



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JONATHAN AUGUSTO VIDAL DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DA *RHIZOPHORA MANGLE* ASSOCIADA AO BIOPOLÍMERO DE
BETAGLUCANA EM RETALHOS CUTÂNEOS ISQUÊMICOS EM RATOS**

RECIFE

2018

JONATHAN AUGUSTO VIDAL DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DA *RHIZOPHORA MANGLE* ASSOCIADA AO BIOPOLÍMERO DE
BETAGLUCANA EM RETALHOS CUTÂNEOS ISQUÊMICOS EM RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

Co-Orientador: Prof Dr Wolfgang Harand

RECIFE

2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- O48a Oliveira, Jonathan Augusto Vidal de.
 Aplicação da *Rhizophora mangle* associada ao biopolímero de
 betaglucona em retalhos cutâneos isquêmicos em ratos / Jonathan
 Augusto Vidal de Oliveira. – 2018.
 86 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientador: Jeymesson Raphael Cardoso Vieira.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
 CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Recife, 2018.
- Inclui referências e anexos.
1. Microcirculação. 2. Neovascularização patológica. 3. Biopolímeros.
 4. Retalho cirúrgico. I. Vieira, Jeymesson Raphael Cardoso (Orientador).
 II. Título.

610 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2018-310)

JONATHAN AUGUSTO VIDAL DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DA *RHIZOPHORA MANGLE* ASSOCIADA AO BIOPOLÍMERO DE
BETAGLUCANA EM RETALHOS CUTÂNEOS ISQUÊMICOS EM RATOS**

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

Aprovado em: 05/09/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sandro Gonçalves de Lima (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jairo Zacché de Sá (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Prof. Dr. Bruno Severo Gomes (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta dissertação ao meu pai José João, que mesmo não estando mais presente no meu convívio, continua sendo meu exemplo permanente em vários aspectos da minha vida. A minha mãe Maria Laura e aos meus irmãos Pollyanna e Gustavo por estarem sempre ao meu lado nos momentos de maior dificuldade. A minha companheira Renata que me incentivou e deu suporte para realização desta jornada. E a toda minha família, amigos e professores que tornaram este trabalho possível.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai José João *in memoriam*, que cuidou de mim sempre me incentivando a alcançar os meus objetivos, torcendo e comemorando cada conquista que alcancei. Sempre foi meu exemplo de integridade e força, que mesmo nos momentos mais difíceis ainda demonstrou toda a sua serenidade e fé; e sua melhor imagem sempre estará guardada comigo.

A minha mãe Maria Laura, que também cuidou de mim com todo carinho e sempre participou e foi responsável pelas minhas conquistas.

Aos meus irmãos Pollyanna e Gustavo que com todo companheirismo e dedicação me ajudam a enfrentar as dificuldades desta vida e sei que com eles sempre posso contar.

A minha esposa Renata, pelo incentivo, pelos muitos momentos de ajuda e por trazer sempre carinho e conforto.

A minha família que esteve sempre torcendo por mim e me incentivando a alcançar os meus objetivos.

Ao Professor Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira, por ter me orientado com sabedoria, sempre com ótimo astral e soluções para os problemas encontrados durante o desenvolvimento da pesquisa. Além de sempre apresentar-se disponível para ajudar e incentivar-me para finalização deste projeto com o seu exemplo.

A todos os professores da Pós-Graduação em Ciências da Saúde que colaboraram para a minha formação profissional.

Aos funcionários da secretaria da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela diligência e apoio durante todo o processo de formação.

A Eduarda Santos e Luzia Abílio, por terem me ajudado imensamente na realização e desenvolvimento deste trabalho. Desde a dedicação durante a produção das substâncias utilizadas na pesquisa, até o companheirismo e papel fundamental que exerceram durante os procedimentos cirúrgicos.

Ao professor Dr Ricardo Yara, que disponibilizou o laboratório de biofísica para o desenvolvimento do biopolímero e contribuiu para a elaboração dos pontos fundamentais da pesquisa.

Ao professor Dr Eduardo Carvalho Lira e a Professora Dra Dayane Aparecida Gomes todos que fazem parte do Laboratório de Fisiologia e farmacologia da UFPE, que nos disponibilizaram os laboratórios e insumos para realização dos experimentos.

Aos meus amigos da turma de 2016 e 2017 da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, fonte de aprendizado diário, por todo carinho e parceria durante o curso e que levarei por toda vida.

Aos funcionários e secretárias do PPGCCS, que tanto me ajudaram com as questões burocráticas do programa.

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

“Ninguém entra no mesmo rio uma segunda vez, pois quando isto acontece já não se é mais o mesmo. Assim como as águas que já serão outras.” (HERÁCLITO, ca. 450 a.C.).

RESUMO

A necrose que ocorre em retalhos cutâneos isquêmicos é uma importante complicação em cirurgias plásticas estéticas e reconstrutoras. Muitas substâncias apresentaram melhora na viabilidade de retalhos cutâneos isquêmicos em estudos prévios. Porém algumas delas necessitam de aplicação sistêmica em altas doses, o que pode produzir importantes efeitos colaterais. Os taninos e flavonóides estão entre os principais compostos polifenólicos do extrato de *Rhizophora mangle* L. (EAF *R. mangle*), estes compostos tem ação anti oxidante, anti inflamatória e promovem neoangiogênese. Os biopolímeros são produtos biodegradáveis bastante úteis para aplicações médicas, principalmente em áreas como desenvolvimento de sistemas de liberação de medicamentos. Este estudo visa avaliar o potencial da associação do filme do biopolímero de betaglukan com o extrato da *R. mangle* (Filme de RmBg) na prevenção de necrose tecidual em porções distais de retalhos cutâneos isquêmicos em ratos. Foram confeccionados retalhos cutâneos isquêmicos no dorso de 20 ratos Wistar, que foram divididos em 4 grupos, o grupo A recebeu apenas soro fisiológico; grupo B, onde o extrato aquoso da *R. mangle* foi aplicado; Grupo C, que recebeu um filme de biopolímero de betaglukan associado ao EAF *R. mangle*; e no grupo D, foi aplicado apenas o filme de biopolímero de betaglukan. A áreas de necrose tecidual foram avaliadas a partir de registros fotográficos e análise nos programas Photoshop® e ImageJ®. Foram realizadas 5 fotomicrografias de cada amostra histológica de cada animal e foram contados os fibroblastos, leucócitos e vasos sanguíneos. A área média de necrose apresentada no grupo C foi a menor de todos, com 33,49% (DP± 12,33%), enquanto o grupo A obteve 48,88% (DP± 5,85%), grupo B 42,74% (DP± 4,74%). e o grupo D foi 43,63% (DP± 6,81%). A retração cicatricial também foi menor no grupo C, que apresentou diminuição média de 4,66% (DP± 2,89%). da área do retalho, enquanto os grupos A, B e D apresentaram 17% (DP± 5,11%), 12,1% (DP± 1,76%). e 14,4% (DP± 7,34%), respectivamente. Na análise histológica, não houve diferença significativa entre os grupos, a contagem de fibroblastos no grupo A foi 9,76 (DP± 4,8), o grupo B foi de 6,72 (DP± 2,55), enquanto os grupos C e D foram de 7,1 (DP± 5,33). e 8,5 (DP± 3,88), respectivamente. A média de leucócitos no grupo A foi de 2 (DP± 1,25), no grupo B foi 1,92 (DP± 1,18), no grupo C foi 3,05 (DP± 2,08). e no grupo D 1,9 (DP± 1,11). A média dos vasos sanguíneos do grupo A foi de 2,4 (DP± 1,84), no grupo B foi de 2,52 (DP± 1,38), no grupo C foi de 2,8 (DP± 1,32). e no grupo D foi de 2,3 (DP± 1,75). A associação entre o biopolímero de betaglukan com o extrato da *R. mangle* apresentou resultado positivo na diminuição da área de necrose e retração em retalhos cutâneos isquêmicos em ratos, contudo, sem diferença significativa no estudo histomorfométrico.

Palavras-chave: Microcirculação. Neovascularização Patológica. Biopolímeros. Retalho cirúrgico.

ABSTRACT

Necrosis that occurs in ischemic skin flaps is an important complication in cosmetic and reconstructive plastic surgeries. Many substances have shown improvement in the viability of ischemic skin flaps in previous studies. However, some of them require systemic administration in high doses, which can produce important side effects. The tannins and flavonoids are among the main polyphenolic compounds of the extract of *Rhizophora mangle* L. (EAF *R. mangle*), these compounds have anti oxidant action, anti inflammatory and promote angiogenesis. Biopolymers are biodegradable products that are very useful for medical applications, especially in areas such as the development of drug delivery systems. This study aims to evaluate the potential of the association between betaglukan biopolymer and the extract of EAF *R. mangle* to prevent tissue necrosis in distal portions of ischemic skin flaps in rats. Ischemic skin flaps were made on the back of 20 Wistar rats, which were divided into 4 groups, group A received only saline solution; group B, where the aqueous extract of *R. mangle* was applied; Group C, which received a beta-glucan biopolymer film associated with *R. mangle* extract; and in group D, beta-glucan biopolymer film was applied. The areas of tissue necrosis were evaluated from photographic records and analysis in the Photoshop® and ImageJ® programs. Five photographs of each histological sample of each animal were performed and fibroblasts, leukocytes and blood vessels were counted. The mean area of necrosis presented in group C was 33.49% (SD $\pm$ 12.33%), while group A presented 48.88% (SD $\pm$ 5.85%), group B 42.74% (DP $\pm$ 4.74%). and group D was 43.63% (DP $\pm$ 6.81%). Scar retraction was also lower in group C, which presented a mean decrease of 4.66% (DP $\pm$ 2.89%). of the flap area, whereas groups A, B and D presented 17% (DP $\pm$ 5.11). %), 12.1% (SD $\pm$ 1.76%). and 14.4% (SD $\pm$ 7.34%), respectively. The histological analysis revealed no significant difference between groups, the fibroblast count in group A was 9.76 (SD $\pm$ 4.8), group B was 6.72 (SD $\pm$ 2.55), while groups C and D were 7.1 (SD $\pm$ 5.33). and 8.5 (SD $\pm$ 3.88), respectively. The mean number of leukocytes in group A was 2 (SD $\pm$ 1.25), group B was 1.92 (SD $\pm$ 1.18), group C was 3.05 (SD $\pm$ 2.08). and group D 1.9 (SD $\pm$ 1.11). The mean blood vessels count of group A was 2.4 (SD $\pm$ 1.84), group B was 2.52 (SD $\pm$ 1.38), group C was 2.8 (SD $\pm$ 1, 32). and in group D was 2.3 (SD $\pm$ 1.75). The association between betaglukan biopolymer and extract of *R. mangle* showed a positive result in the reduction of necrosis area in ischemic cutaneous flaps in rats

Key words: Microcirculation. Neovascularization, Pathologic. Biopolymers. Surgical Flaps.

LISTA DE ILUTRAÇÕES

Figura 1 -	Fisiologia dos retalhos cutâneos e substâncias utilizadas na prevenção da necrose	19
Figura 2 -	Estrutura esquematizada da kefirana	33
Figura 3 -	Fluxograma das etapas do estudo	37
Figura 4 -	Área de mangue no distrito de Vila Velha, em Itamaracá-PE. <i>Rhizophora mangle</i> encontrada às margens do rio	39
Figura 5 -	Detalhes da folha e fruto da <i>R. mangle</i>	40
Figura 6 -	Grãos de kefir	42
Figura 7 -	Mecanismo de extração e purificação do exopolissacarídeo	43
Figura 8 -	Biopolímero de betaglucana em filme	45
Figura 9 -	Biopolímero em filme	45
Figura 10 -	Retalho de McFarlane demarcado	46
Figura 11 -	Retalho totalmente elevado com plano de dissecção incluindo o <i>panniculus carnosus</i> mantendo sua irrigação pela base	47
Figura 12 -	Retalho suturado e fechado	47
Figura 13 -	Intervenções realizadas em cada grupo	48
Figura 14 -	Demarcação da área de necrose a partir da análise macroscópica	49
Figura 15 -	Áreas de retração do retalho cutâneo	50
Figura 16 -	Camadas histológicas da pele do rato onde observa-se o <i>panniculus carnosus</i> que foi incluído nos retalhos	51
Figura 17 -	Transição histológica entre o tecido viável e a área de necrose	52
Figura 18 -	Cromatograma do extrato aquoso da <i>R. mangle</i>	54
Figura 19 -	Área de necrose relativa por grupos	55
Figura 20 -	Exemplar de cada grupo demonstrando as áreas de necrose	56
Figura 21 -	Retração da área do retalho	56

Figura 22 -	Amostra de uma preparação de tecido conjuntivo em hematoxilina-eosina	57
Figura 23 -	Número de fibroblastos presentes na área de transição dos retalhos em cada grupo	58
Figura 24 -	Número de leucócitos presentes na área de transição dos retalhos em cada grupo	58
Figura 25 -	Número de vasos sanguíneos presentes na área de transição dos retalhos em cada grupo.....	59
Figura 26 -	Animal do Grupo C (filme de RmBg) apresentando necrose atípica em terço proximal do retalho com a porção distal preservada.....	60
Figura 27 -	Deiscência da ferida operatória apresentada em dois animais do grupo C sem sinais de infecção	61
Figura 28 -	Composto aderente ao leito da ferida e o retalho formado pela degradação do biopolímero.	61
Figura 29 -	Modelo teórico da atuação do filme de RmBg na diminuição da necrose cutânea dos retalhos isquêmicos.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos encontrados no Kefir	32
Tabela 2 - Polissacarídeos e Monossacarídeos encontrados no kefir	33
Tabela 3 - Divisão dos grupos de animais do estudo.....	48
Tabela 4 - Principais compostos do extrato aquoso da <i>R. mangle</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	Comissão ética no uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco
cm	Centímetro
cm²	Centímetro quadrado
CO₂	Dioóxido de Carbono
COX-2nRNA	Cicloxygenase Ácido Ribonucléico
Cy-Zn SOD	Cobre-Zinco Superóxido Desmutase
EPO	Eritropoetina
EPS	Exopolissacarídeo
Filme de RmBg	Filme do extrato da <i>Rhizophora mangle</i> associado ao biopolímero de betaglucana
g	Grama
h	Hora
HBPM	Heparina de baixo peso molecular
HCL	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina - Eosina
Kg	Quilo
L	Litro
M	Mol
mg	Miligrama
ml	Mili litro
MP	Megapixel
MPS	Mucopolissacarídeos
NaOH	Hidróxido de Sódio
SF 0,9%	Soro fisiológico a 0,9%

SOD	Superóxido Desmutase
TGF-B3	Fator de crescimento transformador beta 3
TNFα	Fator de Necrose Tecidual Alfa
UDP Glucose	Uridina Difosfato Glicose
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VEGF	Fator de crescimento endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	VIABILIDADE DE RETALHOS ISQUÊMICOS.....	18
2.1.1	Fisiologia dos retalhos	18
2.1.1.1	Efeito Neurovascular	19
2.1.1.2	Radicais livres na isquemia/reperfusão	20
2.1.1.3	Inflamação local.....	21
2.1.2	Substâncias estudadas na prevenção de necrose tecidual em retalhos isquêmicos.....	22
2.1.2.1	Vasodilatadores.....	22
2.1.2.2	Heparinóides, anticoagulantes e antiagregantes plaquetários.....	24
2.1.2.3	Removedores de radicais livres	25
2.1.2.4	Outras Substâncias testadas	26
2.1.2.4.1	<i>Eritropoietina</i>	26
2.1.2.4.2	<i>Toxina botulínica</i>	27
2.1.2.4.3	<i>Fator de crescimento endotelial</i>	27
2.1.2.5	Terapia genética.....	27
2.2	MODELOS DE ESTUDO DE RETALHOS ISQUÊMICOS	28
2.3	RHIZOPHORA MANGLE L.	29
2.4	KEFIR.....	31
2.5	BIOPOLÍMEROS / EXOPOLISSACARÍDEOS	34
3	OBJETIVOS	36
3.1	GERAL	36
3.2	ESPECÍFICOS.....	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	DESENHO DO ESTUDO	37
4.2	INTERVENÇÃO REALIZADA	37
4.3	LOCAL E PERÍODO DA PESQUISA	37
4.4	POPULAÇÃO DA PESQUISA / AMOSTRA.....	38
4.4.1	População Alvo	38
4.5	DEFINIÇÃO DE TERMOS	38

