foram preparados extratos etanólico, acetato de etílico, metanólico, n-butanólico e aquoso por esgotamento a frio.

A amostra bruta, após liofilizada e pesada, foi submetida a processos de extração por esgotamento a frio utilizando a seguinte série de solventes orgânicos: metanol, aquoso, N-butanol, acetato de etila. A extração se iniciou adicionando o metanol sob infusão, permanecendo em agitação por 20 minutos. A mistura foi filtrada, obtendo-se um filtrado

metanólico. Ao resíduo resultante foi adicionado metanol novamente, repetido o processo por duas vezes. O filtrado metanólico foi rotaevaporado até secar em banho Maria à 40 °C. O extrato metanólico foi ressuspenso em água destilada e permaneceu em agitação por 20 minutos. Parte do extrato aquoso obtido foi denominada extrato hidrometanólico (extrato aquoso advindo do metanol). Uma outra parte foi particionada em funil de decantação, onde foi adicionado o mesmo volume de acetato de etila (1:1). Após separação das fases, foi decantada a fração de acetato de etila e repetido, com extrato aquoso, o procedimento com o n-butanol. Por fim, o extrato aquoso foi liofilizado, sendo este denominado de extrato aquoso final. Os extratos com acetato de etila e n-butanol foram rotaevaporados, em banho Maria a 40 °C até um volume final aproximadamente de 30 mL.

Todos os extratos orgânicos obtidos foram utilizados para a abordagem fitoquímica, através de cromatografia de camada delgada (CCD). Nos ensaios cromatográficos foram aplicados 15 µL de cada extrato orgânico em placas de sílica Gel 60 F254 + 366 Merk (20 x 20 cm). Para o desenvolvimento dos cromatogramas foram aplicadas diversas fases móveis e reagentes adequados evidenciando os principais tipos de metabólitos investigados: alcalóides, terpenóides, flavonóides, proantocianidinas, ácido gálico e açúcares redutores (Tabela 2.2).

Para pesquisa de açúcares foi realizada ainda uma hidrólise com a amostra, com a finalidade de identificar sacarídeos menores (mono e dissacarídeos) nas amostras, nos seguintes extratos: Aquoso e Etanólico. Para tal atividade, o material foi pesado e solubilizado em água destilada, verificando o pH do volume final, sendo este igual a 5,0. O material foi transportado para uma ampola, onde foi adicionado ácido clorídrico e em seguida fechou-se com auxílio de chama quente. A ampola foi levada à estufa por três horas, com temperatura variando entre 90 e 95°C. Após as três horas, a amostra foi dosada com hidróxido de sódio até que o pH permanecesse neutro.

Tabela 2.2 Identificação dos metabólitos do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum* em CCD, tipo de extratos, sistemas de solventes, reveladores e padrões.

Metabólitos	Extrato	Sistema	Revelador	Padrões
Alcalóides	N- butanol, Metanólico, Acetato de Etila e Aquoso	AcOEt- HCOOH- AcOH-H ₂ O	Dragendorff (Detecção de manchas alaranjadas)	Pilocarpina
Proantocianidinas	N- butanol, Metanólico, Acetato de Etila e Aquoso.	AcOET- HCOOH- AcOH- H ₂ O	Vanilina clorídrica (visualização em espectro luz visível)	Epicatequina
Flavonóides Cumarinas	N- butanol, Metanólico, Acetato de Etila e Aquoso.	AcOEt- HCOOH- AcOH- H ₂ O	NEU Bandas fluorescentes para flavonóides e bandas alaranjada, amarela ou verde para cumarinas)	Quercetina e luteolina
Terpenos	N- butanol, Metanólico, Acetato de Etila e Aquoso	Tolueno- acetato	Liebermann Burchard	β-citosterol
Açúcares Redutores	N- butanol, Metanólico, Acetato de Etila e Aquoso	AcET-N- Propanol-H ₂ O	Timol	glicose, galactose, sacarose, manose e ribose
Ácido Gálico	N- butanol, Metanólico, Acetato de Etila e Aquoso	AcOEt- HCOOH- AcOH-H ₂ O	NEU	Ácido gálico

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 ESTUDO DO REPARO TECIDUAL EM LESÕES INDUZIDAS EM RATOS WISTAR

As amostras brutas centrifugadas e liofilizadas do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum* foram submetidas à extração a frio com etanol a 85%. O extrato

etanólico resultante foi incorporado em géis de natrosol® e subsequentemente utilizado nos ensaios de reparo tecidual em ratos machos Wistar.

As formulações em géis de natrosol®, contendo o extrato etanólico do muco obtidas apresentaram, consistência viscosa, cor levemente esverdeado, pH 6.9. Para controle da qualidade do gel, este foi avaliado com período de 7, 15 e 30 dias, onde foi constatado que não houve variação de consistência e do pH (6.9; 6.8; 6.8; respectivamente).

O procedimento operatório realizado nos animais dos grupos experimentais controle e tratado transcorreu sem complicações, não ocorrendo óbitos, sendo a recuperação bem sucedida nos grupos experimentais estudados. Adotaram-se no presente estudo os dias 03, 07 e 14 para análise dos parâmetros. Estudos demonstraram que estes são os dias mais significantes para o estudo do processo de reparação tecidual da pele (GARROS *et al.*, 2006). A região dorsal do rato, escolhida para promover a lesão, tem por finalidade evitar que o próprio animal conseguisse atingi-la, além de ser modelo experimental de ferida cirúrgica aberta bastante conhecida (AUERSVALD, 2001).

As avaliações diárias demonstraram adequada recuperação, presença de atividade física e disposição para alimentarem-se no grupo controle, animais tratados com Gel natrosol® base e grupo tratado com gel natrosol® contendo extrato etanólico do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, respectivamente.

Analizando macroscopicamente a evolução das feridas nos grupos experimentais, não foi observado exsudação até o 14º dia pós operatório (P.O.) nos animais. Segundo Vasconcelos e colaboradores (2007) a formação de exsudato prejudica o processo de reparo tecidual, uma vez que o exsudato é capaz de promover a desagregação do tecido de granulação em formação e o desenvolvimento de micro-organismos. A presença de líquidos em ferimentos interfere no processo de crescimento bacteriano, dificulta a formação de tecido de granulação e repitelização, desta forma os fluidos em feridas interferem negativamente na contração cicatricial (BARBUDO *et al.*, 2001).

No grupo tratado (Gel; extrato etanólico) foi visualizado, a partir do 3º dia P.O. a presença de uma crosta fibrino-leucocitária espessa enquanto no grupo controle (Gel base), uma delicada crosta (figura 2.1). Ao 7º dia de PO (pós-operatório) no grupo tratado ainda foi visualizada uma espessa crosta que se destacou espontaneamente, culminando com uma reepitelização e crescimento de pêlos no 14º dia PO. Conforme a literatura uma ferida ao sofrer agressões é isolada do meio ambiente após ser preenchida por coágulos, fibrinas e exsudato, formando uma crosta que recobre a ferida (MARTINS *et al.*, 2006). Achados histológicos e clínicos consideram a formação de uma crosta maior como sinal positivo no reparo, comprovado histologicamente, apresentando uma maior formação de vasos

sanguíneos, infiltrado inflamatório e fibras colágenas. É importante frisar que a formação de crosta em uma ferida não exsudativa pode favorecer o processo de cicatrização (OLIVEIRA, 1992).

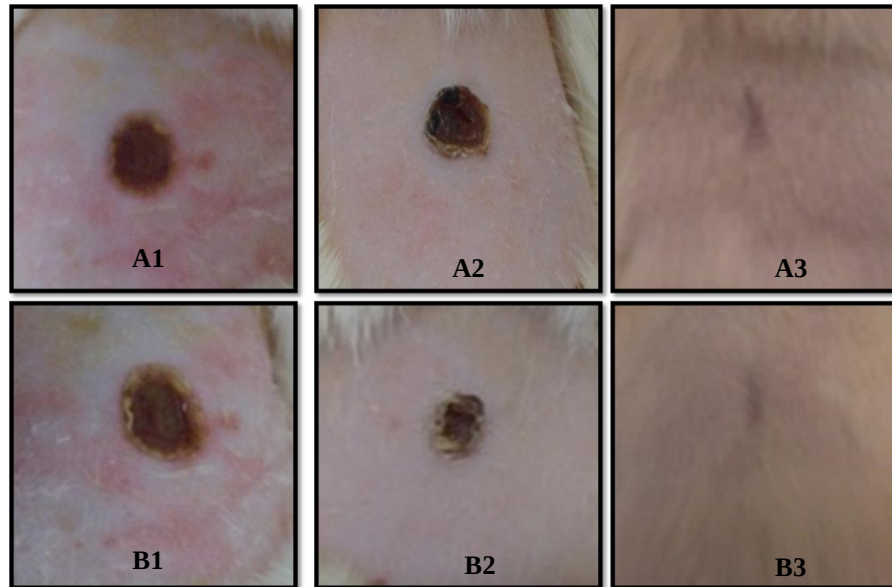


Figura 2.1 Microfotografia da ferida cirúrgica após o PO ao longo do tratamento: (1) = 3 dias PO; (2) = 7 dias PO; (3) = 14 dias PO. Grupos experimentais: A= Gel - base; B= Gel-extrato etanólico obtido a partir do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum*.