4.6	ETAPAS E MÉTODOS DE COLETA E PREPARO DO MATERIAL DA PESQUISA	39
4.6.1	Coleta do material vegetal.....	39
4.6.2	Obtenção do extrato aquoso de folhas de R. Mangle	40
4.6.3	Diluição do pó da R. mangle e escolha da dose	40
4.6.4	Análise dos componentes do extrato da R. mangle.....	41
4.6.5	Cultivo do Kefir	41
4.6.6	Extração e purificação do exopolissacarídeo do kefir	42
4.6.7	Obtenção do filme de RmBg	44
4.7	INTERVENÇÃO CIRÚRGICA E COLETA DE DADOS	46
4.7.1	Procedimento cirúrgico e grupos de pesquisa.....	46
4.7.2	Avaliação clínica e morfométrica das áreas de necrose nos retalhos.....	49
4.7.3	Avaliação da retração da área dos retalhos cutâneos.....	49
4.7.4	Análise histomorfométrica das amostras	50
4.8	MÉTODOS ESTATÍSTICOS PARA ANÁLISE DOS DADOS	52
5	ASPECTOS ÉTICOS	53
6	RESULTADOS	54
6.1	ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DA R. MANGLE	54
6.2	ANÁLISE CLÍNICA E MORFOMETRIA DA ÁREA DE NECROSE.....	55
6.3	RETRAÇÃO CICATRICIAL	56
6.4	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	57
6.5	DESCRIÇÃO DE EVENTOS ADVERSOS	59
7	DISCUSSÃO	62
7.1	ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO DA R. MANGLE.....	62
7.2	ÁREA DE NECROSE	63
7.3	RETRAÇÃO DA ÁREA	65
7.4	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	66
7.5	ESCOLHA DA VIA	67
7.6	EVENTOS ADVERSOS	68
8	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	70
9	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DA COLETA DO MATERIAL VEGETAL	85
	ANEXO B - APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA.....	86

1 INTRODUÇÃO

A necrose em retalhos cutâneos isquêmicos é uma importante complicação em cirurgias plásticas estéticas e reconstrutoras (DUARTE; GOMES; FERREIRA, 1998; LIVAOĞLU et al., 2010). Pacientes com essa complicação frequentemente necessitam de novas intervenções cirúrgicas, implicando em maiores incisões e maior grau de retração cicatricial, além de custos hospitalares mais elevados, resultados estéticos insatisfatórios e necessidade de maior período de curativos com a ferida. (CELIK et al., 2010).

Apesar de várias substâncias terem apresentado melhora na viabilidade de retalhos cutâneos isquêmicos em estudos prévios, algumas delas necessitam de aplicação sistêmica em altas doses, o que pode produzir importantes efeitos colaterais. (GOZU; PODA, 2010; MANCHIO et al., 2009; NEZAMI; TALAB; EMAMI, 2009). A procura por substâncias com menos efeitos colaterais e maior eficácia na prevenção da necrose em retalhos isquêmicos precisa ser continuada, já que não existe um tratamento padronizado e amplamente aceito para esta importante complicação.

Em estudos prévios, onde o extrato da planta *Rhizophora mangle* (*R.mangle*) contribuiu com melhora na cicatrização de feridas, foi observado efeito anti-oxidante, anti-inflamatório, promotor de neoangiogênese e com poucos efeitos colaterais. (FERNANDEZ et al., 2002; MARRERO et al., 2006; OFORI-KWAKYE; KWAPONG; BAYOR, 2011). Estas propriedades são importantes durante o processo isquêmico para evitar a necrose, contudo precisam ser mantidas durante um período prolongado até reestabelecimento da vascularização do retalho.

Os biopolímeros são compostos biodegradáveis e podem promover liberação lenta e continuada de substâncias associadas a eles. (YADAV, 2015). Portanto, a combinação entre o efeito cicatrizante da *R. mangle* com a liberação lenta de substâncias associadas ao biopolímero de betaglucana, pode interferir de maneira positiva para prevenir necrose em retalhos isquêmicos e nunca foi testada anteriormente.

Este estudo avalia a eficácia da associação entre o biopolímero de betaglucana ao extrato da *Rhizophora mangle* na prevenção de necrose tecidual em retalhos cutâneos isquêmicos em ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VIABILIDADE DE RETALHOS ISQUÊMICOS

Os retalhos cutâneos randômicos são recursos comumente utilizados nas cirurgias plásticas reconstrutoras para garantir o fechamento de perdas de substâncias, sejam traumáticas ou após ressecções de grandes tumores cutâneos. (DUARTE; GOMES; FERREIRA, 1998; LIVAOĞLU et al., 2010). Os retalhos cutâneos são definidos como segmentos de pele obtidos de uma região doadora, que são transferidos para uma região receptora. Estes segmentos mantêm uma conexão temporária ou definitiva, por meio de um pedículo por onde é garantido o suprimento sanguíneo. Desta forma, apresentam uma circulação sanguínea própria, sem depender do leito da área receptor para garantir sua sobrevivência. (DUARTE; GOMES; FERREIRA, 1998).

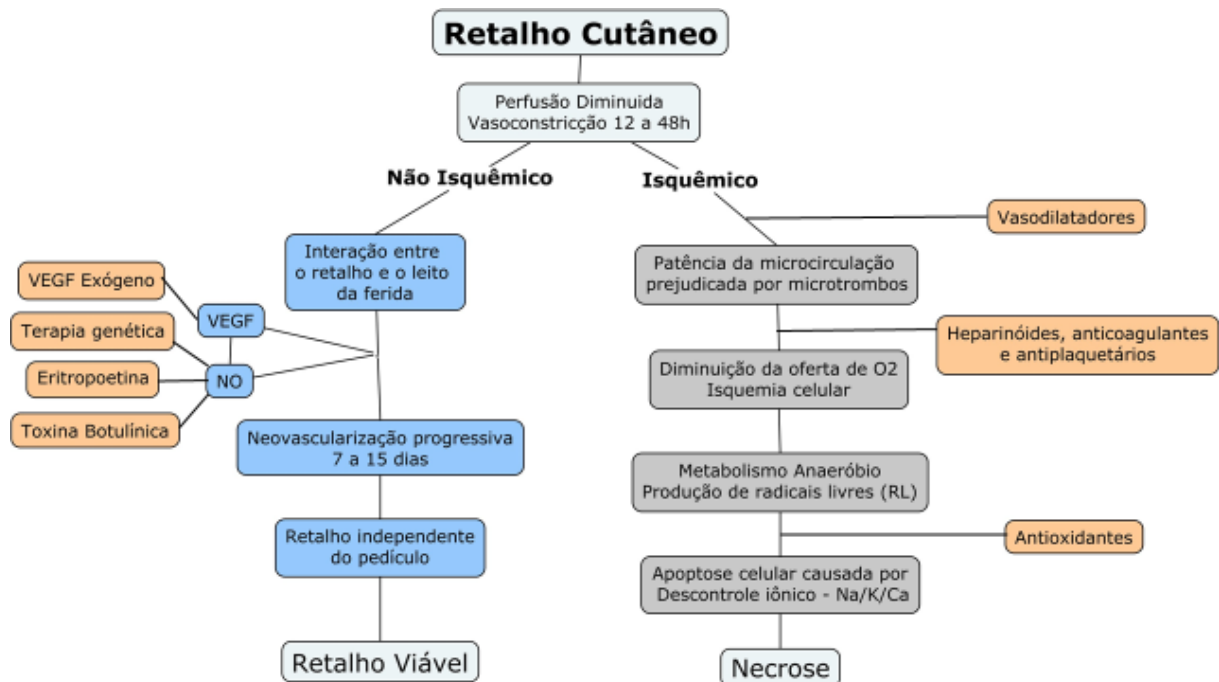
A necrose tecidual que ocorre em retalhos isquêmicos continua sendo uma importante complicação cirúrgica nesses procedimentos, o que aumenta a morbidade e insucesso cirúrgico. Pacientes com essa complicação frequentemente necessitam de novas intervenções cirúrgicas para realizar desbridamento das áreas necróticas, implicando em maiores incisões e maior grau de retração cicatricial. Além de implicar em custos hospitalares mais elevados, resultados estéticos insatisfatórios e necessidade de maior período de curativos e cuidados locais com a ferida. (CELIK et al., 2010).

2.1.1 Fisiologia dos retalhos

Durante a confecção de um retalho cutâneo, vários fenômenos bioquímicos e microvasculares ocorrem, com alteração distinta da perfusão nos segmentos do retalho, principalmente na porção mais distal. Caso estes fenômenos persistam por tempo prolongado e a perfusão não seja reestabelecida, a isquemia progride para necrose e posterior perda daquela área (MÉLEGA; VITERBO; MENDES, 2011).

O entendimento destes processos é importante para compreensão dos métodos para prevenção da necrose tecidual que vem sendo pesquisados (Figura 1).

Figura 1 - Fisiologia dos retalhos cutâneos e substâncias utilizadas na prevenção da necrose



Legenda: As intervenções pesquisadas na tentativa de interferir nessa cascata estão representadas pelos quadros na cor laranja.

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

2.1.1.1 Efeito Neurovascular

A incisão cirúrgica realizada na execução do retalho causa lesão nas fibras simpáticas e provoca a liberação de catecolaminas no local, que vão levar a uma vasoconstrição mediada pelos receptores alfa-adrenérgicos e consequente diminuição da perfusão. A associação da vasoconstrição com a secção de vasos perfurantes durante a dissecação do retalho, diminui a pressão de perfusão tissular e gera um estado de isquemia celular, principalmente nas porções mais distais do retalho. Este fenômeno pode perdurar por um período de 12 a 48 horas, até que ocorra a reversão a partir da metabolização local e eliminação das catecolaminas e posterior aumento da pressão de perfusão, induzida pela ação das substâncias vasodilatadoras liberadas pelo processo inflamatório local (EMAMI et al., 2013; MÉLEGA; VITERBO; MENDES, 2011).

O retalho necessita resistir ao período de isquemia para manter a viabilidade, contudo em áreas críticas do retalho, esse período pode ser fatal e induzir ao processo de necrose tissular. A desnervação simpática também pode acentuar a produção de radicais livres de oxigênio e causar um efeito negativo sobre a revascularização (MÉLEGA; VITERBO; MENDES, 2011).

Reinisch (1974) constatou que a pele apresenta uma circulação terminal com inúmeros canis ou anastomoses arteriovenosos, que são inervados por nervos simpáticos. E a estimulação neural causa vasoconstricção, por conseguinte, a deservação provocada pela incisão cirúrgica provoca vasodilatação. As anastomoses arteriovenosas são canais com diâmetro largo e com paredes grossas que não permitem a passagem de nutrientes para o tecido. Portanto estas anastomoses dilatadas após a incisão cirúrgica, poderiam acumular o volume sanguíneo no retalho sem permitir a troca de nutrientes, fazendo com que o retalho evolua para necrose.

No entanto, estudos posteriores utilizando microesferas radioativas não encontraram nenhuma evidência de derivação do fluxo arteriovenoso na parte distal de retalhos isquêmicos randômicos em porcos. Contudo, reforçaram a importância da vasodilatação dos vasos sanguíneos existentes. (KERRIGAN, 1983; PANG, C. Y. et al., 1986). A derivação arteriovenosa da pele humana foi quantificada em estudo utilizando regiões paraumbilicais após dermolipectomias. Foi constatado que este fluxo representava apenas 1% do volume perfundido e que, portanto, as anastomoses arteriovenosas aparentemente não desempenham um papel importante na patogênese da necrose em porções distais de retalhos isquêmicos. (KREIDSTEIN et al., 1991).

Callegari et al. (1992) constataram, a partir de estudos experimentais que o fenômeno de viabilidade aumentada após a autonomização de retalhos devia-se à expansão territorial por recrutamento, ou seja, abertura das artérias existentes. Esses vasos foram batizados como vasos de choque e sua importância na fisiologia da irrigação da porção distal de retalhos cutâneos está amplamente aceita e continua sendo estudada nos estudos mais recentes, que sugerem que a presença de vasos de choque é o fator determinante mais importante na viabilidade de retalhos isquêmicos (COURTEMANCHE et al., 2015; QING et al., 2017).

2.1.1.2 Radicais livres na isquemia/reperfusão

O processo de isquemia tecidual juntamente com a inflamação local promovem uma cascata de eventos bioquímicos que geram radicais livres (RL) derivados do oxigênio. Os RL são citotóxicos e capazes de participar de reações em cadeia que culminam com a necrose tecidual. (MCCORD, 1985).

A isquemia tecidual aumenta o catabolismo dos nucleotídeos e grande quantidade de hipoxantina se acumula nos tecidos. Nesta fase a xantina desidrogenase se converte em xantina oxidase. Após a normalização do fluxo sanguíneo no retalho, 12 a 48h após, a xantina oxidase utiliza o oxigênio molecular ao invés do cofator NAD e catalisa a conversão da hipoxantina

em ácido úrico, sendo assim uma fonte geradora de radicais superóxidos e demais RL (REES, R. et al., 1994).

Os RL danificam as membranas e também o núcleo das células através da lipoperoxidação. O endotélio vascular também é lesado por esse processo, levando a uma diminuição na síntese de substâncias vasodilatadoras como o óxido nítrico (NO) além da prostaciclina-sintetase, que é convertida em prostaciclina-PGI. Portanto, com a diminuição da produção desses vasodilatadores, ocorre o predomínio dos vasoconstrictores, que estimulam a agregação plaquetária através da produção de tromboxane –TXA2 e esses fatores contribuem para necrose tecidual. (MÉLEGA; VITERBO; MENDES, 2011; REES, R. et al., 1994).

2.1.1.3 Inflamação local

Todo procedimento cirúrgico induz a um processo inflamatório e produção de agentes pró inflamatórios como histamina, serotonina e prostaglandinas. Estas substâncias aumentam a permeabilidade microvascular e o fluxo sanguíneo local, contudo esse efeito benéfico é contrabalanceado pelo edema no sítio cirúrgico. (REES, R. et al., 1994).

Nas respostas inflamatórias agudas persistentes, nota-se uma acentuada produção de RL, o que esgota a reserva de defesa do organismo, como por exemplo a superóxido desmutase (SOD). Os RL geram lesões em cascata e prolongam o processo inflamatório com maior infiltrado leucocitário e maior área de necrose. (MÉLEGA; VITERBO; MENDES, 2011; REES, R. et al., 1994; REES, R. S. et al., 1995).

Os graus de vasoconstrição e perfusão dos retalhos são variáveis a depender da tensão aplicada, edema tissular, infecção local e patência do pedículo vascular do retalho. (BANBURY; SIEMIONOW; PORVASNIK, 1999; IBRAHIM et al., 2014). Quando esses fatores são favoráveis, o fluxo sanguíneo pelo retalho, que inicialmente apresentava-se isquêmico, é reestabelecido e existe recuperação dos níveis de oxigênio tissular. Contudo, em situações onde a isquemia persiste e o retalho permanece sem perfusão, o tecido isquêmico evolui para necrose tecidual.

O comprometimento da oferta de oxigênio nos retalhos induz ao metabolismo celular anaeróbico, diminuição do pH e produção de RL. Estas alterações provocam desregulação de mecanismos de controle iônico das membranas celulares, o que permite maior influxo de íons de cálcio para o meio intracelular, provocando apoptose celular e necrose tecidual. (EMAMI et al., 2013).

Outra fonte importante de nutrientes e oxigênio para o retalho, além do pedículo vascular, é a base do defeito primário da ferida. (IBRAHIM et al., 2014). É a partir da interação do leito da ferida com o retalho transferido que são formados neovasos para suprir áreas isquêmicas já a partir do segundo e terceiro dias pós operatórios. A formação de neovasos está associada ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). e consequentemente a uma melhor viabilidade dos retalhos em estudos com substâncias exógenas que estimulam a produção de VEGF. (BIN et al., 2015; CHEON; TARK; KIM, 2012).

Muitas substâncias, como vasodilatadores, bloqueadores de canal de cálcio, inibidores de prostaglandinas, glicocorticóides e removedores de RL apresentaram melhora na viabilidade de retalhos cutâneos isquêmicos em estudos prévios. (GOZU; PODA, 2010; MANCHIO et al., 2009; NEZAMI; TALAB; EMAMI, 2009).

2.1.2 Substâncias estudadas na prevenção de necrose tecidual em retalhos isquêmicos

2.1.2.1 Vasodilatadores

Dentre as substâncias utilizadas para prevenção de necrose tecidual em retalhos isquêmicos, os vasodilatadores foram amplamente pesquisados em vários modelos. Várias drogas com propriedade vasodilatadora foram testadas, como a nitroglicerina, fenoxibenzamina, nifedipina, minoxidil, alopurinol; a nitroglicerina apresentou um efeito superior na prevenção da necrose em relação a essas outras drogas. (DAVIES; LEWIS; PENNINGTON, 1998).

O mecanismo de ação da nitroglicerina tópica dá-se através do relaxamento da musculatura lisa da parede dos vasos, promovendo tanto uma dilatação do leito arterial quanto venoso. (NEEDELMAN; CORR; JOHNSON, 1985). Além do importante efeito vasodilatador, a nitroglicerina também pode induzir a síntese de prostaciclina, que é um vasodilatador e inibe a agregação plaquetária, impedindo a formação de microtrombos e, dessa forma, aumentando a viabilidade dos retalhos cutâneos. (LEVIN et al., 1981).

A pomada de nitroglicerina foi inicialmente utilizada por Rohrich, Cherry e Spira (1984) em modelo animal, que demonstrou melhora na taxa de viabilidade de retalhos axiais em ratos (89.4% versus 68.9% de área viável) e em porcos (74,1% versus 50,5% de área viável) com a dose de 30mg aplicada no pré operatório e três dias após a cirurgia. Embora a maioria dos estudos em modelos animais tenham mostrado benefício com a utilização da nitroglicerina, alguns trabalhos não demonstraram melhora na viabilidade tissular. (ATALAY et al., 2003;

SMITH, D. K.; DOLAN, 1999). Estes estudos tem em comum a utilização de menores doses dessa substância, 5 mg, o que pode justificar a falha terapêutica na prevenção da necrose. (GDALEVITCH et al., 2015).

Nichter et al (1985) utilizaram da pomada de nitroglicerina em humanos pela primeira vez em retalhos confeccionados para correção de hipospádia, apresentando melhora na viabilidade tissular. Gdalevitch et al (2015) realizaram um ensaio clínico cego e randomizado com 165 pacientes submetidas à mastectomia e reconstrução mamária imediata onde 80 pacientes receberam a aplicação de pomada de nitroglicerina na dose de 45mg em aplicação única no curativo realizado na sala de cirurgia. O estudo foi interrompido na primeira análise de dados, pois mostrou uma melhora significativa no percentual de área de necrose do grupo da nitroglicerina em relação ao grupo controle, 15,3% (13 pacientes) versus 33,8% (27 pacientes) ($p=0,006$), respectivamente.

Yun et al. (2017) realizaram ensaio clínico semelhante, também em pacientes submetidas à mastectomia e reconstrução imediata de mama, 73 pacientes ao todo, sendo 56 do grupo tratado com 4,5mg pomada de nitroglicerina no momento do curativo cirúrgico e, seguidamente, no segundo, quarto, e sexto dias pós operatórios. A redução do risco de necrose obtida no grupo tratado foi estatisticamente significativa, seis vezes menor que o grupo controle. A incidência de cefaleia foi um pouco maior no grupo que utilizou a nitroglicerina, contudo, sem significância estatística.

As doses da nitroglicerina utilizadas em estudos com retalhos pós mastectomia variaram de 5mg a 50mg. (FAN; HE, 1993; KUTUN et al., 2010). Alguns relatos de hipotensão arterial e cefaleia severa em pacientes que utilizaram a pomada de nitroglicerina foram descritos e são potenciais efeitos colaterais ocasionados pela absorção sistêmica dessa substância, por isso é importante o cuidado e monitorização após a utilização da substância (GDALEVITCH et al., 2015).

A nitroglicerina é uma das substâncias que apresenta os estudos mais consolidados em seres humanos, com ensaios clínicos randomizados e com resultados animadores em relação à diminuição de necrose cutânea. Apesar da necessidade de ampliação dos estudos para que esta substância se torne estabelecida como de uso padrão para melhora da viabilidade em retalhos, a mesma parece ser uma opção de fácil acesso para este fim. Contudo, ainda existe o impacto causado pelos efeitos colaterais devido a sua absorção sistêmica (GDALEVITCH et al., 2015).

Outro vasodilatador pesquisado, o minoxidil, que é uma substância utilizada no tratamento da alopecia androgênica devido à estimulação do crescimento capilar, não se mostrou efetivo para reduzir a necrose dos retalhos cutâneos em estudos animais.

(BITTENCOURT et al., 2005; GUMUS et al., 2012; SMITH, D.; DOLAN, 1999). No entanto, quando utilizada por via tópica previamente à confecção do retalho durante um período de 7 dias, na dose de 5%, como um tipo de autonomização não cirúrgica, apresentou um efeito positivo sobre a viabilidade dos retalhos em relação ao grupo controle. Porém, ainda inferior em relação ao grupo que recebeu a autonomização cirúrgica. (GUMUS et al., 2013).

Considerando que o minoxidil já é comercializado com baixo custo e apresenta efeitos colaterais mínimos, a sua utilização pré-operatória pode ser considerada em pacientes com alto risco de necrose de retalho, como fumantes e diabéticos. Ou ainda em retalhos que teriam indicação de autonomização cirúrgica, pois o minoxidil apresenta um efeito pró angiogênico que pode ser considerado como um tipo de autonomização não cirúrgica, repercutindo em diminuição na necrose nos retalhos. (GUMUS et al., 2013).

2.1.2.2 Heparinóides, anticoagulantes e antiagregantes plaquetários

Um dos fenômenos presentes na fisiopatologia da necrose em retalhos cutâneos isquêmicos é a formação de microtrombos nos vasos que irrigam as porções mais distais. Desta maneira, a microcirculação fica comprometida e o tecido evolui da isquemia para a necrose tecidual. (LIVAOĞLU et al., 2010). Seguindo este raciocínio, a administração de heparina evitaria a formação de microtrombos e haveria impacto na melhora da viabilidade de retalhos cutâneos isquêmicos. Tanto a heparina não fracionada quanto a heparina de baixo peso molecular (HBPM). apresentaram efeitos positivos sobre a viabilidade dos retalhos em estudos com modelos animais com aplicação sistêmica ou tópica. (CHUNG; HOLTON; SILVERMAN, 2006; MIYAWAKI et al., 2002; TÖRKVIST et al., 2004).

No entanto, Shalom, Friedman e Westreich (2008) não evidenciaram este efeito em retalhos cutâneos isquêmicos em ratos e atribuíram este fato à possibilidade do retalho isquêmico criado no modelo ter uma insuficiência arterial predominante e não congestão venosa.

O Polissulfato de Mucopolissacarídeo (MPS), que apresenta estrutura química relacionada com a heparina e por isso é descrita como um heparinóide, foi testado em retalhos isquêmicos confeccionados em ratos. O grupo tratado com o MPS em forma de pomada aplicada sobre a pele obteve uma menor área de necrose (31,7%). comparado ao grupo controle (48,9%), além de um menor grau de inflamação e edema locais. (LIVAOĞLU et al., 2010).

A aspirina é um inibidor irreversível da ciclooxigenase, que tem propriedade antiagregante plaquetária e anti-inflamatória, foi testada em altas doses (200mg/Kg) e baixas

doses (40mg/Kg) em modelo murino. Foi evidenciado que a aspirina administrada em baixas doses não evidenciou melhora na viabilidade dos retalhos, no entanto, o grupo que recebeu altas doses apresentou uma área de viabilidade de 75,75% enquanto no grupo controle a área viável foi de 51,17% ($p < 0,01$). Este resultado sugere que o efeito anti agregante da aspirina, quando utilizada em baixas doses, não foi suficiente para diminuir a necrose tecidual, contudo, ao utilizar altas doses o efeito anti-inflamatório é mais proeminente e pode ser o responsável pela melhora na viabilidade tissular. (SHALOM; FRIEDMAN; WESTREICH, 2008).

2.1.2.3 Removedores de radicais livres

Na tentativa de combater os efeitos deletérios provocados pelos RL, as pesquisas focam nos removedores de RL como a deferoxamina, manitol, superóxido desmutase (SOD) e nos bloqueadores da formação dos RL como o alopurinol. A capacidade da SOD em prevenir necroses em porções distais de retalhos isquêmicos foi demonstrada em alguns estudos, porém com a aplicação sistêmica da substância. (MANSON et al., 1983; SAGI et al., 1986). A aplicação local, diretamente no retalho cutâneo foi testada e apresentou interferência positiva sobre a viabilidade tissular. (IM et al., 1984). No entanto, Suzuki e cols mostraram que a aplicação simples do Cobre-zinco superóxido desmutase (Cu-Zn SOD). sobre o retalho em modelo animal não demonstrou aumento da viabilidade dos tecidos, contudo, quando este composto era aplicado na porção inferior ao retalho ou usando em um curativo oclusivo, a diminuição da necrose foi alcançada. (ASHOORI et al., 1996). Em outro estudo utilizando modelo murino, houve aumento da viabilidade em retalho isquêmico criado no dorso de ratos, utilizando a Cu-Zn SOD em injeções intradérmicas 15 minutos antes da realização das incisões na dose de 50mg/kg. O grupo que recebeu a Cu-Zn SOD intradérmica apresentou uma viabilidade em 49.18mm enquanto o grupo controle em 34.84mm ($p > 0,01$) (SCHEIN; WESTREICH; SHALOM, 2012).

O alopurinol é um inibidor da xantina oxidase, que atua diminuindo a produção de RL e foi descrita a sua propriedade em aumentar a viabilidade de retalhos cutâneos em alguns estudos. (ANGEL et al., 1988; IM et al., 1984; MANSON et al., 1983; PRICE; PEARL, 1994). Além do efeito de vasodilatação direta e indireta no retalho, o que promove aumento na perfusão tecidual (PICARD-AMI; MACKAY; KERRIGAN, 1991). A utilização do alopurinol em ratos previamente à confecção do retalho promoveu aumento na quantidade de fibras colágenas, na resistência da pele e redução de edema (SENEL et al., 1997).

A diminuição da necrose tissular em retalhos isquêmicos foi demonstrada em alguns trabalhos, (ANGEL et al., 1987) contudo outros não conseguiram evidenciar benefício na utilização do alopurinol. Em estudo realizado com porcos, o alopurinol na dose de 50mg/kg, em dose única ou administrada três dias antes e cinco dias após a cirurgia, não houve melhora na viabilidade dos retalhos. (PICARD-AMI; MACKAY; KERRIGAN, 1991). Outros regimes de posologia foram testados em diferentes experimentos, um deles utilizou 25mg/Kg em duas aplicações diárias em porcos, porém não obteve sucesso na melhora da viabilidade de retalhos músculo cutâneos. (DORION et al., 1993). Todavia, existe uma controvérsia em relação à extrapolação dos resultados desses estudos para outras espécies, pois a xantina oxidase apresenta baixos níveis de atividade nos tecidos suínos e em humanos. (PRADA et al., 2002). Enquanto que a atividade da xantina oxidase é 40 vezes mais proeminente na pele de ratos do que em humanos e suínos. Este fato pode justificar os bons resultados obtidos nos estudos com modelos murinos nos quais a xantina oxidase era reduzida. (PICARD-AMI; MACKAY; KERRIGAN, 1991).

2.1.2.4 Outras Substâncias testadas

2.1.2.4.1 Eritropoietina

Inúmeras substâncias vêm sendo testadas na tentativa de reduzir a necrose tecidual em retalhos isquêmicos. A eritropoietina foi investigada para este fim em modelos murinos e apresentou uma melhora no processo de cicatrização e viabilidade tissular tanto em estágios iniciais ou tardios após o trauma cirúrgico, além de redução da resposta inflamatória e aumento na formação de capilares sanguíneos no tecido conjuntivo. (BUEMI et al., 2002). Rezaeian et al (2008) investigaram o tempo de efeito após a administração da eritropoietina em ratos e concluíram que somente existe benefício para melhora da viabilidade quando administrada 48h previamente à cirurgia, em três aplicações com dose de 500UI EPO/Kg. Não houve benefício quando utilizada no pós operatório. Este resultado deve-se a um aumento precoce da óxido nítrico sintetase, que é convertida em óxido nítrico (NO) e, por sua vez, induz à vasodilatação e aumento do fluxo de perfusão para o tecido.

2.1.2.4.2 Toxina botulínica

A toxina botulínica foi pesquisada em retalhos isquêmicos de modelos animais, as toxinas botulínicas tipos A e B apresentaram aumento na viabilidade tissular se utilizadas tanto no pré-operatório quanto no intra operatório. Todavia, os grupos que receberam a aplicação no intra operatório tiveram índices de viabilidade um pouco melhores que os do pré-operatório. Enquanto o grupo controle apresentou viabilidade de $62\% \pm 10\%$, o grupo da toxina botulínica A intra operatória de $88\% \pm 4\%$, toxina botulínica A pré operatório de $84\% \pm 5\%$, toxina botulínica B pré operatória de $91\% \pm 4\%$ e toxina botulínica B intra operatória de $92 \pm 5\%$. Teoricamente, o grupo de tratamento pré operatório deveria ter uma resultado melhor devido à deservação química causada pela toxina e maior vasodilatação e perfusão tecidual que ocorreria antes mesmo da cirurgia, contudo, os resultados observados foram diferentes possivelmente devido a uma maior expressão da óxido nítrico sintetase no grupo que recebeu a aplicação no intra operatório. (SCHWEIZER et al., 2013).