Analisando os dados das áreas da ferida nos grupos controle (Gel base) e tratado (Gel: extrato etanólico) foi observado uma diminuição progressiva em ambos os grupos (figura 2.2). Comparando entre grupos observou-se uma redução significativa da área no grupo tratado no 3º e 7º dia PO, evoluindo para o fechamento final da ferida no 12º dia PO, este resultado aponta que o tratamento com o gel extrato etanólico foi capaz de reduzir a área da ferida nos animais tratados significativamente, quando comparado aos animais do grupo controle. Estudos relatam que a partir do 10º dia PO, que as feridas abertas encontram-se praticamente cicatrizadas (ANTONIO, 2005; BARBUDO *et al.*, 2001). Ao 14º dia PO, foi observado que as feridas cutâneas produzidas nos grupos experimentais apresentaram completa redução e crescimento de pêlos quando comparadas ao dia zero. Sabe-se que a redução de áreas em feridas ocorre devido à retração das bordas da lesão por ação das linhas de força, conhecidas como linhas de Langer, determinadas pelos sistemas fibrilares da pele, principalmente das fibras elásticas (COELHO *et al.*, 1999).

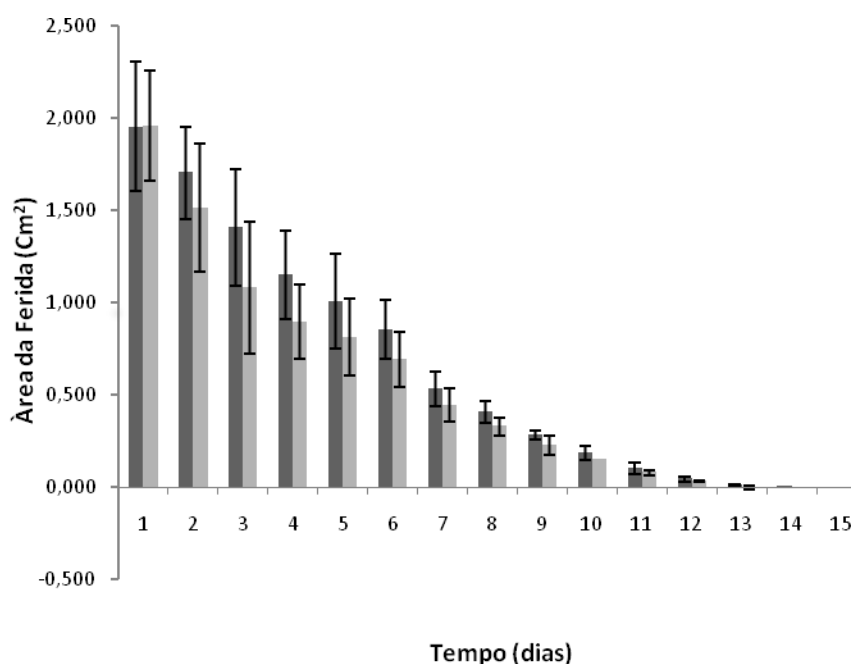


Figura 2.2. Avaliação das áreas calculadas das feridas cirúrgicas nos grupos experimentais: ■ Gel base; ■ Gel:extrato etanólico obtido a partir do muco produzido pelo Zoantídeo *Palythoa caribaeorum*. Os dados representados em $M \pm D.P$ (n=3)

Segundo a literatura a diminuição da área da lesão ocorre devido ao mecanismo de contração dos miofibroblastos, através de seus filamentos de actina que são capazes de reduzir à área da lesão facilitando a re-epitelização (COELHO *et al.*, 1999). A contração do tecido de granulação, também pode ser visualizada pelo percentual médio de contração (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 Percentual médio de contração da ferida nos grupos experimentais (n=2) ($M \pm DP$).

Tempo (Dias)	Gel – Base (%)	Gel - Extrato Etanólico (%)
3	38,42 $\pm$ 7,8	57,05 $\pm$ 8,6
8	77,73 $\pm$ 4,12	83,47 $\pm$ 1,08
15	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00

De acordo com os dados apresentados, pode-se constatar que a contração das feridas cirúrgicas foi mais evidente no grupo tratado, em relação ao grupo controle, evoluindo proporcionalmente ao tempo, esses resultados são concernentes ao encontrado na literatura que afirma que as feridas devem regredir com o tempo (MARTINS *et al.*, 2006). Em relação ao percentual de cicatrização observa-se que quanto mais próximo do fechamento da ferida

cutânea, menor a força de contração, demonstrando que apesar do arranjo da molécula do colágeno exercer efeito na diminuição da área da ferida.

2.5.2 Análises histopatológicas e histomorfométricas das feridas cirúrgicas durante o reparo tecidual

Nas análises histopatológicas das feridas abertas nos animais do grupo controle e tratadas ao do 3º dia PO foi evidenciada em toda extensão, a presença de uma crosta fibrino-leucocitária sobre o tecido de granulação. Esses resultados se demonstram condizente com a literatura. Esses resultados corroboram com os obtidos por Godeiro e colaboradores (2010) os quais estudaram a ação cicatrizante de extratos obtidos de produtos naturais e revelou que os animais tratados apresentavam a presença da crosta fibrino-leucocitária, acentuado infiltrado de células PMN e detritos celulares ao 3º dia PO. A partir do 7º dia PO, o grupo controle que apresentou macroscopicamente uma delicada crosta, demonstrou discreta presença de tecido de granulação, moderada presença de células inflamatórias, proliferação vascular e fibroblástica e uma discreta reepitelização (Figura 2.3). Segundo Sampaio (2009), a reepitelização torna-se mais precoce quando há maior concentração de colágeno, maior número de vasos sanguíneos e precocidade de granulação.

No grupo tratado onde foram evidenciados macroscopicamente uma acentuada crosta fibrino-leucocitária, observou-se uma moderada presença de tecido de granulação e proliferação vascular, intensa presença de células inflamatórias linfoplasmocitária e proliferação de fibroblastos, como também uma reepitelização acentuada.

Segundo a literatura, a formação de crosta em uma ferida não exsudativa favorece o processo de cicatrização (GARROS *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 1992). É na fase inflamatória que se tem a vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, ativação dos fibroblastos e indução da formação do tecido de granulação (SAMPAIO, 2009). Sabe-se, portanto que o fibroblasto, célula fundamental no processo de reparação do conjuntivo, é responsável pela síntese do material intercelular do tecido de granulação (COTRAN *et al.*, 2000). Somente na presença dos fibroblastos é que há diferenciação epidermal e a deposição de proteína laminina, colágeno tipo IV e VII, elementos essenciais no processo cicatricial (EL-GHALBZOURI *et al.*, 2002).

Conforme a literatura o 7º dia PO corresponde ao período de maior número de fibroblastos no tecido (VASCONCELOS *et al.*, 2007; COTRAN *et al.*, 2000). Este evento foi evidenciado de forma intensa no grupo tratado. Observou-se que havia grande quantidade

de fibroblastos proliferados constituindo agregados compactos de células arranjadas de forma multidirecional. Conforme Godeiro e colaboradores (2010), no sétimo dia, constata-se redução de número de células PMN e aumento significativo de macrófagos, vasos sanguíneos e fibroblastos, além de uma intensa hiperplasia epitelial.

Estes achados sugerem que o muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum* beneficia o reparo tecidual, fato este, relatado pelos pescadores da região litorânea do Recife (SOARES *et al.*, 2006).

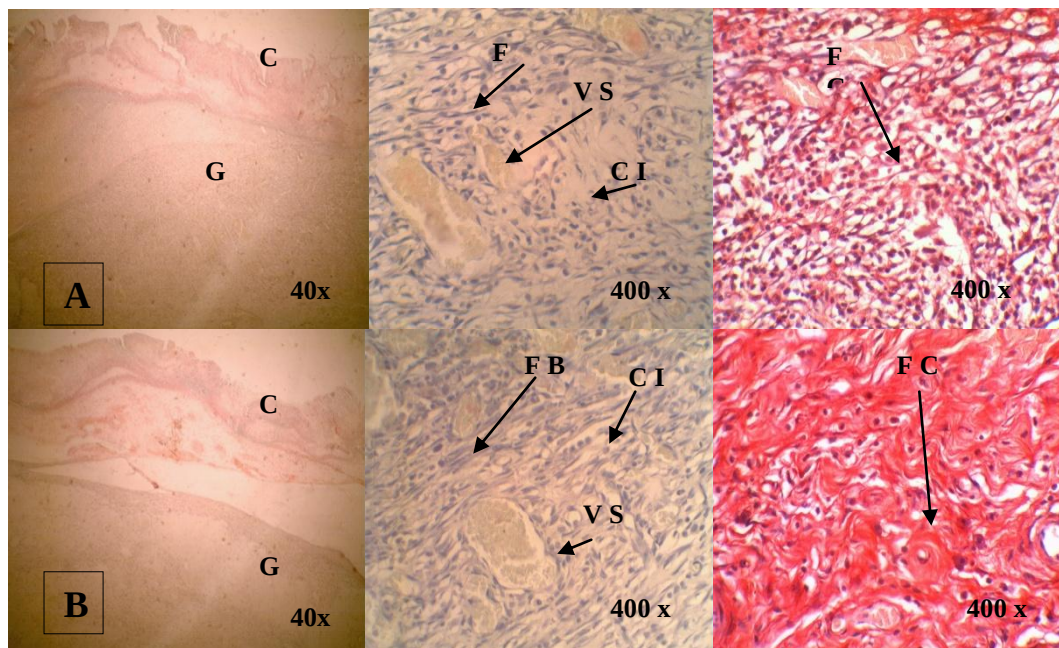


Figura 2.3. Análise histológica de feridas cirúrgicas ao 7º dia PO: (A) Controle (Gel –base), (B) Tratado (Gel- extrato etanólico). Legenda: Crosta fibrino-leucocitária (C), Tecido de Granulação (G), Fibroblasto (FB), célula inflamatória (CI) e vaso sanguíneo (VS), Fibras colágenas (FC). Coloração H.E e Picosírius (40X e 400X).