2.1.2.4.3 Fator de crescimento endotelial

O Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) apresenta, além do efeito de promover a permeabilidade capilar e neovascularização, também a propriedade vasodilatadora e interação com o retallo e leito das feridas ao nível bioquímico. Citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral X, são suprimidas pelo VEGF, além de influenciar na cascata metabólica do óxido nítrico. (PANG, Y.; LINEAWEAVER; LEI, 2003; TOPP, S.; ZHANG; CHATTERJEE, 2005; TOPP, S. G. et al., 2005). A aplicação do VEGF em retalhos cutâneos isquêmicos, retalhos musculares e de fluxo venoso, obteve melhora na viabilidade e redução da necrose. (KOMOROWSKA-TIMEK et al., 2004; KRYGER; DOGAN; ZHANG, 1999; KRYGER; ZHANG; DOGAN, 2000; ZHANG, F, OSWALD T, LIN S, 2003; ZHANG; BROOKS; CHEN, 2006).

2.1.2.5 Terapia genética

A manipulação genética parece ser a área do futuro para solucionar diferentes problemas em diversas especialidades da medicina, incluindo a tentativa de salvar retalhos isquêmicos. Foi testada um tipo de terapia genética em modelo murino, onde foram transferidos codificadores da isoforma do fator de crescimento endotelial (VEGF). para retalhos isquêmicos

usando eletrotransferência. (BASU et al., 2014). Este é um método de transferência mais recente e não apresenta efeitos colaterais dos outros tipos de transferência, que utilizam vírus ou proteínas recombinantes. (VICENT et al., 2007).

Foi observada significativa melhora na viabilidade dos retalhos no grupo tratado, 98.63% $\pm$ 1.1%, enquanto o grupo controle apresentou 79.8% $\pm$ 5.2% ($p < 0,05$). Estes bons resultados foram obtidos quando a terapia genética foi aplicada no momento do procedimento cirúrgico ou até dois dias após, contudo, quando aplicada quatro dias após a cirurgia, a terapia não mostrou eficácia similar devido ao processo de isquemia avançada já está estabelecido neste período. (BASU et al., 2014).

A terapia genética é uma importante alternativa e apresentou resultados excelentes em estudos com animais, porém ainda utiliza métodos experimentais e requerem melhoramentos para uso em larga escala em humanos. (BASU et al., 2014).

2.2 MODELOS DE ESTUDO DE RETALHOS ISQUÊMICOS

A determinação do tamanho da área dos retalhos cutâneos randômicos é frequentemente difícil, porque eles apresentam uma nutrição ao acaso, o que facilita uma maior possibilidade de isquemia e necrose. A relação entre a largura do pedículo e o comprimento do retalho cutâneo é fundamental no estabelecimento da sua viabilidade. O modelo de McFarlane, que é um retalho de 9x3 cm com proporções de 3:1 é bastante utilizado entre os estudos para investigação de retalhos isquêmicos na literatura (ACEVEDO-BOGADO et al., 2002; ALMEIDA et al., 2004).

McFarlane et al (1965) propuseram o modelo experimental de retalho cutâneo dorsal em ratos de base cranial medindo 10 x 4 cm, para estudar a necrose dos mesmos. Observaram necrose em 94,3% dos animais, com média de 25 a 50% da área. Este modelo foi modificado no ano seguinte, onde foi alterado o suprimento sanguíneo de cranial para caudal e foi proposta uma relação de comprimento e largura de 3:1, resultando em 9 x 3 cm. Apesar do modelo ser diferente, o autor manteve a homenagem a McFarlane e denominou o retalho como McFarlane modificado. (ADAMSON et al., 1966).

Kerrigan (1983) realizou um estudo experimental em porcos cujo objetivo era investigar os mecanismos fisiopatológicos de necrose do retalho cutâneo e evidenciou que a insuficiência arterial do retalho é o fator intrínseco mais importante no mecanismo de formação da necrose. Ressaltou no estudo a importância de tratamentos que aumentem a vascularização do retalho. Asai, Fukuta e Torii (1997) propuseram um modelo de retalho cutâneo dorsal no rato de base caudal. Os resultados mostraram necrose de 50%, em uma área de 2x7cm, sem interposição de

barreira plástica. Jansen et al. (1999) usaram modelo dorsal de base cranial sem interposição de barreira plástica em ratos e encontraram necrose de 40% no 7º dia de pós-operatório.

Alguns autores propuseram a utilização de membrana plástica entre o leito da ferida e o retalho cutâneo, para evitar a troca natural de nutrientes. Desta forma é possível atribuir que somente o fluxo sanguíneo proveniente do pedículo do retalho é o responsável pela área viável do mesmo, eliminando o grau de interação entre o leito e o retalho. (CAMPBELL; MOSS; HUGO, 1992; JONES et al., 2001; MUTAF; TASAKI; FUJII, 1994).

2.3 RHIZOPHORA MANGLE L.

A *Rhizophora mangle* L. (*R. mangle*), também conhecida como mangue-vermelho, é amplamente distribuída ao longo das costas tropicais e subtropicais da América Central e do Sul, Flórida, África Ocidental e nas ilhas de Fidji, Tonga e Nova Caledônia. (SILVA; FERNANDES, 2004).

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

As propriedades farmacológicas desta planta devem-se à presença dos compostos secundários contidos na mesma. Estes compostos são de fundamental importância para sobrevivência dessas espécies, pois são responsáveis por várias atividades biológicas, como por exemplo o efeito antimicrobiano, antifúngico e antiviral, o que protege as plantas dos patógenos do meio ambiente, assim como atividade antigerminativa ou tóxica para outras plantas. (PERREIRA; CARDOSO, 2012). Dentre estes compostos, os polifenóis tem função de proteção contra os raios ultra violeta, defesa contra patógenos e efeito antioxidante. (KANDIL et al., 2004).

A composição química da *R. mangle* foi estudada qualitativamente por Sánchez et al (1998) em plantas do mangue de Cuba e a presença dos compostos polifenólicos foi destacada (54,78%). A maioria destes compostos foram os taninos, representados em 80% por taninos poliméricos e em 20% por hidrolisáveis, nestes últimos destaca-se a presença da epicatequina, catequina, ácido clorogênico, ácido gálico e ácido elágico. Os outros componentes incluem carboidratos (17,5%), ácidos graxos (4%), fitoesteróides (0,0285%) e compostos voláteis ou

semivoláteis (0,0205%). Além dos taninos, outros compostos polifenólicos encontrados principalmente nas folhas da *R. mangle*, foram os flavonóides, representados principalmente pela quercetina (KANDIL et al., 2004).

Os taninos são substâncias secundárias, fenólicas, responsáveis pela adstringência dos vegetais. Apresentam massa molecular entre 500 e 3000 Daltons e são solúveis em água. São classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. (SANTOS; MELLO, 2004). Estão entre os principais compostos polifenólicos do extrato aquoso da *Rhizophora mangle*, incluindo taninos poliméricos e hidrolisáveis. (BERENGUER et al., 2006). São conhecidos por suas atividades antimicrobianas, além de relatos de agirem sobre o metabolismo do ácido araquidônico em leucócitos com papéis importantes nos processos inflamatórios e são utilizados em tratamentos que promovem a cicatrização de feridas. (OFORI-KWAKYE; KWAPONG; BAYOR, 2011).

Os flavonóides também são substâncias fenólicas de baixo peso molecular com ampla distribuição no reino vegetal. Apresentam estruturas baseadas no esqueleto heterocíclico aromático, 2-fenilbenzopirona ou 3-fenilbenzopirona contendo 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico. Possuem múltiplos efeitos biológicos, como atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, poder de redução da fragilidade e permeabilidade capilares; inibição da destruição do colágeno e da agregação plaquetária. Assim, a ingestão de flavonóides está associada à longevidade e à redução na incidência de doenças cardiovasculares. (AUGER et al., 2004).

A atividade anti-inflamatória dos flavonóides deve-se à atuação sobre as enzimas e vias envolvidas nestes processos, por exemplo, a prostaglandina PGE₂, o TNF α , (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000). em proteínas inflamatórias de macrófagos, e a COX-2mRNA. (TALHOUK et al., 2007). Podem agir de forma sinérgica com os taninos na regulação da regeneração tecidual. (OFORI-KWAKYE; KWAPONG; BAYOR, 2011). Em estudo prévio, o extrato da planta, *Hippophae rhamnoides L.*, rico em flavonóides foi testado e demonstrou diminuição da área de necrose em retalhos cutâneos isquêmicos em ratos. (EMSEN, 2005).

A toxicidade do extrato aquoso da *R. mangle* foi avaliada em estudo anterior e não demonstrou efeitos negativos sobre as células HeLa, demonstrando a biocompatibilidade do composto em estudo. (ARAÚJO, 2015).

A *Rhizophora mangle L.* tem sido utilizada para tratamento de úlceras gástricas, (BERENGUER et al., 2006). apresenta ação antibacteriana, (MELCHOR et al., 2001). atividade antioxidante e anti-inflamatória. (MARRERO et al., 2006). O efeito cicatrizante do

extrato aquoso da *R. mangle* é devido à estimulação da angiogênese, migração de fibroblastos para o leito da ferida e efeito anti oxidante. (FERNANDEZ et al., 2002). Em virtude dessas propriedades, a utilização do biopolímero do extrato da *R. mangle* em retalhos isquêmicos foi cogitada na tentativa de obter-se menores índices de necrose tecidual.

2.4 KEFIR

A origem do Kefir ocorreu nas montanhas de Cáucaso e a história sugere que os caucasianos descobriram a fermentação do leite a partir de bolsas de couro que resultavam em uma bebida efervescente (IRIGOYEN, 2005). O kefir pode ser cultivado utilizando diferentes fontes de carbono, como a lactose presente no leite, (GUL et al., 2015) tanto em leite de vaca, como em leite de soja (KESENKAS et al. 2011) ou em açúcar mascavo (MIGUEL et al., 2011).

Os grãos de kefir são compostos sintetizados por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces amnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus*). *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp. e Streptococcus salivaris subsp. Thermophilus*. (BRASIL, 2007). Esta associação microbiana diversificada de bactérias e leveduras encontra-se na Tabela 1.

Apresenta-se macroscopicamente como grãos gelatinosos, de forma irregular, tamanhos variados entre 3 a 20 mm e coloração variável de acordo com o substrato que pode ser leite, suco de frutas ou água com açúcar mascavo, onde ocorre naturalmente a fermentação (DINIZ; PERAZZO; CARVALHO, J. C. SCHNEENEDORF, 2003).

É necessário um processo complexo para manter a estabilidade da composição química do Kefir durante a sua produção. Podem gerar partículas translúcidas quando cultivados em sacarose, na presença ou não de frutas, dependendo do açúcar utilizado, no caso do mascavo formam grãos com coloração marrom. O kefir quando cultivado em leite pode gerar partículas brancas ou amareladas (GARCÍA FONTÁN et al., 2006; PAIVA, 2013). E os seus grãos apresentam formatos diferentes, que variam entre 2-3 cm de diâmetro, cobertos por uma matriz polissacarídica (PAIVA, 2013).

Em relação à atividade biológica do kefir alguns estudos em camundongos indicaram que, quando os camundongos foram irradiados, houve proteção das células nas criptas da mucosa do cólon contra apoptose (MATSUU et al., 2003) outro estudo sugeriu que o kefir de leite e soja apresenta significativa atividade antimutagênica e antioxidante e, por isso, é atuante contra mutação e danos oxidativos. (LIU; CHEN; LIN, 2005).

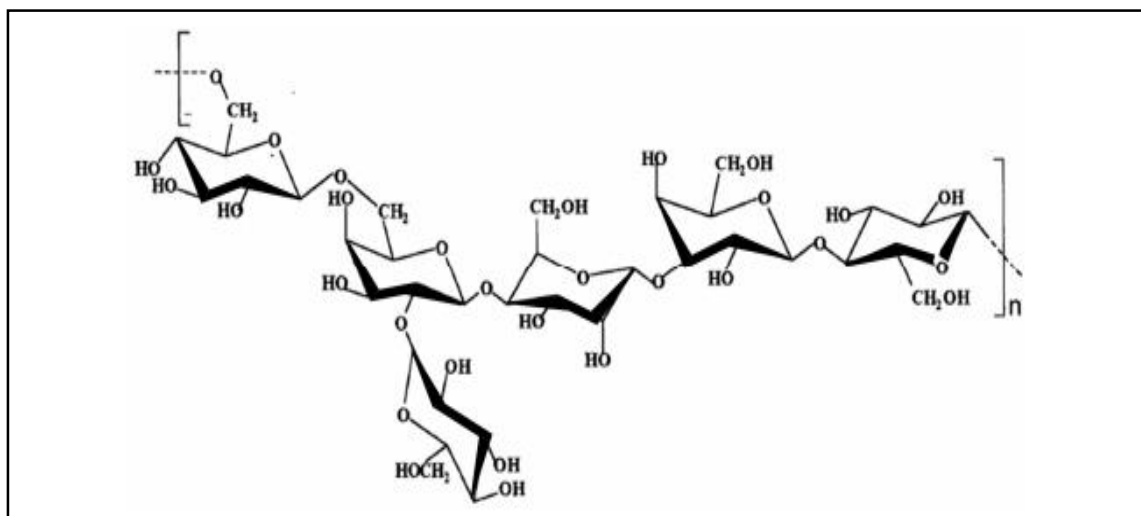
Tabela 1 - Microrganismos encontrados no Kefir

Tipos de micro-organismos onde foi encontrado o kefir	Micro-organismos identificados		Referência
Bactérias ácido-láticas	<i>Lactobacillus (L.b).</i>	<i>Lb. brevis</i>	Angulo et al. (1993). Simova et al. (2002).
		<i>Lb. viridescens,</i> <i>Lb. gasseri,</i> <i>Lb. fermentum,</i> <i>Lb. Casei</i>	Angulo et al. (1993).
		<i>Lb. kefir</i>	Angulo et al. (1993). Marshall; Cole; Brooker (1984).
		<i>Lb. kefiranofaciens</i>	(Toba; Abe; Adachi 1987).
	<i>Lactococcus</i>	<i>Lb. kefirgranum, Lb. parakefir</i> <i>Lactococcus lactis subps. lactis</i>	Takizawa et al. (1994). Bolla et al. (2013).
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LIN; CHEN; LIU (1999).
	<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter sicerae sp. nov.</i>	Li et al. (2014).
Fungos	Leveduras	<i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Saccharomyces omnispurus</i> <i>Saccharomyces cerevisae</i> <i>Saccharomyces exiguus</i> <i>Candida torulopsis</i>	Simova et al. (2002). Guzel-Seydim et al. (2005). Brasil (2007). Ninane, Mukandayambaje; Berben (2007). Yuksekdag; Beyatli; Aslim (2004).

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

Algumas bactérias presentes nos grãos de kefir secretam exopolissacarídeos (EPS), o primeiro deles a ser isolado foi a kefirana, que é um carboidrato parcialmente solúvel em água. A kefirana é um polímero natural composto por repetidas unidades de monossacarídeos, glicose, ramnose, galactose e arabinose nas seguintes proporções respectivamente: 4.0:2.4:1.0:2,6. (Figura 2). Estes carboidratos apresentam vários efeitos benéficos, como por exemplo a redução da pressão arterial em hipertensos, atividades probióticas, redução da glicemia, (MOREIRA et al., 2008) atividade anti-inflamatória, (SCHNEEDORF; ANFITEATRO, 2004). atuam como antioxidante e antimutagênico (LIU; CHEN; LIN, 2005). e possuem também ação antimicrobiana. (WESCHENFELDER; WIEST; CARVALHO, 2009).

Figura 2 - Estrutura esquematizada da kefirana



Fonte: Vu et al (2009).

Outros exopolissacarídeos provindos do kefir foram descobertos e, dependendo da fonte de carbono utilizada no meio de cultura, podem produzir diferentes tipos de EPS, demonstrados na Tabela 2 (AHMED et al., 2013; CHEN et al., 2015; FIORENTINI et al., 2011; GHASEMLOU et al., 2012; JEONG et al., 2017).