Ao 14º dia PO o grupo controle apresentou um epitélio quase completamente formado e discreta presença de tecido de granulação, infiltrado inflamatório e uma elevada fibroplasia. No grupo tratado foi evidenciado uma completa formação do epitélio, sem infiltrado inflamatório e intensa fibroplasia, sendo possível observar a presença de intensa vascularização e de tecido conjuntivo neoformado (Figura 2.4). Sabe-se, portanto que a reepitelização e a angiogênese também contribui para resistência inicial. Depois da fase proliferativa inicial, a resistência da ferida cresce significativamente, este aumento na resistência da ferida ocorre durante o período de rápida fibroplasia, e acompanha paralelamente o aumento no conteúdo de colágeno na ferida (COTRAN *et al.*, 2000). À

medida que novas fibras de colágeno vão sendo depositadas, outras são digeridas e removidas pelas collagenases teciduais. Este evento foi evidenciado em ambos grupos experimentais estudados neste trabalho.

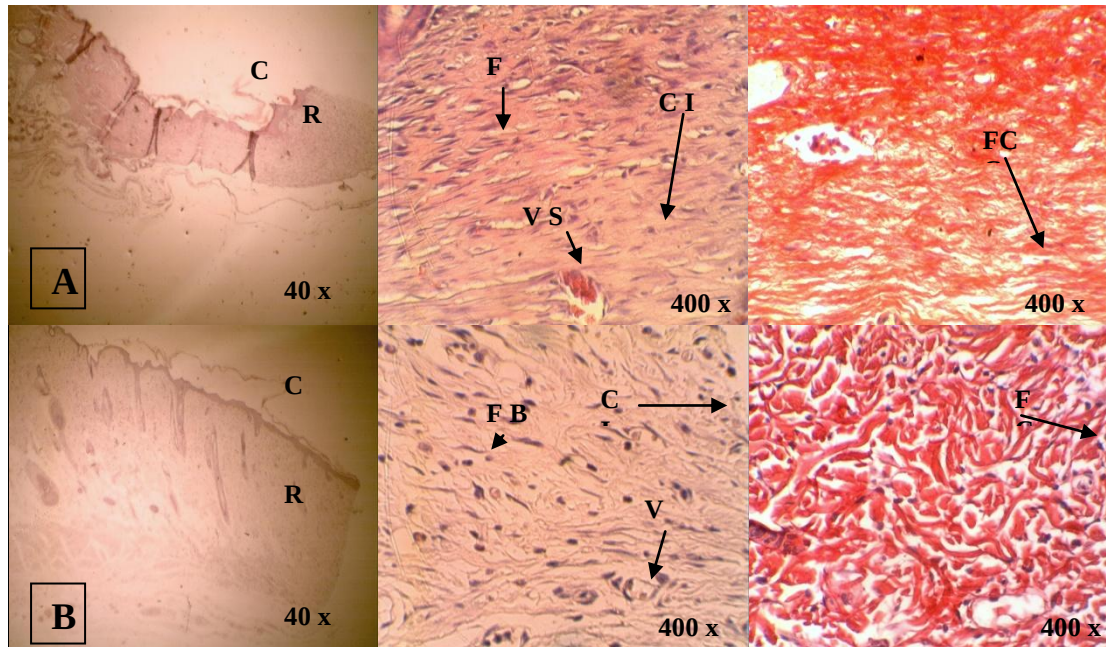


Figura 2.4. Análise histológica de feridas cirúrgicas ao 14º dia PO: (A) Controle (Gel base), (B) Tratado (Gel: extrato etanólico). Legenda: Crosta fibrinoleucocitária (C), Reepitelização (R), Fibroblasto (FB). Coloração H.E e Picrosírius (40X e 400X).

A cicatrização de feridas é um complexo processo multifatorial que resulta em contração periférica da lesão e posterior restauração da função de barreira da pele. O reparo do tecido lesado advém de uma sequência de eventos, que inclui inflamação, proliferação celular, migração de diferentes tipos de células, produção de matriz extracelular e remodelamento do tecido (DEGIM et al, 2002). É na fase inflamatória que se tem a vasodilatação, o aumento da permeabilidade capilar, a ativação dos fibroblastos e a indução da formação do tecido de granulação (AMORIM et al., 2006).

Para melhor comprovações destes dados foram realizadas estudos histomorfométrica de espécimes de tecidos das feridas cirúrgicas após coloração em Hematoxilina-Eosina (H.E) e Picrosírius-Hematoxilina (P.H).

Nos estudos histomorfométrico foi evidenciada uma intensa presença de células inflamatórias ao 3º PO no grupo controle ($307,8 \pm 87,2$), enquanto o grupo tratado demonstrou uma redução significativa ($63,1 \pm 32,2$) (figura 2.3). Todavia ao longo do

tratamento foi evidenciada uma redução significativa da inflamação aguda em ambos os grupos experimentais.

Quanto ao número de vasos sanguíneos observou-se que o grupo tratado demonstrou uma redução significativa aos 3º dia PO ($65,3 \pm 17,4$) quando comparado ao controle ($230,0 \pm 73,9$). Por outro lado não foi evidenciado diferença significativa entre os tempos analisados (7º, 14º dias PO), nos grupos tratados e controle respectivamente (Figuras 2.5) ($p > 0,05$). Sabe-se portanto que a angiogênese aumenta o aporte de nutrientes e o ingresso celular na região afetada promovendo menor tempo de cicatrização (BALBINO et al, 2005).

Sabe-se, que na fase da fibroplasia se dá após 48 horas da lesão. Os fibroblastos se multiplicam e produzem o colágeno. Há também nesta fase, intensa proliferação endotelial, tendo como consequência a formação de tecido de granulação (SANCHEZ et al, 1993). O fibroblasto é uma célula reguladora por apresentar a dupla função de síntese e reabsorção de colágeno, procurando manter o equilíbrio quantitativo e qualitativo desta proteína (SIMÕES et al, 1985).

Nestes estudos foi evidenciado que ao 3º dia PO a proliferação de fibroblastos no grupo tratado apresentou-se maior (147 ± 37) quando comparado ao grupo controle ($40,1 \pm 11$), com diferença significativa entre os grupos ($p < 0,01$) (figura 2.5). Por outro lado entre os 7º e 14º dias PO foram visualizados intensa proliferação de fibroblastos em ambos os grupos experimentais. Como afirma MASINI e colaboradores (1986) a densidade dos fibroblastos alcançam o máximo entre 7º e 14º dias após a injúria, sob a influência de potentes fatores de crescimento. Vale salientar que no grupo tratado com Gel: extrato etanólico foi encontrado valores máximos significativos ($p > 0,05$) de fibroblastos ao 7º dia PO ($168,1 \pm 31,2$), ocorrendo um decréscimo no 14º PO ($137,9 \pm 24,4$). Estes dados estão de acordo com os encontrados na literatura (GARROS et al, 2006). Estes resultados sugerem que o uso tópico do Gel com o extrato etanólico do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum* antecipa a proliferação e o maior número de fibroblastos encontrados no 7º PO no grupo tratado, favorecendo a cicatrização.

Conforme a literatura, o aumento da densidade de fibras colágenas e suas retratações, por sinérese, promovem a redução do diâmetro de certo número de capilares, o endotélio desses vasos prolifera para a luz causando sua obstrução, ocorre a diminuição do fluxo sanguíneo, determinando uma redução dos constituintes do tecido de granulação (COELHO et al., 1999). Concernente a presença de fibras colágenas não foram evidenciadas diferenças significativas do percentual de fibras colágenas nos grupos tratados e controle respectivamente ($p < 0,05$). Ao 7º dia PO, o processo de collagenização apresentou-se similar entre os grupos experimentais ($44,5 \pm 11\%$; $53 \pm 14,3\%$,

respectivamente para os grupos de animais tratados e controle) (figura 2.5 D). Todavia, ao 14º dia PO tornou-se mais intensa em ambos os grupos experimentais, atingindo um percentual de $60 \pm 9,9\%$ e $61,8 \pm 9,6\%$ para os grupos controle e tratado respectivamente, porém um pouco mais acentuada no grupo experimental. Segundo Sampaio (2009), a formação precoce de tecido de granulação é favorecida pela maior concentração de colágeno e vasos sanguíneos.

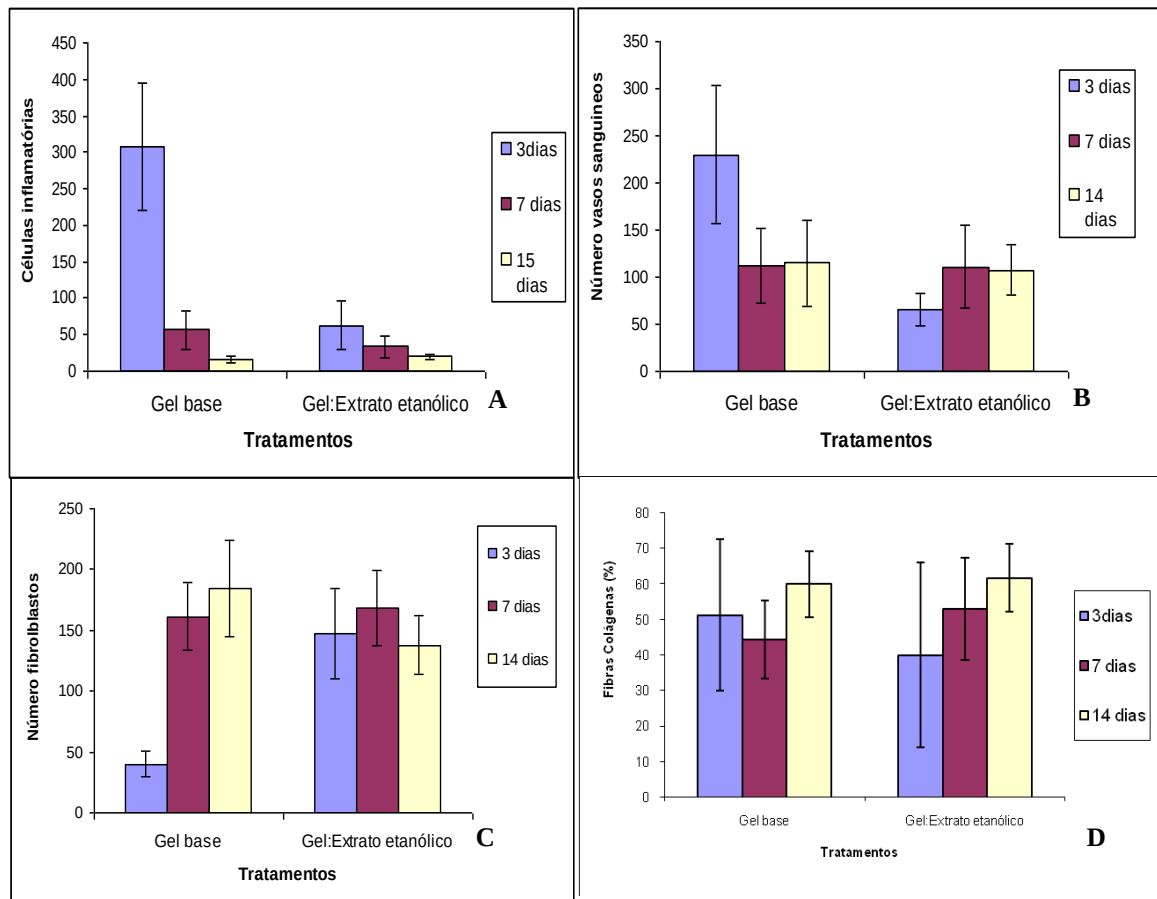


Figura 2.5 Análise histomorfométrica das feridas cirúrgicas obtidas a partir dos grupos experimentais controle e tratado. Os animais foram tratados com: A= Células inflamatórias, B= Vasos sanguíneos, C=Fibroblastos, D= Fibras colágenas

Através destes dados foi possível sugerir que o uso tópico do gel contendo o extrato etanólico do muco produzido pelo *Palythoa caribaeorum* apresentou uma ação direta ou facilitadora na cicatrização.

2.5.3 ABORDAGEM BIOQUÍMICA E FITOQUÍMICA DE EXTRATOS ORGÂNICOS OBTIDOS DO MUCO PRODUZIDO PELO ZOANTÍDEO *PALYTHOA CARIBAEORUM*

2.5.3.1 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A curva padrão foi obtida com o uso de soluções de concentrações conhecidas submetidas às reações colorimétricas específicas, lendo-se a absorbância em espectrofotômetro (750nm).

Os dados obtidos das três curvas de calibração da albumina foram ajustados por análise de regressão linear. O método espectrofotométrico apresentou linearidade a 750nm para as concentrações estudadas (100-1000 $\mu\text{g/mL}^{-1}$). A equação da regressão linear média obtida a partir de três curvas de calibração foi $y = 0,163x - 0,052$. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,987, significando que 98,7 % da variação total em torno da média são explicadas pela regressão linear.

Com base nesta equação foi calculada a concentração de proteínas presente no material bruto concentrado por centrifugação e liofilização e diferentes extratos orgânicos obtidos (tabela 2.4).

Tabela 2.4 Determinação de proteínas totais dos extratos orgânicos obtidos do muco produzido pelo Zoantídeo pelo método colorimétrico de Lowry (1951).

Amostras (1000 $\mu\text{g/ml}$)	PPT ($\mu\text{g/ml}$) $M \pm dp$	PPT (%)
Amostra bruta	1,857 $\pm$ 0,338	0,185
Extrato etanólico	0,493 $\pm$ 0,025	0,049
Extrato hidrometanólico	1,074 $\pm$ 0,079	0,107
Extrato aquoso	0,982 $\pm$ 0,167	0,098
Extrato metanólico	0,718 $\pm$ 0,162	0,071

2.5.3.2 DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Os extratos orgânicos obtidos a partir do muco produzido pelo Zoantídeo *Palythoa caribaeorum* foram avaliados quanto a presença de açúcar redutor utilizando o método qualitativo de DNS. Conforme demonstra as figuras 2.6 e 2.7, uma acentuada mudança na coloração dos extratos etanólico, aquoso e

hidrometanólico, respectivamente foram visualizados. Estas amostras quando submetidos a leitura em espectrofotômetro a 540 nm apresentaram absorbância acima de 1,0, comprovando assim a presença de carboidratos.

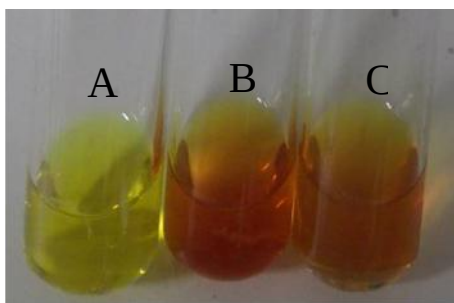


Figura 2.6 Fotografia dos extratos após análise qualitativa de carboidrato pelo método de DNS: (A) DNS, (B) DNS + extrato etanólico (C) DNS + extrato aquoso

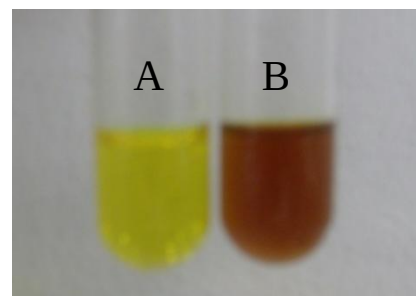


Figura 2.7 Fotografia dos extratos após análise qualitativa de carboidrato pelo método de DNS: (A) DNS (B) DNS + extrato hidrometanólico.

2.5.3.3 SCREENING FITOQUÍMICO

Na investigação fitoquímica, extratos aquoso, metanólico, n-butanólico e acetato etílico obtido a partir do líofilo do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum* foram aplicados em placas de sílica Gel 60 F₂₅₄+ 366 Merk de 20 x 20 cm. Após desenvolvimento e revelação das cromatoplasmas foi possível constatar a presença ou ausência de diversos metabólitos analisados (alcalóides, Proantocianidinas, terpenos, ácido gálico e carboidratos).

Para análise dos extratos à procura dos metabólitos, foram utilizados os critérios de comparação a cor produzida na placa pelos reagentes aplicados, específicos a cada metabólito, com as bandas produzidas pelos extratos em questão. Além disso, foram calculados os Índices de retenção dos compostos nas placas (Rf), que é definido como a razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pelo eluente, que quando semelhantes com os apresentados pelos padrões, podem ser comparados a presença de um composto específico as amostras estudadas.