Tabela 2 - Polissacarídeos e Monossacarídeos encontrados no kefir

Polissacarídeo	Monossacarídeos	Micro-organismos produtores	Substrato	Autor (es).
Não informado	Gli.	Kefir (associação microbiana).	Leite de soja	Botelho et al. (2014).
Não informado	Gal./Gli.	Kefir (associação microbiana).	Leite desnatado	Chen et al. (2015a).
Não informado	Man./Ara./Gli./Gal./Ram.	<i>Lb. kefiranofaciens</i>	Leite esterilizado	Jeong et al. (2017).
α -glucanas	Gli.	<i>Lb. kefiranofaciens</i> e <i>Lb. satsumensis</i>	Não informado	Paiva et al. (2016).
Não informado	Man./Gli./Gal.	<i>Lb. plantarum</i>	Não informado	Wang et al. (2010).
Kefirana	Ara./Gli./Gal./Ram	Kefir (associação microbiana).	Açúcar mascavo e água	Moreira et al. (2008).

Legenda: Gli. (glicose). ; Man. (Manose). ; Ara. (Arabinose). ; Gal. (Galactose). ; Ram. (Raminose).

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

2.5 BIOPOLÍMEROS / EXOPOLISSACARÍDEOS

Biopolímeros são tipos de polímeros produzidos por seres vivos, ou seja, são biomoléculas poliméricas. São extraídos a partir de várias espécies de bactérias, plantas e também do milho, soja e cana de açúcar. São facilmente degradados e convertidos em CO₂, água, biomassa e outros compostos naturais. (YADAV, 2015). Os exopolissacarídeos são uma classe de biopolímeros.

Produtos biodegradáveis são bastante úteis para aplicações médicas, principalmente em áreas como desenvolvimento de sistemas de liberação de medicamentos, engenharia de tecidos, fechamento de feridas e produtos cicatrizantes. (YADAV, 2015).

Nas plantas o polissacarídeo mais conhecido é a celulose, que confere resistência, rigidez, impede o edema celular e a ruptura da membrana plasmática. A sua estrutura é formada por unidades de D-glicose com ligações β (1 $\rightarrow$ 4). Ela é sintetizada por um complexo esquema enzimático que monta as cadeias de celulose pela membrana plasmática, com uma parte posicionada para ligar o substrato, UDP-glicose, no citosol e uma outra parte estendendo-se para fora, que é responsável pelo alongamento e cristalização das moléculas de celulose no espaço extracelular. Nas paredes celulares também são encontrados polissacarídeos neutros (que não possuem carga), como as galactanas, arabinogalactanas e arabinanas que costumam estar associadas a pectinas. (TAIZ, LINCOLN; ZEIGER, 2004).

A síntese do exopolissacarídeo envolve três fases, sendo a primeira fase de assimilação do carbono disponível no meio, a segunda fase de produção de síntese intracelular e a terceira fase está relacionado à liberação do EPS para fora da célula. Os micro-organismos costumam produzir esse biomaterial com a função de adesão da célula e consequente formação e manutenção da colônia a partir de biofilmes. (CZACZYK; MYSZKA, 2007).

Os principais polissacarídeos são do tipo glucana e apresentam unidades repetidas de D- anidro-hexose e podem conter ou não grupos substituintes ligados ao anel glicopiranosídico unidos através de ligações α ou β . Eles são bastante comuns na parede celular de alguns vegetais, e podem ser isolados de micro-organismos (fungos e bactérias). São formados por ligações glicosídicas (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6), (1 $\rightarrow$ 6), (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 4). As glucanas são responsáveis pelas ações: antiproliferativa, imunomodulatória e antioxidante, hipocolesterolêmica e hipoglicemiante. (SOMENSI, 2014).

Na indústria de cosméticos, o β -glucano pode ser utilizado em cremes, unguentos, e já foi comprovada a sua eficácia na indução da formação de colágeno e por reduzir as linhas de

expressão, rugas, celulite, acne, dermatite, eczema, psoríase, e por tratar de outras condições da pele. O β -glucano pode atuar também como um hidratante formador de filme cicatrizante de feridas e ainda contribuir no antienvelhecimento e revitalização da pele e do cabelo. (ZHU; DU; XU, 2016). Na indústria farmacêutica, já foram realizados vários ensaios clínicos com os β -glucanos para testar seus efeitos gerais sobre a saúde, entre eles o da administração oral *in vivo*. Já foi comprovada sua ação cicatrizante no revestimento de feridas, onde o mesmo pode ser utilizado em forma de filmes como substituto temporário de pele e como scaffolds na engenharia de tecidos. Nas vacinas, podem ser usados como adjuvantes, imunomoduladores, no revestimento de cápsulas e outros medicamentos que passam pela via oral, além da formulação de medicamentos por apresentarem ação antioxidante e antitumoral. (VETVICKA; VETVICKOVA, 2012; ZHU; DU; XU, 2016). Uma aplicação deste exopolissacarídeo é atuar na produção de outros biomateriais, como plastificantes (VIEIRA et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a eficácia do extrato da *Rhizophora mangle* associado ao biopolímero de betaglucana (Filme de RmBg) na prevenção de necrose tecidual em porções distais de retalhos cutâneos isquêmicos em ratos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Realizar análise fitoquímica do extrato aquoso da *R. mangle*.
- Descrever aspectos macroscópicos e realizar análise da área de necrose tecidual dos retalhos cutâneos isquêmicos nos grupos de animais tratados e controles.
- Avaliar o grau de contração de ferida nos retalhos dos grupos tratados e controle.
- Avaliar o grau de inflamação, a vascularização e os fibroblastos dos retalhos isquêmicos através do estudo histomorfométrico dos grupos.
- Descrever possíveis eventos adversos dos compostos utilizados no experimento

4 MATERIAL E MÉTODOS

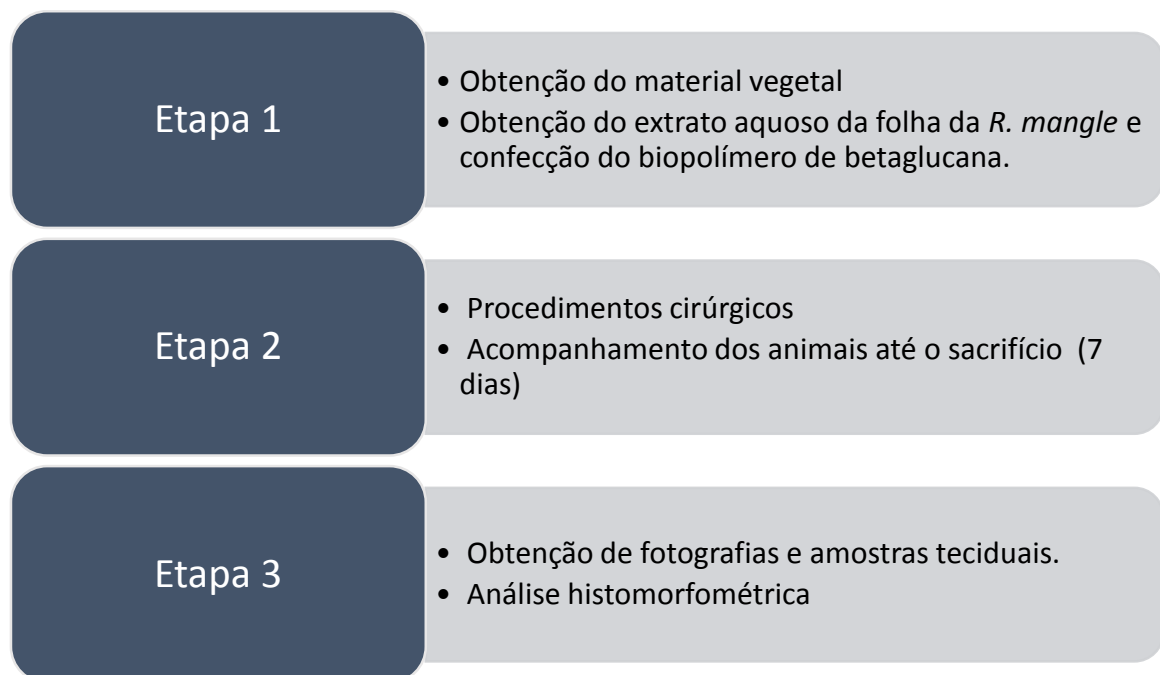
4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de intervenção ou experimental

4.2 INTERVENÇÃO REALIZADA

Os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para confecção de retalho cutâneo isquêmico e, a partir da divisão dos grupos experimentais, o extrato da *R. mangle* associado ao biopolímero de betaglcana foi aplicado. A Figura 3 mostra o fluxograma das etapas do estudo.

Figura 3 - Fluxograma das etapas do estudo



Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

4.3 LOCAL E PERÍODO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Departamento de Fisiologia / Endocrinologia - CCB/UFPE no período de outubro a novembro de 2017. As atividades de análise histomorfométricas ocorreram inicialmente no departamento

de Odontologia, onde foram escaneadas as lâminas e processadas digitalmente. Posteriormente a análise das mesmas foi realizada no Departamento de Histologia e Embriologia - CB/UFPE.

4.4 POPULAÇÃO DA PESQUISA / AMOSTRA

4.4.1 População Alvo

Foram utilizados Ratos Wistar machos com idade de 10 a 12 semanas, provenientes da mesma linhagem reprodutiva, pesando em média 280 a 310g provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia da UFPE - Recife, Pernambuco/Brasil. Foram aclimatados em gaiolas apropriadas, em temperatura controlada, livres de ruídos e estresse, respeitando os ciclos diurnos e noturnos e receberam alimentação padrão tipo Labina® e água mineral *ad libitum*. Os experimentos com os animais foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco sob o processo 0005/2016.

4.5 DEFINIÇÃO DE TERMOS

	Definição teórica	Definição operacional
Plantas medicinais		
	Todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi sintéticos.	Plantas utilizadas com fins profiláticos e terapêuticos.
Retalho Cutâneo		
	Área de pele segmentar e móvel com vascularização baseada em pedículo fixo	Tecido utilizado para síntese de tecidos vizinhos ou à distância
Isquemia tissular		
	Área de tecido que sofre com o processo de má vascularização local, recebendo aporte de O ₂ diminuído.	Tecido isquêmico pode evoluir para necrose tecidual, caso o processo de isquemia não seja revertido.
Necrose tecidual		
	Processo de morte celular estabelecido e tecido inviável. Ocorre geralmente após certo período de isquemia não revertida	Área cutânea delimitada por tecido enegrecido, sem sangramento

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

4.6 ETAPAS E MÉTODOS DE COLETA E PREPARO DO MATERIAL DA PESQUISA

4.6.1 Coleta do material vegetal

As folhas da *R. mangle* foram coletadas no manguezal da cidade de Itamaracá (Figura 4), distrito de Vila Velha, no estado de Pernambuco, com 7 ° 40 'de latitude sul e 34 ° 50' longitude oeste, sendo selecionadas folhas verdes, com aparência vistosa, visualmente intactas, livre de danos mecânicos, pragas, doenças ou cor alterada (Figura 5). Uma exsicata foi identificada pela bióloga Marlene Barbosa e encontra-se no Herbário da UFPE sob número UFP. 69.655. A coleta foi autorizada pela Companhia Pernambucana de Controle de Poluição Ambiental e Administração de Recursos Hídricos sob autorização CA DFRB N. 120/2014 (Anexo A).

Figura 4 - Área de mangue no distrito de Vila Velha, em Itamaracá-PE. *Rhizophora mangle* encontrada às margens do rio



Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

Figura 5 - Detalhes da folha e fruto da *R. mangle*



Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

4.6.2 Obtenção do extrato aquoso de folhas de *R. Mangle*

O extrato aquoso foi preparado por infusão a partir de 2 Kg de folhas frescas de *R. mangle*. O material foi pesado, triturado e extraído com água à 40° C por 30 minutos e o resíduo sólido removido por filtração, inicialmente utilizando uma micro peneira e após um filtro de papel para micro resíduos, e a água por liofilização (MCDLOUD et al., 1988). O rendimento da infusão foi calculado em termos de material vegetal recém coletado. Foram coletados 3,5 quilos de folhas frescas e, após todo processo de extração e liofilização, foram obtidos 245 gramas do extrato em pó. O rendimento total foi de 7 por cento.

4.6.3 Diluição do pó da *R. mangle* e escolha da dose

O extrato em pó foi armazenado em temperatura ambiente. A diluição padrão adotada foi de 13,6mg do pó para 3mL, ou seja, concentração igual a 4,5g/L, ou 0,45%. Esta concentração foi escolhida para que a mesma quantidade do pó da *R. mangle* fosse utilizada nos grupos B (extrato aquoso da *R. mangle*) e C (filme da RmBg). Foram impregnados, no máximo, 13,6mg do pó sem saturar em cada filme RmBg. Portanto, optou-se por utilizar 13,6mg em uma solução de 3mL para cada animal e distribuir 1mL em cada porção do retalho (proximal, média e caudal).

4.6.4 Análise dos componentes do extrato da *R. mangle*

A cromatografia foi realizada com um cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC). Acquity H-Class (Waters) acoplado a um espectrômetro de massa single quadrupolo SQ Detector 2 (Waters), controlado pelo software MassLynx™ (Waters). Foi empregada uma coluna BEH 2,1 x 100 mm e tamanho de partícula de 1,7µm. A fase móvel utilizada foi composta de solução aquosa contendo 2% de MeOH, 5 mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e solução metanólica contendo 0,1% de ácido fórmico (eluente B). A eluição foi realizada em modo gradiente com vazão de 0,3 mL/min: 2% B, 0,25 minutos. A proporção de B foi aumentando linearmente para 99% em 8,5 minutos, se mantendo em 99% de B por um minuto. Após final da corrida, a coluna foi equilibrada nas condições iniciais por 1,25 minutos. Dez microlitros de amostra foram injetados. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o auto injetor a 10 °C. As condições do espectrômetro de massa foram: voltagem do capilar 3,5 Kv, a voltagem do cone 30 V; temperatura de dessolvatação 450 °C, fluxo de gás da fonte de 650 L/h. A aquisição dos dados foi feita em modo fullscan, buscando massas entre 100 e 1000 Da, em ionização negativa. A aquisição dos cromatogramas e espectros de massas foi feita através do software MassLynx™ (Waters). A concentração das substâncias do composto foi avaliada a partir da quantificação da área que as mesmas imprimiam no exame, quanto maior a área, maior a concentração da substância. Os componentes foram identificados a partir da comparação de padrões previamente estabelecidos.

4.6.5 Cultivo do Kefir

A cultura de kefir foi proveniente do laboratório de biofísica química do departamento de radiobiologia e biofísica da UFPE. Os grãos de Kefir (Figura 6 A e B) foram mantidos em 50 mL de solução de açúcar mascavo (50 g/L para cada 5g de grãos de kefir) à temperatura ambiente (25°C + 30°C). O repique da cultura de kefir foi realizado a cada 48h. Após o cultivo, 350g de grãos de kefir foram clareados através de lavagens (12 a 15 vezes com água destilada). As impurezas provenientes do açúcar mascavo foram retiradas manualmente com ajuda de uma pinça e descartadas. Depois de cultivada toda a quantidade de grãos de kefir necessários para realização de todos os testes, os mesmos foram congelados, e uma parte deles foi clareado. Durante o clareamento o kefir foi lavado manualmente com o auxílio de uma pinça, a fim de remover as impurezas. Esse processo foi realizado até 15 vezes.