Neste estudo se constatou que as análises realizadas nos extratos aquosos, metanólico, n-butanólico e acetato de etila não apresentam proantocianidinas condensadas (Figura 2.8) nem alcaloides (Figura 2.9), ocorrendo, portanto divergência entre a coloração do padrão e bandas obtidas, e nos Rf's calculados. No que se refere à presença de ácido

gálico (Figura 2.10) e flavanóides (Figura 2.12) os resultados demonstraram-se negativo, as bandas apresentaram semelhanças nos Rf's, e divergentes na fluorescência quando comparada ao padrão. Quanto a presença de terpenos (Figura 2.11), observou-se apenas no extrato de acetato de etila. Neste extrato foi verificado semelhança dos Rf's e coloração das bandas produzidas, quando em comparação com os padrões.



Figura 2.8 - Cromatograma de extratos para determinação de Proantocianidina. Legenda: 1- Extrato N-butanol; 2- Extrato Metanólico; 3- Extrato de Acetato de Etila; 4- Extrato Aquoso; 5- Padrão: Epicatequina.

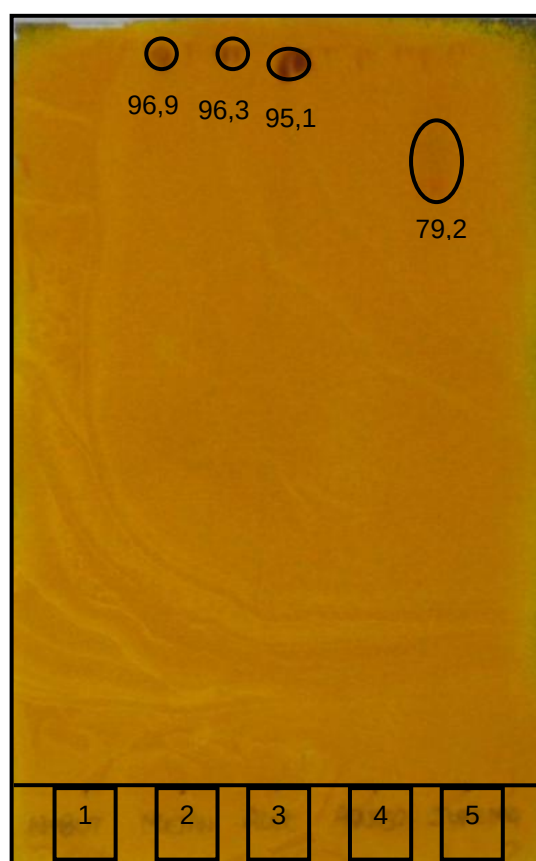


Figura 2.9 - Cromatograma de extratos para determinação de Alcalóide. Legenda: 1- Extrato N-butanol; 2- Extrato Metanólico; 3- Extrato de Acetato de Etila; 4- Extrato Aquoso; 5- Padrão: Pilocarpina.

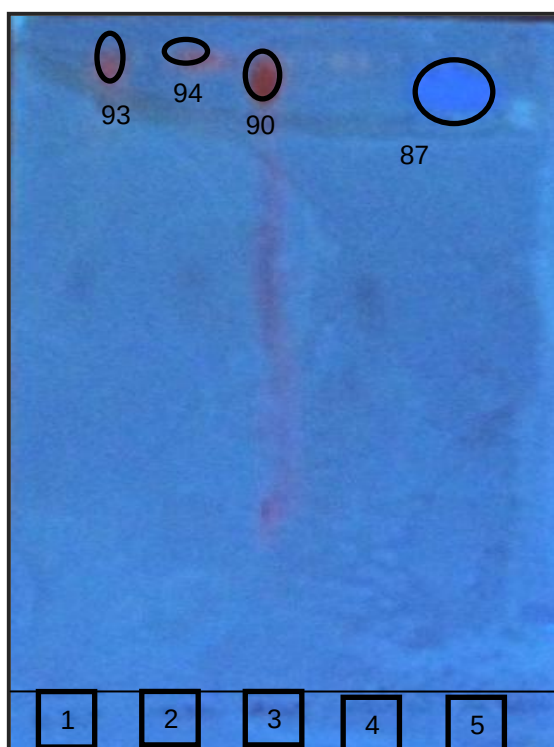


Figura 2.10 - Cromatograma de extratos para determinação de Ácido Gálico. Legenda: 1- Extrato N-butanol; 2- Extrato Metanólico; 3- Extrato de Acetato de Etila; 4- Extrato Aquoso; 5- Padrão: Ácido Gálico.

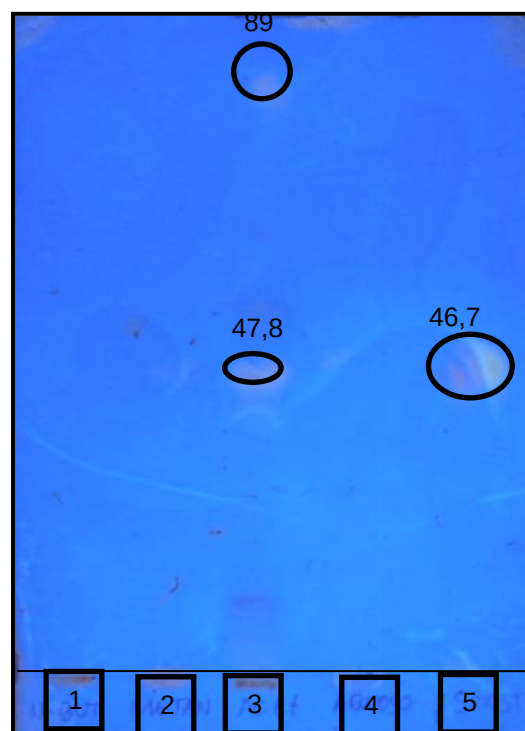


Figura 2.11 - Cromatograma de extratos para determinação de Terpeno. Legenda: 1- Extrato N-butanol; 2- Extrato Metanólico; 3- Extrato de Acetato de Etila; 4- Extrato Aquoso; 5- Padrão: β -sitosterol.

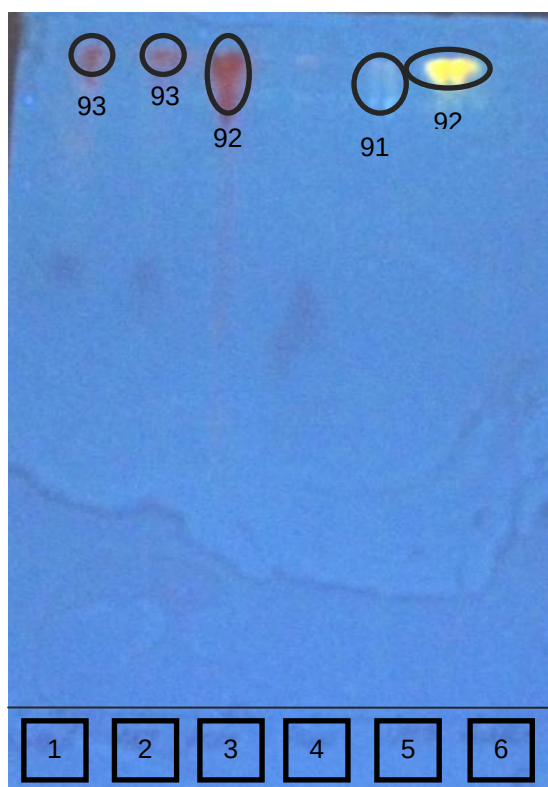


Figura 2.12 - Cromatograma dos extratos para determinação de Flavanóides. Legenda: 1- Extrato N-butanol; 2- Extrato Metanólico; 3- Extrato de Acetato de Etila; 4- Extrato Aquoso; 5- Padrão: Luteolina; 6- Padrão: Quercetina.

Os açúcares foram identificados, nos cromatogramas realizados antes da hidrólise, nos extratos aquosos metanólico, n-butanólico e acetato de etila (Figura 2.1). Após a hidrólise foi possível identificar açúcar nos extratos etanólicos, hidrometanólico e finais (Figura 2.14).