Figura 6 - Grãos de kefir

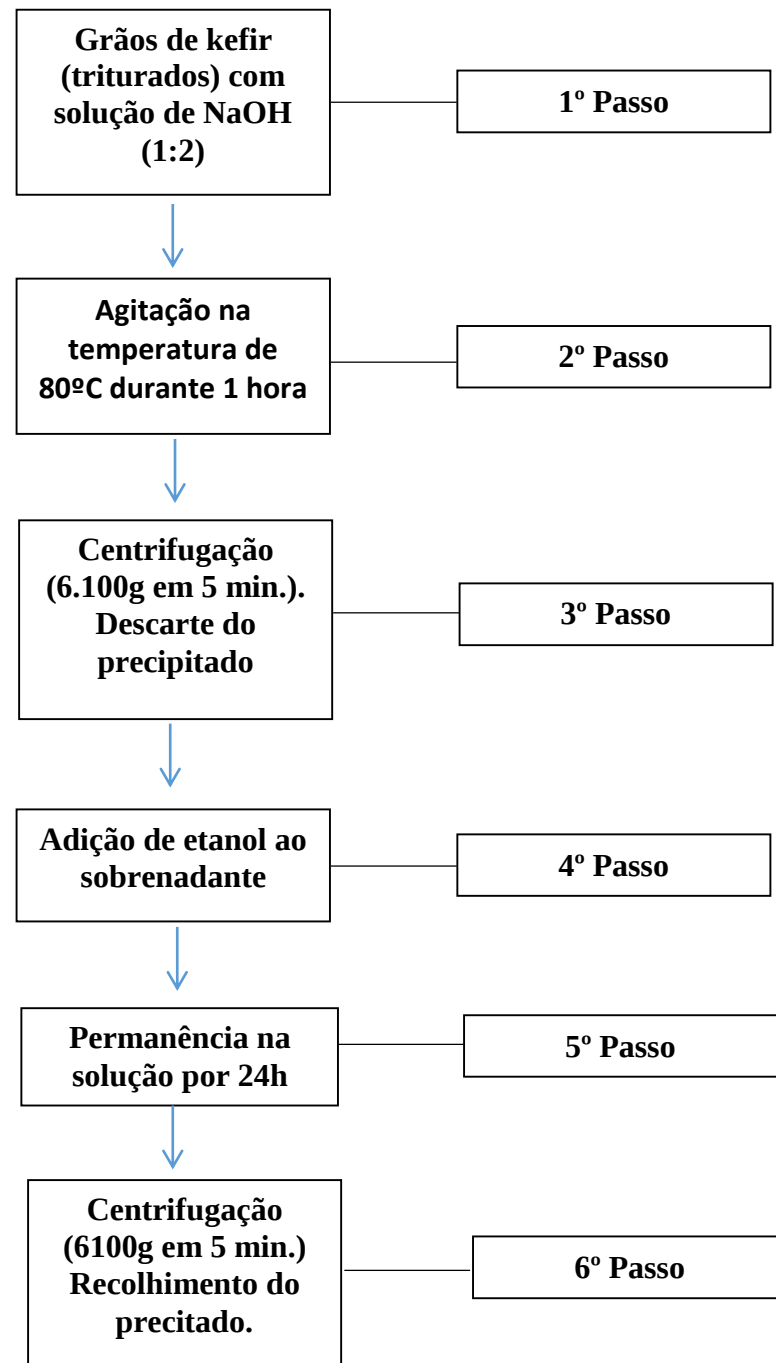


Legenda: A: Grãos de kefir antes do clareamento; B: Grãos de kefir depois do clareamento.
Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

4.6.6 Extração e purificação do exopolissacarídeo do kefir

A extração do exopolissacarídeo foi realizada segundo modificações do protocolo descrito por Picasso (2017). Após o clareamento, os grãos foram triturados e acrescentou-se água tipo I (MliQ) até ficar numa consistência gelatinosa. Em seguida, os grãos triturados foram adicionados a um béquer contendo uma solução de NaOH (1,0 M) na proporção de 1:2 (grãos de kefir/NaOH) e a mistura foi mantida sob agitação com temperatura de 80°C por 1 h. Após este processo, a solução foi centrifugada (6.100 x g) por 5 min e as impurezas precipitadas foram descartadas. Em seguida, o sobrenadante foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto frio e posto a 4°C em overnight. A solução foi centrifugada e o precipitado foi reservado. Esse processo foi repetido por mais três vezes com o precipitado. Este mecanismo está representado na Figura 7.

Figura 7 - Mecanismo de extração e purificação do exopolissacarídeo



Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

Esse processo foi repetido por mais três vezes com o precipitado. Em seguida adicionou-se água tipo I (MliQ) após isso foi feito o processo de neutralização com ácido clorídrico (HCl). a 1M e colocou-se a solução em um recipiente plástico no desumificador por 48h, resultando no EPS seco, o qual foi triturado e obtendo-se um pó.

A metodologia de extração utilizada por Picasso (2017) resultou em um EPS estruturalmente novo, desenvolvido no Laboratório de Biofísica Química do Departamento de Radiobiologia e Biofísica da UFPE. Este Biopolímero contém ligações α/β em proporção 9:1; este composto é formado exclusivamente de resíduos de glicose. Neste foi confirmada a presença das unidades de glicose 3-ligadas [$\rightarrow 3$] -p-D-Glucp- (1 $\rightarrow$] e as unidades 3,4,6-substituintes [$\rightarrow 3,4,6$]. - β -D-Glucp- (1 $\rightarrow$]. Este composto é característico de um polissacarídeo β -D-glicêmico composto por 6 unidades, parcialmente ramificado na posição 3 e apresenta unidades terminais não redutoras. Além disso, os resíduos de D-Glucp ligado a 3 ligações e D-Glucp substituído por 3,4,6 são também encontrados como resíduos intermediados nos ramos. Essas características são típicas de homopolissacarídeos e glucanas, confirmados por RMN e HSQC. Apresentando assim um EPS nunca estudado na literatura.

4.6.7 Obtenção do filme de RmBg

Em um Erlenmeyer (125mL) foi pesado 0,59g de polissacarídeo e adicionados 37,66 mL de NaOH (0,2M). Foram colocados no micro-ondas com potência 5 e tempo de 30 segundos até dissolução total. Glicerol (0,225g) foi adicionado e a solução dissolvida e agitada por 1 min para homogeneizar. Logo após, a solução foi neutralizada com HCl (1M) e, ao volume que do Becker, era adicionado o dobro de álcool gelado para precipitar o polissacarídeo. Todo o material foi então centrifugado (a 9000 rpm, 25°C por 5 minutos) descartando o sobrenadante e colocando o precipitado em um Erlenmeyer.

Com o material precipitado foram adicionados 22,5mL de água Mili-Q e a mistura retornava ao micro-ondas com potência 5 e tempo de 30 segundos até dissolução de boa parte da solução. O glicerol (0,0956g) foi adicionado e a solução dissolvida e agitada por 1 min para homogeneizar. A solução foi então colocada na placa de petri e logo após na estufa para secagem a 45°C durante 12h. Após esse processo, o biopolímero de betaglucana em forma de filme foi obtido (Figura 8).

Figura 8 - Biopolímero de betaglucana em filme



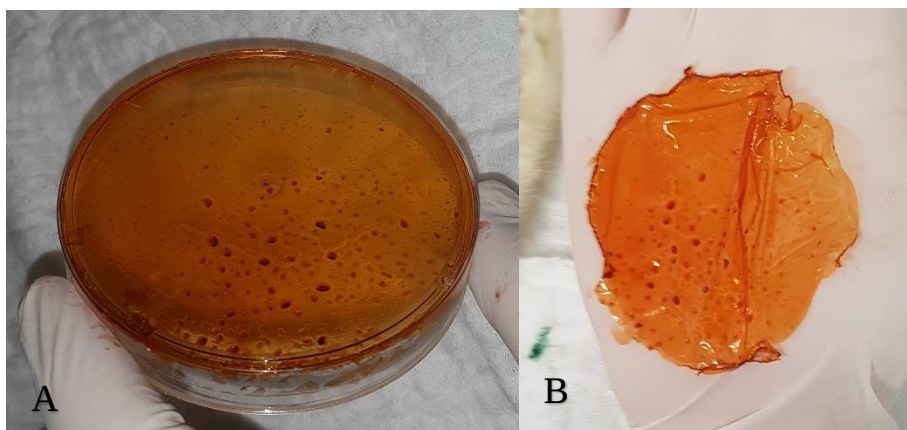
Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

Para a impregnação do extrato da *R. mangle* os procedimentos anteriores foram realizados da mesma maneira, contudo, antes da solução ser colocada na estufa, 0,120g de glicerol foram adicionados e a solução agitada por um minuto até completa homogeneização.

O extrato da *R. mangle* (0,0544g) foi dissolvido em 12 mL de água destilada por 20 min no agitador magnético em temperatura ambiente.

A solução do polissacarídeo foi dissolvida na solução contendo o extrato da *R. mangle* e homogeneizada no agitador magnético sem temperatura por 10min, sendo colocada em placa de Petri durante 12h na estufa de secagem 45°C. (Figura 9 A e B).

Figura 9 - Biopolímero em filme



Legenda:

A: Filme impregnado pelo extrato da *R. mangle* ainda na placa de Petri após a secagem.

B: Filme após ser retirado da placa.

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

4.7 INTERVENÇÃO CIRÚRGICA E COLETA DE DADOS

4.7.1 Procedimento cirúrgico e grupos de pesquisa

Os animais foram previamente pesados e anestesiados com injeção intra peritoneal de solução de ketamina 75mg/Kg e xilazina 5mg/Kg. O plano anestésico para os procedimentos foi avaliado pela frequência respiratória regular e ausência de reflexos a estímulos, para que o procedimento fosse iniciado sem causar dor ao animal.

Após a anestesia, cada rato foi submetido à tricotomia na região dorsal e foi demarcado retalho cutâneo medindo 3 centímetros de base, a partir das proeminências posteriores do quadril do animal, e 9 centímetros de comprimento (Figura 10), modelo bastante utilizado em experimentos para viabilidade de porções distais de retalhos devido à previsibilidade da necrose ocorrida. (MCFARLANE; DEYOUNG; HENRY, 1965). Para a antisepsia do sítio cirúrgico, foi utilizada solução de clorexidina a 2% e, posteriormente, foi realizada incisão sobre a extensão de pele demarcada previamente. A profundidade do plano de dissecção atingiu até a fáscia superficial, conhecida como *panniculus carnosus* (Figura 11) da extremidade do retalho até a sua base. Após a elevação do retalho e hemostasia local, o retalho foi suturado de volta ao leito da ferida com fio de nylon 4-0 (figura 12) e os animais foram acondicionados em gaiolas específicas com água e ração *ad libitum*. Cada animal ficou sozinho em gaiola única para evitar o canibalismo das áreas de necrose dos retalhos por outros animais.

Figura 10 - Retalho de McFarlane demarcado



Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

Figura 11 - Retalho totalmente elevado com plano de dissecção incluindo o *panniculus carnosus* mantendo sua irrigação pela base



Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

Figura 12 - Retalho suturado e fechado



Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

Foi realizada avaliação dos animais diariamente até o 7º dia pós operatório, com a intenção de identificar possíveis complicações como infecção do sítio cirúrgico, deiscência da sutura ou auto flagelo. Após sete dias do procedimento cirúrgico, os animais anestesiados e sacrificados através de doses excessivas de anestésicos.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos de 5 ratos, um grupo controle (Grupo A) no qual foi realizada a intervenção cirúrgica descrita acima utilizando apenas 3mL de soro fisiológico a 0,9% (SF 0,9%) entre o leito da ferida e o retalho, sendo 1mL aplicado na porção proximal, 1 mL aplicado na porção média e 1 mL na porção distal; o grupo B, onde foi aplicado 3mL do extrato aquoso da *R. mangle* entre o leito da ferida e o retalho cutâneo, sendo o volume dividido da mesma maneira nas três porções do leito da ferida; o grupo C, que recebeu o biopolímero de betaglucana impregnado com extrato da *Rhizophora*

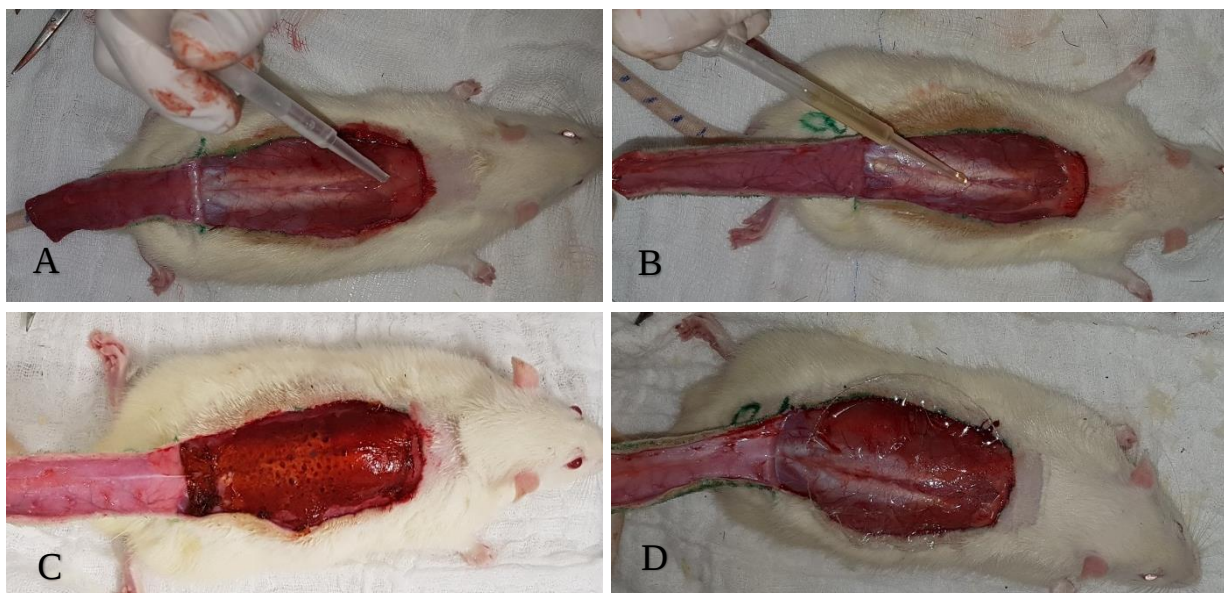
mangle. No grupo D foi aplicado o biopolímero de betaglucana em forma de filme entre o retalho e o leito da ferida (Tabela 3). (Figura 13).

Tabela 3 - Divisão dos grupos de animais do estudo

Grupo A (Grupo controle).	Foi aplicado 3 mL de soro fisiológico 0,9% entre o retalho e o leito da ferida
Grupo B (Extrato <i>R. mangle</i>).	Aplicação de 3 mL do extrato aquoso da <i>R. mangle</i> entre o leito e o retalho.
Grupo C (Biopolímero + Extrato <i>R. mangle</i>).	Aplicação do biopolímero de betaglucana em forma de filme impregnado com o extrato da <i>R. mangle</i> entre o retalho e o leito da ferida (Filme de RmBg).
Grupo D (Biopolímero de Betaglucana).	Aplicação do biopolímero de betaglucana em forma de filme entre o retalho e o leito da ferida

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

Figura 13 - Intervenções realizadas em cada grupo



Legenda: A: Grupo A - Soro fisiológico. B: Grupo B - Extrato aquoso da *R. mangle*. C: Grupo C - Filme de RmBg. D: Grupo D - Filme do biopolímero de betaglucana
 Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

4.7.2 Avaliação clínica e morfométrica das áreas de necrose nos retalhos

No sétimo dia pós-operatório os animais foram anestesiados novamente pela mesma técnica descrita anteriormente, os retalhos foram avaliados macroscopicamente para delimitar a área de necrose da porção distal. A diferença entre tecido viável e tecido necrótico foi feita através da observação macroscópica sendo que o tecido viável possuía cor rósea, textura macia e crescimento de pelos diferindo-se do tecido necrótico que apresentava pele escurecida, rígida, fria e sem pelos. Os animais foram sacrificados com hiperdosagem anestésica após a avaliação clínica.