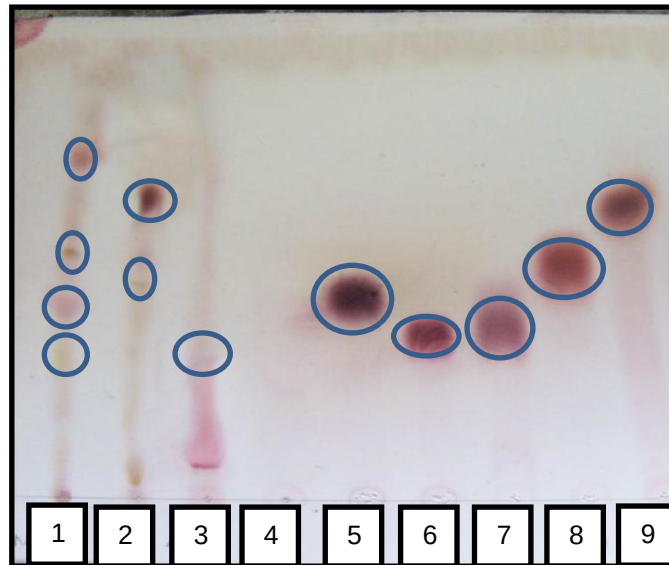


Figura 2.13 - Cromatograma dos extratos para determinação de Açúcares. Legenda: 1- Extrato N-butanol; 2- Extrato Acetato de Etila; 3- Extrato de Aquoso metanólico; 4- Extrato Aquoso Final; Padrões: 5 - Glicose; 6 – Sacarose; 7 – Galactose; 8 - Manose; 9 - Ribose



Figura 2.14 - Cromatograma dos extratos para determinação de Açúcares depois da Hidrólise. Legenda: 1- Extrato Etanólico; 2- Extrato Aquoso final; 3- Extrato Aquoso metanólico. 4- Extrato Etanólico antes da hidrólise. Padrões: 5 - Galactose; 6 – Sacarose; 7 - Maltose; 8 - Glicose

A Tabela 2.5 demonstra os resultados da investigação dos diferentes metabólitos estudados na abordagem fitoquímico dos extratos orgânicos do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum*.

Tabela 2.5 - Screening fitoquímico dos extratos orgânicos obtidos do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum*: Legenda: (X) Não realizado, (-) Ausência do metabólito, (+) Presença do metabólito.

Metabólitos Investigados	Extrato hidrometanólico	Extrato Aquoso	Extrato Etanólico	Extrato Metanólico	Extrato N-Butanólico	Extrato Acetato etílico
Alcalóides	X	-	X	-	-	-
Proantocianidinas	X	-	X	-	-	-
Flavonóides	X	-	X	-	-	-
Terpenos	X	-	X	-	-	+
Ácido Gálico	X	-	X	-	-	-
Açúcares Redutores (Antes da hidrólise)	+	Traços	-	X	+	+
Açúcares Redutores (Depois da hidrólise)	+	+	+	X	X	X

De acordo com estudos de Nitz *et al.* (2006) a eficiência de alguns produtos naturais no processo de reparo tecidual está relacionada, principalmente, a presença de flavonóides, taninos e saponinas. Conforme os resultados encontrados com os extratos obtidos a partir do muco produzido pelo *P. caribaeorum*, a ação cicatrizante desenvolvida parece não está relacionada a presença destes metabólitos estudados.

Os açúcares são componentes de quase todos os seres vivos que podem ser facilmente encontrados na natureza em diversas fontes como: algas (alginato, fucana), plantas (pectina, goma arábica) e animais (quitosana e controitina) (SINHA & RACHNA, 2001). O estudo dessas macromoléculas é justificado devido suas diversas atividades biológicas tais como anticoagulante, antitrombótica, antiinflamatória e imunomoduladora (FARIAS *et al.*, 2009). Existem Também relatos do uso do polissacarídeo como um filme formado por complexo de fucana-quitosana para o tratamento de lesões cutâneas (SEZER

et al., 2008) demonstrou significativa contração na lesão com maior aceleração do processo reparo tecidual.

Desta forma sugere-se, portanto que os carboidratos presentes neste muco produzido pelo zoantídeo podem ter influenciado de forma relevante na aceleração do reparo tecidual em feridas abertas em ratos wistar.

2.6 CONCLUSÕES

Os estudos *in vivo* de reparo tecidual utilizando extrato orgânico do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum* demonstrou uma evidente presença de tecido de granulação, repitelização e proliferação vascular precoce favorecendo a cicatrização. Estes achados confirmam as informações populares e fortalecem a hipótese de que o uso tópico do muco auxilia no reparo tecidual. Através de estudos fitoquímicos preliminares foi constatada a presença de proteínas e carboidratos nos extratos orgânicos obtidos a partir do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, possivelmente relacionados à atividade cicatrizante.

2.7 AGRADECIMENTOS

Costa agradece à FACEPE e CNPq pelo auxílio financeiro, concedido como bolsa de pós-graduação em nível de Mestrado e pelo financiamento do projeto.

2.8 REFERÊNCIAS

- AMORIM, E., MATIAS, J.E.F., COELHO, J.C.U., CAMPOS, A.C., STAHLKE Jr., H.J., TIMI, J.R.R., ROCHA, L.C.A., MOREIRA, A.T.R., RISPOLI, D.Z., FERREIRA, L.M. Efeito do uso tópico do extrato aquoso de *Orbignyaphalerata*(Babaçu) na cicatrização de feridas cutâneas - estudo controlado em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 21 (Suplemento 2)*,67-2006.
- ANTONIO, F.I.; Aspectos macroscópicos e microscópicos da reparação de feridas cutâneas de camundongos (Swiss-Vallée) tratados com o creme de Hyptis suaveolense Croton urucurana Baill. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias - Clínica e Cirurgia), 61p. 2005.
- AUERVALD, A. Estudo comparativo do efeitos induzidos pela aplicação do laser de CO2 e do laser de Erbium: Yttrium Aluminum Garnet, em pele de ratos. Dissertação (Mestrado). Curitiba: Instituto de Pesquisas Médicas, Faculdade Evangélica do Paraná; 2001.
- BALBINO, C.A., PEREIRA, L.M., CURY, R.; Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 41, n. 1, jan./mar., 2005.
- BARBUDO, G. R.; BELETTI, M. E.; EURIDES, D.; SELMI, A. L. Reparação de feridas cutâneas de roedores da espécie *Calomys callosus*, tratadas com hidrocarboneto alifático: aspectos morfométricos, morfológicos e histológicos . Braz. J. vet. Res. anim. Sci. São Paulo, v. 38, n. 2, p. 62-65, 2001.
- COELHO, M.C.O., REZENDE, C.M.F., TENÓRIO, A.P.M.; Contração de ferida após cobertura com substitutos temporários de pele. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 297-303, 1999.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.T.; Patologia estrutural e funcional. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 87-99, 2000.
- DEGIM, Z. CELEBI, N; SAYAN, H. BABUL, A. ERDOGAN, D.; TAKE,G. An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation. *Amino Acids*. V22,p.187-198, 2002.

- EL-GHALBZOURI, A. et al. Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. *Cell Tissue Res*, v.310, n.2, p.189-199, 2002.
- FARIAS, W.R.L.; RODRIGUES, J.A.G; TORRES, V.M.; ALENCAR, D.B., SAMPAIO, A.H.; Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* Revista Ciência Agronômica, v. 40, n. 2, p.224-231, abr-jun, 2009.
- GARROS, I.C., CAMPOS, A.C.L., TÂMBARA, E.M., TENÓRIO, S.B., TORRES, J.M., AGULHAM, M.A., ARAÚJO, A.C.F., SANTIS-ISOLAN, P.M.B., OLIVEIRA, R.M., ARRUDA, E.C.M.; Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cir. Bras*, vol.21, suppl.3, pp. 55-65. 2006.
- GODEIRO, J.R.G; BATISTA, J.S., REIS, P.F.C.C., OLINDA, R.G., VALE, R.G., CALADO, E.B., BARROS, L.E.S., OLIVEIRA, A.F.O., FEIJÓ, F.M.C.; Avaliação da atividade cicatrizante de creme à base de *Triticum vulgare* em feridas cutâneas de gatas submetidas à ovarioossalpingohisterectomia. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.4, n.2, p.78-85, 2010.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J.; Histologia básica. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 488 p. 2004.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v.193, n.1, p.265-275, 1951.
- MASINI, E., CALAMO, M.A.; Uma forma de tratamento de lesões cutâneas com papaína e sacarose. *Rev Bras Clin Terap*. 15(8):245-8.1986.
- MARTINS, N.L.P. et al. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignyaphalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. *Acta Cir. Bras.*, vol.21, suppl.3, pp. 66-75. 2006.
- MILLER, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, n. 31, p.426, 1959.
- NITZ, A.C., ELY, J.B., D'ACAMPORA, A.J., TAMES, D.R., CORRÊA, B.P.; Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. *Arquivos Catarinenses de Medicina* Vol. 35, no. 4, de 2006.

- NOBRE, A.H.B.; PÉREZ, C.D.; DE ALBUQUERQUE MODESTO, J. C. Avaliação bioquímica e farmacológica do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (baba de boi). *In: Anais do XVI CONIC*, 2008.
- OLIVEIRA, M.L.M.; Efeitos do óleo essencial de *Lippiasidoides* Cham. e do óleo fixo de *Caryocarcoriaceum* Wittm. sobre a inflamação tópica e a cicatrização de feridas cutâneas. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. 113p. 2009.
- OLIVEIRA, H. P. Traumatismos nos animais domésticos. *Cad. Téc. Esc. Vet.*, v. 1, n. 7, p. 01-57, 1992.
- PRATA, M. et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.3, n.2, p.43-48, 1988.
- RIBAS, O. M.; SOUSA, M. H; LANZONI, T. A. NORONHA, I. ACRA, L.A. *Rev. Odonto Ciênc*, 21(53):245-252, 2006.
- SANCHES NETO, R.. et al.; Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.8, n.1, p.18-23, 1993.
- SAMPAIO, C.P.P., Efeitos do uso tópico do metronidazol em feridas com cicatrização por segunda intenção em ratos. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Universidade Católica do Paraná. 60p. 2009.
- SEZER, A.D., CEVHER, E., HATİPOĞLU, F., OGURTAM, Z., BAS, A.L., AKBUGA, J.; Preparation of Fucoïdan-Chitosan Hydrogel and Its Application as Burn Healing Accelerator on Rabbits. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* [Vol. 31](#). 2008.
- SILVA, T.A, OLIVEIRA, A.L.M, MODESTO, C.A., PEREZ,C., SANTOS, N.P.S.S., Monografia Bacharelado em enfermagem, CAV UFPE. 30p. 2010.
- SINHA, V.R., RACHNA, K. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *Pharmaceutics*, Volume 224, Issues 1–2, 19-38 V.R. Sinha, Rachna Kumria, 2001.
- SIMÕES, M.J., UZUNIAN, A., MORA, O.A., SASSO, W.S. Aspectos ultra-estruturais do processo de reparação da pele de ratos albinos. *Revista Pauista de Medicina*. 103: 123-126. 1985.

- SEGUNDO, A.S.; BOSCO, A.F. ;MAIA, D. ;RIBEIRO, R.V. ; AGUIAR, E.B.H. ; DIAS ROCATTO, G. ; CIRILO,D. M. ;BUZELLE, S.L. ; VEDOVE, T.A.Influência do Aloe vera e Propolis na contração de feridas em dorso de ratos. Periodontia, 17 (1):5-10, 2007.
- SOARES, C.L.S., PEREZ, C.D., MAIA, M.B.S., SILVA, R.S.S., MELO, L.F.A.;Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 16(4): 463-468, Out./Dez. 2006.
- VASCONCELOS, A.K.P., TOMÉ, A.R., PEREIRA, B.S., NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; Avaliação dos ungüentos à base de extratos hexânico ou etanólico das folhas de *Momordica charantia* L. sobre as lesões cutâneas experimentais em coelhos. Acta Scientiae Veterinariae. 35(1): 59-65, 2007.
- VITORINO FILHO, R.N.L.; USO DE POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DO EXSUDATO DE CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.) NA TERAPÊUTICA TÓPICA DE FERIDAS. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) – Universidade Federal do Piauí. 66p. 2011.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

No presente estudo observou-se que no transcorrer dos estudos *in vivo* do reparo tecidual, as feridas cirúrgicas induzidas no ratos Wistar evoluíram sem a constatação de exsudato quando analisadas em tempos pré-determinados após período pós-operatório. Foi possível visualizar a presença de crosta fibrino-leucocitária, em ambos os grupos, porém bem mais espessa no grupo tratado com o gel contendo a “baba-de-boi”.

Nas análises histopatológicas, foi visualizado uma evidente presença de tecido de granulação, repitelização e proliferação vascular precoces, além de uma intensa presença de células inflamatórias linfoplasmocitária e antecipação da proliferação e presença de fibroblastos no grupo tratado, quando comparado com o grupo controle.

Estes achados fortalecem a hipótese que o uso tópico do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum* favorece a cicatrização e confirma as informações populares.

Na abordagem bioquímica e fotoquímica de diferentes extratos orgânicos obtidos a partir do muco produzido pelo zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, foi constatado a presença de proteínas e carboidratos.

É possível, portanto que os carboidratos presentes neste muco produzido pelo zoantídeo podem ter influenciado de forma relevante na aceleração do reparo tecidual em feridas abertas em ratos Wistar.

Novos estudos de isolamento e purificação de metabólitos orgânicos deste muco poderá comprovar sua propriedade biológica.

REFERÊNCIAS

- ALVES, H., MACHADO, M.T., NORONHA, A.M.N.W. Análise Qualitativa do Processo de Reparo em Cicatriz Cirúrgica de Ratos Tratados com Extrato de *Musa Sapientum*, *Aloe Vera*, Colagenase e Placebo. *Revista Ciências em Saúde* v1, n. 2, jul 2011.
- AMORIM, E., MATIAS, J.E.F., COELHO, J.C.U., CAMPOS, A.C., STAHLKE Jr., H.J., TIMI, J.R.R., ROCHA, L.C.A., MOREIRA, A.T.R., RISPOLI, D.Z., FERREIRA, L.M. Efeito do uso tópico do extrato aquoso de *Orbignyaphalerata*(Babaçu) na cicatrização de feridas cutâneas - estudo controlado em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 21 (Suplemento 2)*, 67. 2006.
- BALBINO, C.A., PEREIRA, L.M., CURY, R.; Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 41, n. 1, jan./mar., 2005.
- BANOVA, D.; BABY, A.R.; DEL BOSCO, L.M.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M.V.R. Caracterização do Extrato Seco de *Ginkgo biloba* L. em Formulações de Uso Tópico. *Acta Farm. Bonaerense* 25 (2): 219-24. 2006.
- BARNES, R.S.K; CALOW, P; OLIVE, P.J.W.; Os Invertebrados, uma nova síntese. Editora Ateneu, São Paulo, 526p. 1995.
- BLANES, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. *Cirurgia vascular: guia ilustrado*. São Paulo: 2004. Disponível em: URL: <http://www.bapbaptista.com>
- BOSCOLO, H.K., SILVEIRA, F.L.; Reproductive biology of *Palythoacaribaeorum* and *Protopalythoavariabilis*(Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea) from the southeastern coast of Brazil. *Braz. J. Biol.* 65, 29-41, 2005.
- CAMPOS, A.C.L., BORGES-BRANCO, A., GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. *ABCD Arq Bras Cir Dig*, 20(1):51-8. 2007.
- CARNEIRO, C.M., SOUSA, F.B., GAMA, F.N.; Treatment of wounds: Assistance of nursing in the units of primary attention to the health. *Revista Enfermagem Integrada – Ipatinga: Unileste-MG - V.3 - N.2 - Nov./Dez. 2010*.
- CARVALHO, P.T.C.; Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: Estudo experimental em ratos diabéticos. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos. 72p. 2002.

- CARVALHO, P.S.P.; TAGLIAVINI, D.G.; TAGLIAVINI, R.L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas; estudo clínico e histológico em ratos. *Revista de Ciência Biomédica*, v.12, p.39-50, 1991.
- DA SILVEIRA, F.L., MORANDINI, A.C.; Checklist dos Cnidaria do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, vol. 11, núm. 1a pp. 1-10. 2011.
- DORNELES, D.; WOUK, A.F.; PONTAROLO, R.; OLIVEIRA, A.B. Efeito de Aloe vera Linne sobre a cicatrização de feridas de pele em coelhos. *Visão Acadêmica*, v.4, n.1, p.39-46, 2003.
- FARIAS, W.R.L; RODRIGUES, J.A.G; TORRES, V.M.; ALENCAR, D.B., SAMPAIO, A.H.; Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* *Revista Ciência Agronômica*, v. 40, n. 2, p.224-231, abr-jun, 2009.
- FERNANDES, A.V. Efeitos do uso tópico da *Calendula officinalis* na cicatrização de feridas em mucosa palatina: estudo histológico em ratos. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo. 2003.
- GARROS, I.C., CAMPOS, A.C.L., TÂMBARA, E.M., TENÓRIO, S.B., TORRES, J.M., AGULHAM, M.A., ARAÚJO, A.C.F., SANTIS-ISOLAN, P.M.B., OLIVEIRA, R.M., ARRUDA, E.C.M.; Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cir. Bras*, vol.21, suppl.3, pp. 55-65. 2006.
- HENRIQUE MANDELBAUM, S., DI SANTIS, E.P., SANT'ANA MANDELBAUM, M.H.; Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *AnbrasDermatol*, Rio de Janeiro, 78(4):393-410, jul./ago. 2003.
- KOEHL, M. A. R.; Water flow and the morphology of zoanthid colonies. *Proceedings of the Third International Coral Reef Symposium*. 1, 437-444, 1977.
- KOSSUGA, M.H., LIRA, S.P., NASCIMENTO, A.M., GAMBARDELLA, M.T.P., BERLINCK, R.G.S., TORRES, Y.R., NASCIMENTO, G.G.F., PIMENTA, E.F., SILVA, M., THIEMANN, O.H., OLIVA, G., TEMPONE, A.G., MELHEM, M.S.C., SOUZA, A.O., GALETTI, F.C.S., SILVA, C.L.; CAVALCANTI, B., PESSOA, C.O., MORAES, M.O., HADJU, E., PEIXINHO, S., ROCHA, R.M.; ISOLAMENTO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PRODUTOS NATURAIS DAS ESPONJAS *Monanchoraarbuscula*, *Aplysinasp.*, *Petromicaciocalyptoides* E *Topsentiaophraphidites*, DA ASCÍDIA