Foram realizadas fotografias com câmera digital Nikon Collpix 16MP a uma distância de 40cm e com uma régua padrão localizada ao lado do animal, para configuração de padrão de medidas nos programas de computador as fotos foram analisadas e as áreas foram mensuradas (Figura 14). As imagens foram analisadas em programa de computador AdobePhotoshop®, para delimitação digital da área previamente demarcada e, após essa etapa, a área necrótica e sua porcentagem em relação à área total do retalho eram calculadas no programa ImageJ®.

Figura 14 - Demarcação da área de necrose a partir da análise macroscópica

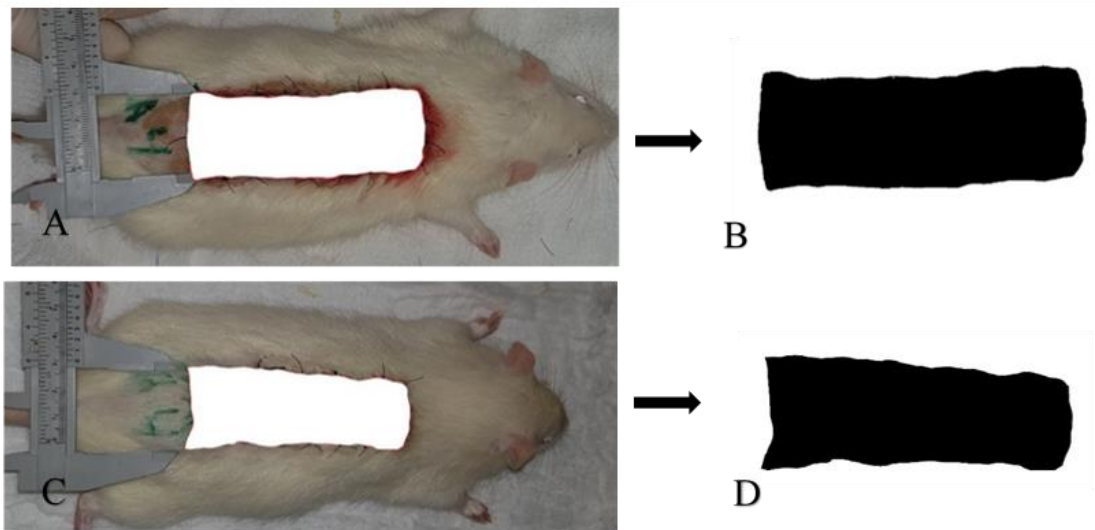


Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

4.7.3 Avaliação da retração da área dos retalhos cutâneos

A retração da área foi mensurada a partir da comparação das áreas totais medidas imediatamente após a confecção do retalho e após 7 dias. As imagens também foram analisadas no Adobe Photoshop® para delimitação digital e a área calculada no programa ImageJ® (Figura 15).

Figura 15 - Áreas de retração do retalho cutâneo



Legenda: Animal fotografado imediatamente após a confecção do retalho cutâneo (A) com a área total do retalho em destaque (B) e após 7 dias (C), com a área final em destaque (D). Neste exemplo a retração pós-operatória foi de 19% da área total.

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

4.7.4 Análise histomorfométrica das amostras

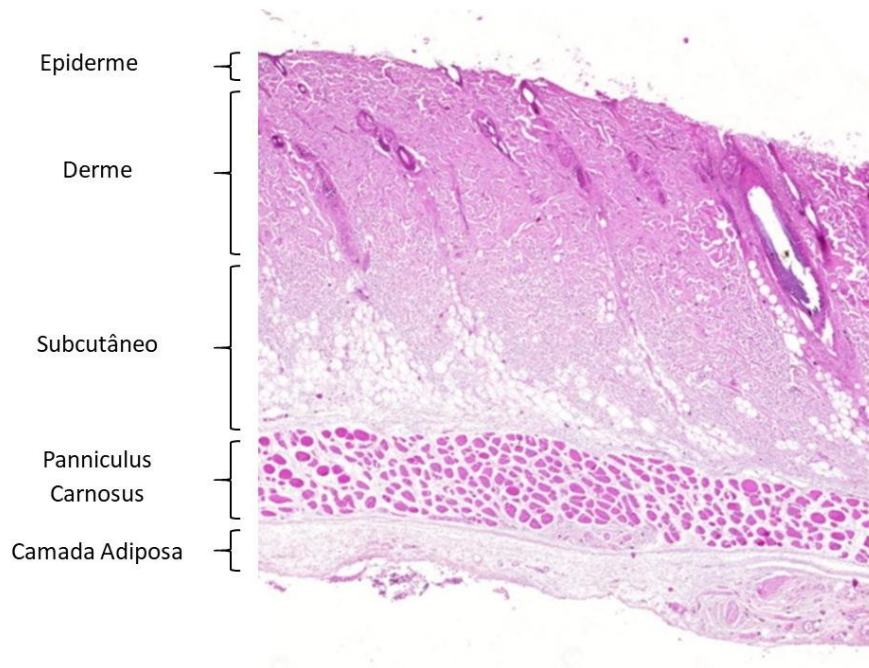
Após sacrifício dos animais, foi realizada ressecção de segmento de 1cm² da região de transição entre a área viável e de necrose para realização de análise histomorfométrica. As amostras foram colocadas em solução tamponada de formaldeído a 10% para fixação. Na sequência, passaram por desidratação em soluções crescentes de álcool etílico a 70%, 90% e 100%. As peças foram mantidas imersas por uma hora nas soluções. Após os banhos de desidratação, foi iniciada a diafanização das peças em solução de álcool/xilol (1:1) por uma hora e, a seguir, em dois banhos de xilol puro.

Em seguida, as peças foram incluídas em parafina e cortadas com espessura padronizada de 5µm, por meio de um micrótomo rotativo, Spencer – 820 do Departamento de Histologia da Universidade Federal de Pernambuco. Os Cortes Foram montados em lâminas histológicas e corados com hematoxilina e eosina (HE).

As secções histológicas foram microfotografadas em *scanner* de lâmina *Pannoramic Midi* (3DHISTECH) no departamento de odontologia da UFPE. A análise das lâminas foi realizada através do *software Pannoramic Viewer* versão 1.15.4 ano 2014. Neste software, onde é possível navegar pela lâmina, sob diferentes magnificações, foram realizadas cinco fotografias das amostras de cada animal, sob uma magnificação de 40 vezes. Todas as fotografias foram realizadas na porção imediatamente inferior ao *panniculus carnosus*, já que o extrato e os filmes

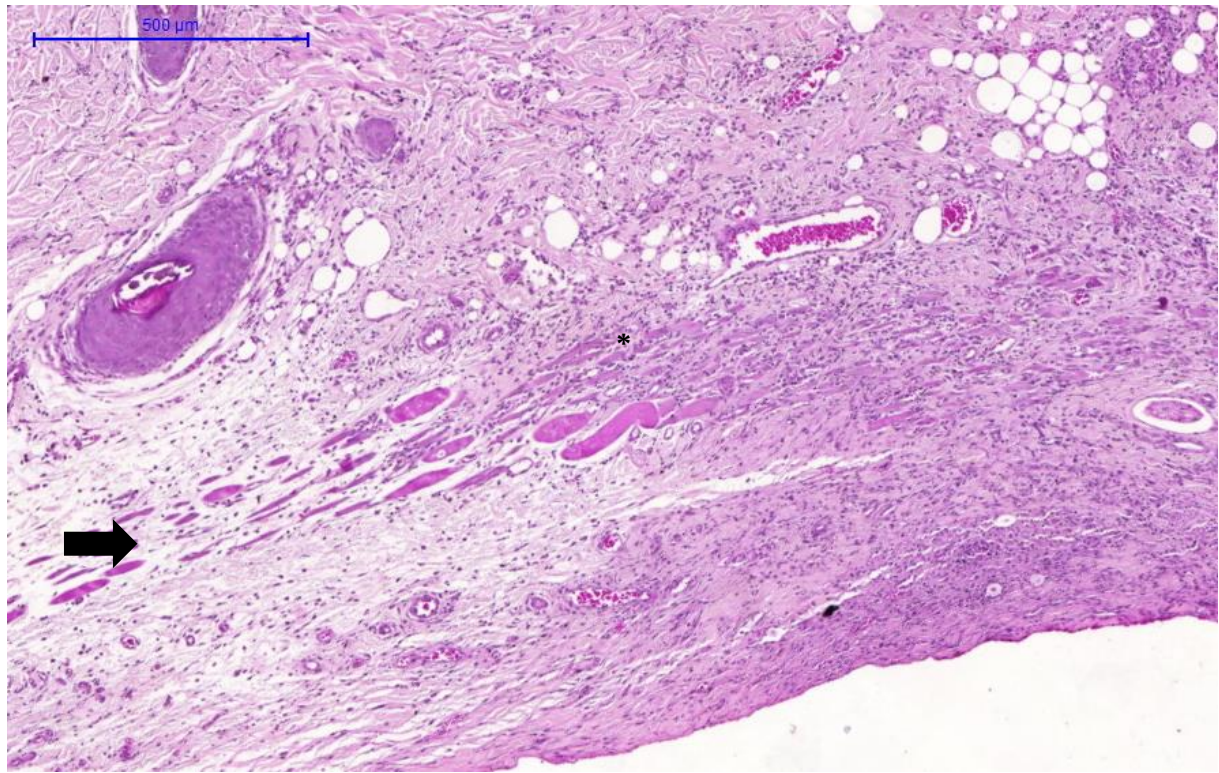
de biopolímeros foram aplicados nesta região, portanto acreditamos que seria o local mais apropriado a ser avaliado (Figura 16). A área de transição entre o tecido saudável e a necrose era identificada e as fotografias eram realizadas imediatamente antes do tecido necrótico (Figura 17). Em cada fotografia foram contados os leucócitos, vasos sanguíneos e fibroblastos, onde o avaliador foi cegado e não sabia a qual animal pertencia a lâmina analisada.

Figura 16 - Camadas histológicas da pele do rato onde observa-se o *panniculus carnosus* que foi incluído nos retalhos



Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

Figura 17 - Transição histológica entre o tecido viável e a área de necrose



Legenda: Nota-se que do lado esquerdo a seta preta aponta para o *panniculus carnosus* preservado, com as fibras musculares bem delimitadas. A partir do asterisco para a direita, onde tem início a área de necrose, observa-se intenso infiltrado de células inflamatórias com degradação e necrose da musculatura.

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

4.8 MÉTODOS ESTATÍSTICOS PARA ANÁLISE DOS DADOS

A análise descritiva foi realizada a partir da expressão de probabilidade com média e desvio padrão. As amostras foram avaliadas para normalidade com o teste de Shapiro-Wilks. Para análise inferencial das comparações foi realizado o teste ANOVA, com Post hoc de Tukey. O nível de significância adotado para o estudo foi de 0,05. Os dados foram analisados no programa de análise estatística SPSS, v21 (SPSS Inc., Chicago, IL).

5 ASPECTOS ÉTICOS

A realização deste estudo foi aprovada pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco com processo de número 0005/2016 (Anexo B). Foram priorizados os cuidados para menor sofrimento dos animais, desde a captação, realização do ato cirúrgico, cuidados pós operatórios, administração dos medicamentos e sacrifício dos mesmos. Não há conflito de interesses na realização deste estudo.

6 RESULTADOS

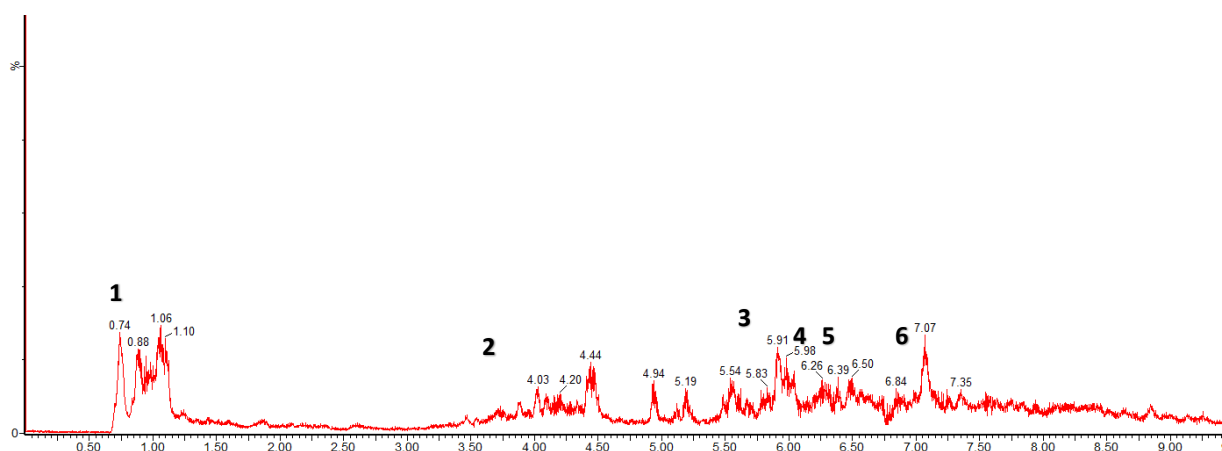
6.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DA *R. MANGLE*

Os principais componentes encontrados no extrato aquoso das folhas da *R. mangle* foram os derivados dos compostos fenólicos, sendo o ácido fenólico p-cumárico com maior concentração, seguido pelo ácido quínico, que é um ciclitol. Os seguintes flavonóides também foram encontrados no extrato: Quercetagenina 3,6,3'- trimetil éter (conhecida como Jaceidina), Quercitina 3-O-glucosídeo, e Pelargonina. Outro componente encontrado foi o benzaldeído 2,5-Dihidroxibenzaldeído, também conhecido como gentisalaldeído. (Tabela 4). (Figura 18).

Tabela 4 - Principais compostos do extrato aquoso da *R. mangle*

	COMPOSTOS	TEMPO DE RETENÇÃO	ÁREA	FÓRMULA	MASSA	[M-H]-
1	Ácido quínico	1.06	178528.375	C7H12O6	192.063	191.055
2	Quercetagenina 3,6,3'- trimetil éter	4.02	125865.500	C18H16O8	360.318	359.076
3	Ácido p-cumarico	5.98	192720.188	C9H8O3	164.047	163.039
4	Quercetina 3-O-glucosídeo	6.40	92864.352	C21H19O12	463.087	462.079
5	2,5- Dihidroxibenzaldeído	6.61	73597.203	C7H6O3	138.031	137.023
6	Pelargonina	7.21	122490.039	C27H31O15	595.166	594.158

Figura 18 - Cromatograma do extrato aquoso da *R. mangle*.



Legenda: 1 - Ácido quínico; 2 - Quercetagenina 3,6,3'- trimetil éter; 3 - Ácido p-cumarico; 4 - Quercetina 3-O-glucosídeo; 5 - 2,5- Dihidroxibenzaldeído; 6 - Pelargonina.