- Didemnum ligulume* DO OCTOCORAL *Carijoariisei*. Quim. Nova, Vol. 30, No. 5, 1194-1202, 2007.
- JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. Histologia básica. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 488 p. 2004.
 - MARCHINI, F.B. et al. Efeito do óleo de rosa mosqueta na cicatrização de feridas abertas. Revista Paulista de medicina, São Paulo, v. 106, n. 6, p. 356, 1988.
 - MARQUES, S.R. et al. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound in lambs. Acta cirúrgica Brasileira, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 91-103, 2004.
 - MARTINS, J.D.G.R., MELO, J.G., AMORIM, E.L.C., ALBUQUERQUE, U. P.; Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). Acta bot. bras. 21(1): 27-36. 2007.
 - MARTINS, N.L.P. et al. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignyaphalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. Acta Cir. Bras, vol.21, suppl.3, pp. 66-75. 2006.
 - MATERA, J.; FANTONI, D.T.; TATARUNAS, A.C.; ROMAN, M.L. Ensaio de avaliação de eficácia e exequibilidade de uso do creme ou gaze impregnada com *Triticum vulgare* em feridas cutâneas. Vet News, v.2, n.8, p.8-11, 2002.
 - MENDONÇA-NETO, J. P.; FERREIRA, C.E.L.; CHAVES, L.C.T. and PEREIRA, R. C.. Influence of Palythoacaribaeorum (Anthozoa, Cnidaria) zonation on site-attached reef fishes. An. Acad. Bras. Ciênc, vol.80, n.3, pp. 495-513. 2008.
 - MELO, L.F.A., CAMARA, C.A.G., OLIVEIRA, L.L.D.S.S., MODESTO, J.C.A., PEREZ, C.D.; Toxicity against *Artemia salina* of the zoanthid *Palythoacaribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) used in folk medicine on the coast of Pernambuco, Brazil. In: Biotemas, 25 (3), 145-151, setembro de 2012.
 - MENDONÇA, R.J., COUTINHO-NETO, J.; Aspectos celulares da cicatrização. An. Bras. Dermatol., vol.84, n.3, pp. 257-262. 2009.
 - NEVES, R.F., AMARAL, F.D., STEINER, A.T.; Levantamento de registros dos acidentes com cnidários em algumas praias do litoral de Pernambuco (Brasil). Ciência & Saúde Coletiva, 12(1):231-237, 2007.
 - NETO, J. J. et al. Tratamento de úlcera varicosa e lesões da pele com *Calêndula Officinalis* L. e ou com *Stryphnodendron barbatiman* (Velloso) Martius. Revista de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, v. 17, p. 181-186, 1996.

- NETO, F. Uso sistêmico da arnica (*solidago microglossa* DC) em cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 82f. 2001.
- NOBRE, A.H.B.; PÉREZ, C.D.; DE ALBUQUERQUE MODESTO, J. C. Avaliação bioquímica e farmacológica do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (baba de boi). In: Anais do XVI CONIC, 2008.
- NOGUEIRA, R.M.B.; KITAMURA, E.A.; AGUIAR, O.M. Estudo clínico da reparação tecidual de feridas cutâneas de cães tratados com papaína e collagenase. Nosso Clínico, v.08, n.43, p.25-28, jan-fev, 2005.
- OLIVEIRA, M.L.M.; Efeitos do óleo essencial de *Lippiasidoides* Cham. e do óleo fixo de *Caryocarcoriaceum* Wittm. sobre a inflamação tópica e a cicatrização de feridas cutâneas. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. 113p. 2009.
- PINTO, A.C., BOLZANI, V.S., SILVA, D.H.S, LOPES, N.P., EPIFANIO, R.A.; Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e perspectivas. Quim. Nova, Vol. 25, Supl. 1, 45-61, 2002.
- PRATA, M. et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. Acta Cirúrgica Brasileira, v.3, n.2, p.43-48, 1988.
- PUPO, M.T., GALLO, M.B.C., VIEIRA, P.C. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. Quim. Nova, Vol. 30, No. 6, 1446-1455, 2007.
- RABELLO, E.F.; Distribuição espacial e interação competitivas em Zoantídeos (CNIDARIA: ZOANTHIDAE) em um ambiente de recifes de arenito no nordeste do Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará. 104p. 2007.
- RODRIGUES, J.A.G.; SOUSA, E.O.V.; QUINDERÉ, A.LG; FONTES,B.P.; BENEVIDES, N.M.B. Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpacupressoides* - extração, fracionamento e atividade anticoagulante. Acta Scientiarum. BiologicalSciences, vol. 32, núm. 2, pp. 113-120. 2010.
- RUPPERT, E.E, FOX, R.S; BARNES, R. D., Invertebrate Zoology: A functional evolutionary approach. Thomson, 963 p., Belmont, 2004.
- SABOYA, J.P.S., ARAUJO, G.S., SILVA, J.W.A., SOUSA JÚNIOR, J., MACIEL, R.L., FARIAS, W.R.L.; Efeito dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Kappaphycusalvarezii* em pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

- submetidas a situações de estresse. *Acta Sci., Anim. Sci.*, vol.34, n.3, pp. 215-221. 2012.
- SAMPAIO, C.P.P., Efeitos do uso tópico do metronidazol em feridas com cicatrização por segunda intenção em ratos. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Universidade Católica do Paraná. 60p. 2009.
 - SANCHES NETO, R.. et al.; Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual deferidas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.8, n.1, p.18-23, 1993.
 - SILVA, T.A, OLIVEIRA, A.L.M, MODESTO, C.A., PEREZ,C., SANTOS, N.P.S.S., Monografia Bacharelado em enfermagem. CAV UFPE. 30p. 2010.
 - SOARES, C.L.S., PEREZ, C.D., MAIA, M.B.S., SILVA, R.S.S., MELO, L.F.A.; Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16(4): 463-468, Out./Dez. 2006.
 - SUCHANEK, T.H.; GREEN, D.J.; Interspecific competition between *Palythoa caribaeorum* and other sessile invertebrates on St. Croix reefs, U.S. Virgin Islands. *Proceedings of the Fourth International Coral reef Symposium* 2, 679-684, 1981.
 - TAZIMA, M.F.G.S., VICENTE, Y.A.M.V.A., MORIYA, T.; BIOLOGIA DA FERIDA E CICATRIZAÇÃO. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2008; 41 (3): 259-64. Disponível em: <http://www.fmrp.usp.br/revista>.
 - TEIXEIRA, V.L., KELECOM, A., GOTTLIEB, O.R.; Produtos naturais de algas marinhas. *Quim. Nova* 14 (2), 1991.
 - VIEGAS JÚNIOR, C., BOLZANI, V.S., BARREIRO, E.J. OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 2, 326-337, 2006.
 - VITORINO FILHO, R.N.L.; USO DE POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DO EXSUDATO DE CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.) NA TERAPÊUTICA TÓPICA DE FERIDAS. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) – Universidade Federal do Piauí. 66p. 2011.

ANEXOS

Normas para submissão do artigo à Revista Brazilian Journal of Pharmacognosy:

- **Cabeçalho:** constituído por: Título do trabalho, que deve ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho; Autor(es) por extenso, indicando a(s) instituição(ões) a(s) qual(is) pertence(m) mediante números. O autor para correspondência deve ser identificado com asterisco, fornecendo o endereço completo, incluindo o eletrônico. Estas informações devem constar em notas de rodapé.
- **Resumo (em português):** deve apresentar a condensação do conteúdo, expondo metodologia, resultados e conclusões, não excedendo 200 palavras. Os membros da Comissão poderão auxiliar autores que não são fluentes em português.
- **Unitermos:** devem representar o conteúdo do artigo, evitando-se os de natureza genérica. Observar o limite máximo de 6(seis) unitermos.
- **Introdução:** deve estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos no mesmo campo. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, nos quais tais revisões tenham sido apresentadas.
- **Material e Métodos:** a descrição dos métodos usados deve ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho. Processos e Técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, devem ser apenas referidos por citação. Estudos em humanos e em animais devem fazer referência à aprovação do Comitê de Ética correspondente.
- **Resultados e Discussão:** deverão ser apresentados de forma concisa e em ordem lógica. Tabelas ou figuras, quando possível, devem substituir o texto, na apresentação dos dados. Sempre que pertinente, forneça as faixas, desvios padrão e indique as significâncias das diferenças entre os valores numéricos obtidos. A discussão deve se restringir ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, procurando, sempre que possível, relacionar sua significância em relação a trabalhos anteriores da área. Especulações que não encontram justificativa para os dados obtidos devem ser evitadas. É facultativa a apresentação desses itens em separado.
- **Conclusões:** Quando pertinentes, devem ser fundamentadas no texto.

- **Resumo em inglês (ABSTRACT):** deve ser antecedido do título do artigo em inglês e acompanhar o conteúdo do resumo em português.
- **Unitermos em inglês:** devem acompanhar os unitermos em português
- **Agradecimentos:** devem constar de parágrafo à parte, antecedendo as referências bibliográficas, e ser compatíveis com as exigências de cortesia e divulgação.
- **Referências bibliográficas:** devem ser organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT NBR-6023, ordenadas alfabeticamente no fim do artigo incluindo os nomes de todos os autores. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Para consulta e exemplos, consultar o site www.bcq.usp.br.