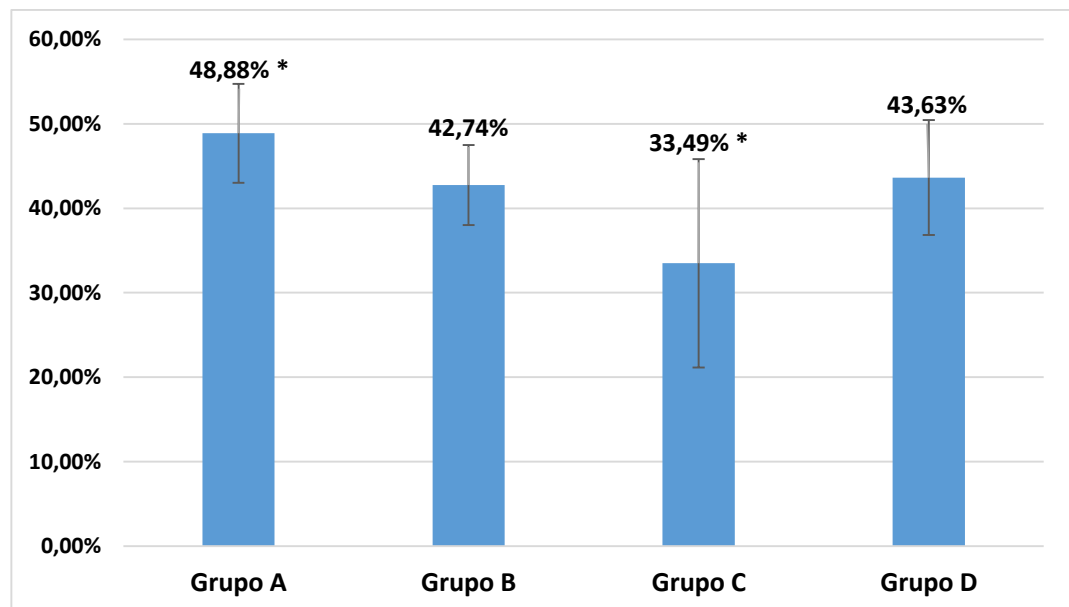
Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

6.2 ANÁLISE CLÍNICA E MORFOMETRIA DA ÁREA DE NECROSE

Durante os experimentos nenhum animal morreu, o processo de cicatrização ocorreu normalmente nos retalhos. Não foram observadas infecções nem eventos adversos relacionados a toxicidade, como inflamação ou celulite peri cicatricial.

A área média de necrose apresentada no grupo A (SF 0,9%). foi 48,88% (DP± 5,85%), no grupo B (Extrato da *R. mangle*). foi 42,74% (DP± 4,74%), o Grupo C (Filme da RmBg). foi 33,49% (DP± 12,33%). e o grupo D (Biopolímero de betaglucana). foi 43,63% (DP± 6,81%). ($p < 0,05$). (Figura 19). (Figura 20). Quando comparada ao grupo A pelo teste Anova, o grupo C apresentou redução da área de necrose estatisticamente significativa.

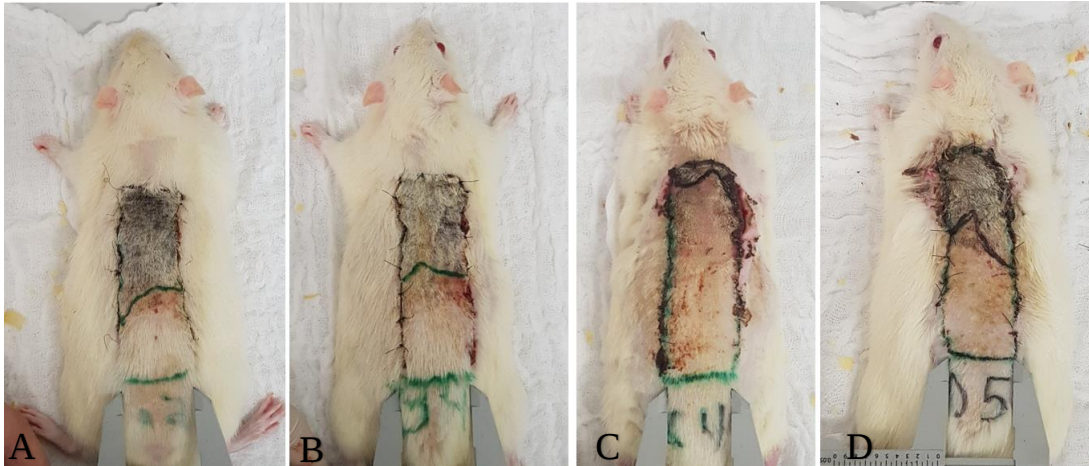
Figura 19 - Área de necrose relativa por grupos



Legenda: Grupo A - Soro fisiológico. Grupo B - Extrato aquoso da *R. mangle*. Grupo C - Filme de RmBg. Grupo D - Filme do biopolímero de betaglucana. * = $p < 0,05$

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

Figura 20 - Exemplar de cada grupo demonstrando as áreas de necrose



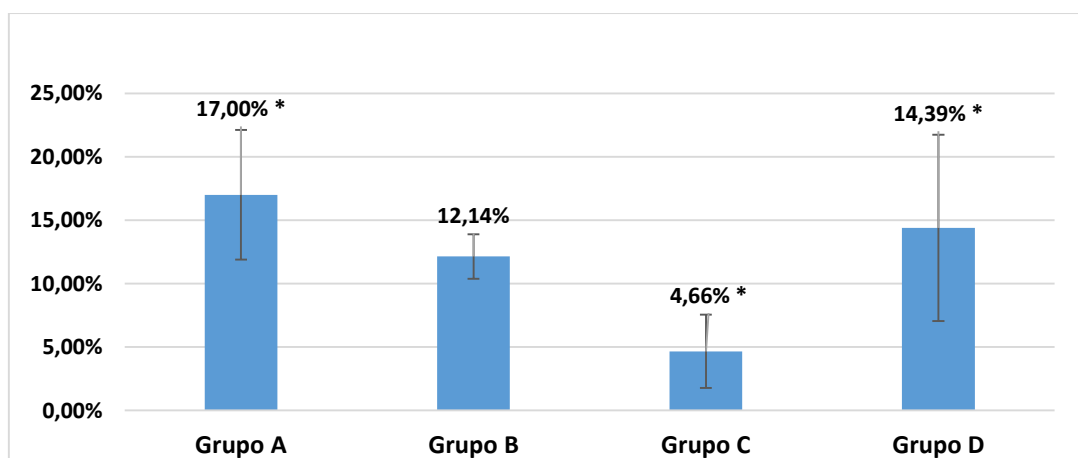
Legenda: Um exemplar de cada grupo. A: Grupo A - Soro fisiológico. B: Grupo B - Extrato aquoso da *R. mangle*. C: Grupo C - Filme de RmBg. D: Grupo D - Filme do biopolímero de betaglucana.

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

6.3 RETRAÇÃO CICATRICIAL

A retração cicatricial no grupo A (SF 0,9%). foi de 17% ($DP \pm 5,11\%$), no grupo B (extrato da *R. mangle*). foi de 12,1% ($DP \pm 1,76\%$), o Grupo C (filme de RmBg). foi 4,66% ($DP \pm 2,89\%$). e o grupo D (Biopolímero de betaglucana). foi 14,4% ($DP \pm 7,34\%$). ($p < 0,05$). (Figura 21). Pelo teste Anova, comparando os grupos entre si, observou-se redução significativa na área de retração entre os grupos A e C e entre C e D.

Figura 21 - Retração da área do retalho



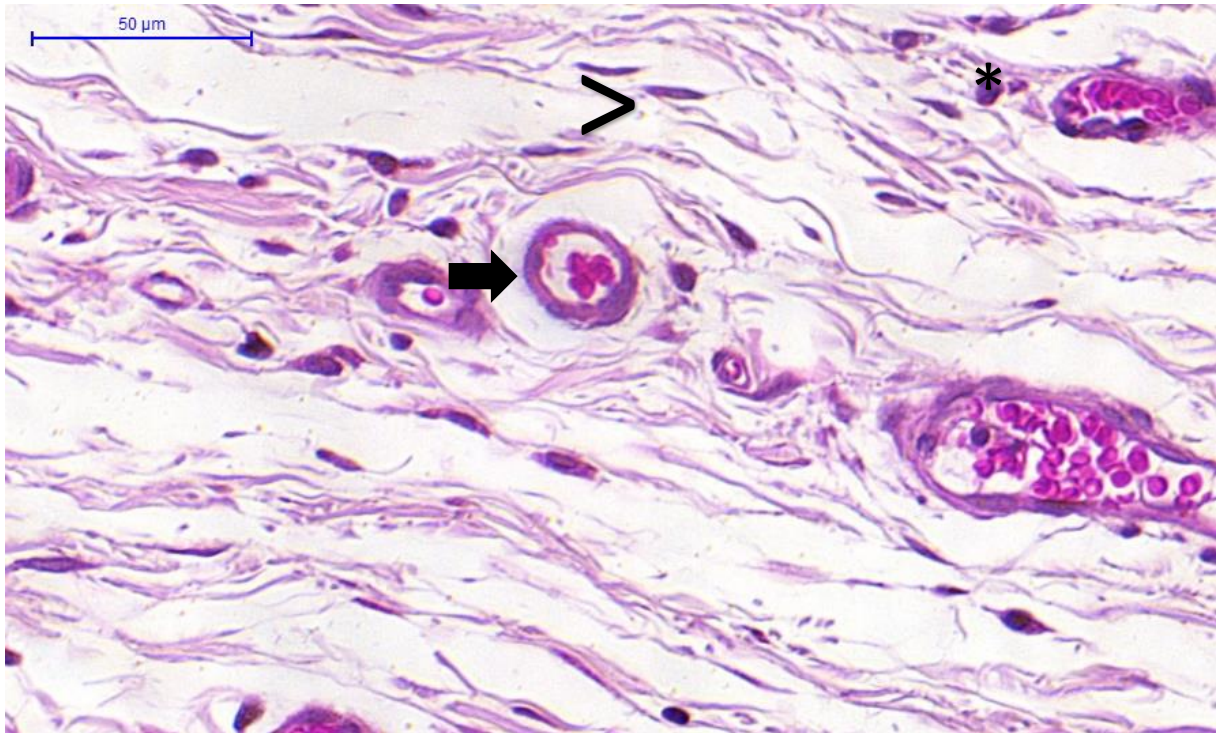
Legenda: Grupo A - Soro fisiológico. Grupo B - Extrato aquoso da *R. mangle*. Grupo C - Filme de RmBg. Grupo D - Filme do biopolímero de betaglucana. * = $p < 0,05$

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

6.4 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Foram quantificados três elementos: os fibroblastos, leucócitos e vasos sanguíneos; e realizada média entre a contagem das cinco lâminas de cada animal no aumento de 40x. (Figura 22).

Figura 22 - Amostra de uma preparação de tecido conjuntivo em hematoxilina-eosina

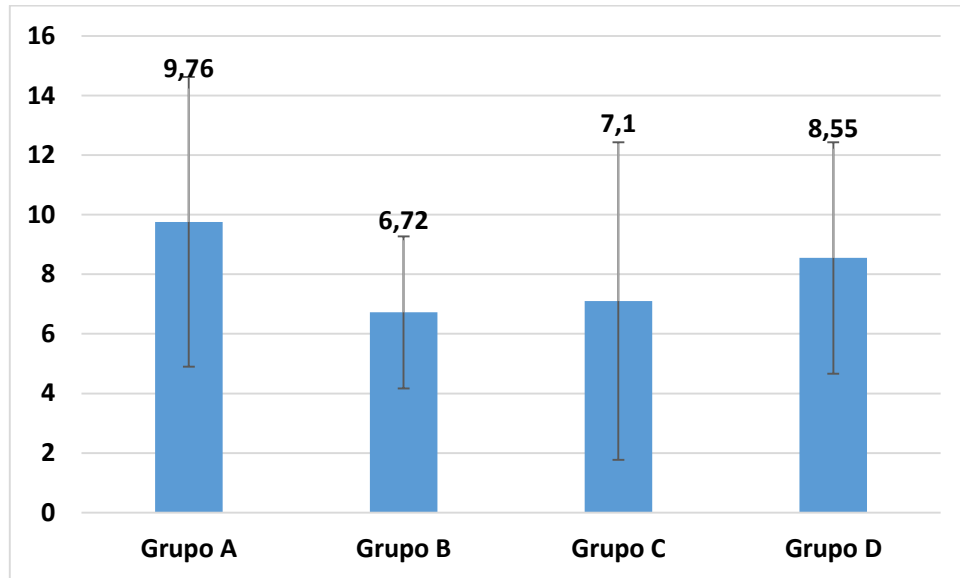


Legenda: A seta demonstra um vaso sanguíneo, a ponta de seta indica um fibroblasto e o asterisco encontra-se logo acima de um leucócito.

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

Não foi observada diferença significativa entre a quantidade de fibroblastos entre os grupos. O grupo A apresentou uma média de 9,76 ($DP \pm 4,8$), o grupo B foi de 6,72 ($DP \pm 2,55$), enquanto os grupos C e D foram de 7,1 ($DP \pm 5,33$) e 8,5 ($DP \pm 3,88$), respectivamente (Figura 23).

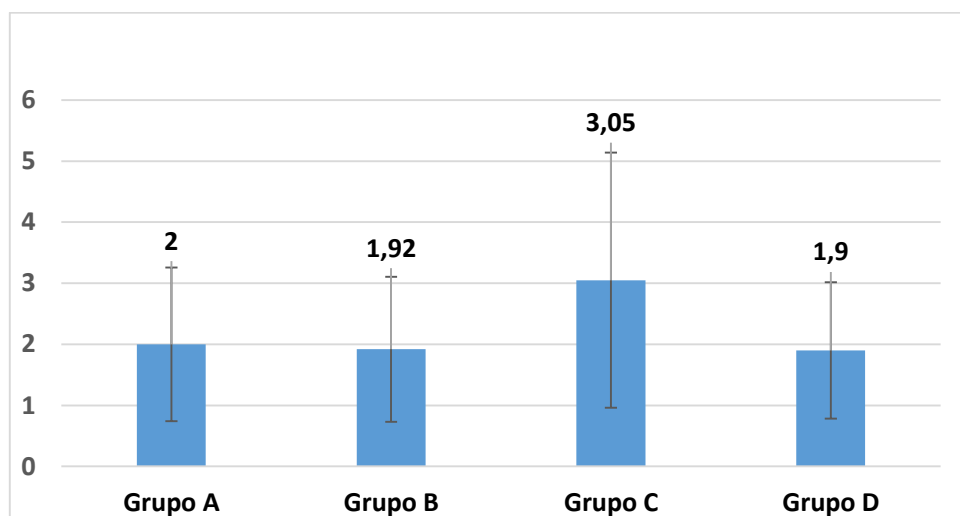
Figura 23 - Número de fibroblastos presentes na área de transição dos retalhos em cada grupo



Legenda: Grupo A - Soro fisiológico. Grupo B - Extrato aquoso da *R. mangle*. Grupo C - Filme de RmBg. Grupo D - Filme do biopolímero de betaglucana.
 Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

A média de leucócitos encontrados na área de transição entre as áreas viáveis e necróticas dos retalhos do grupo A foi de 2 ($DP \pm 1,25$) no grupo B foi 1,92 ($DP \pm 1,18$) no grupo C foi 3,05 ($DP \pm 2,08$) e no grupo D 1,9 ($DP \pm 1,11$). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Figura 24).

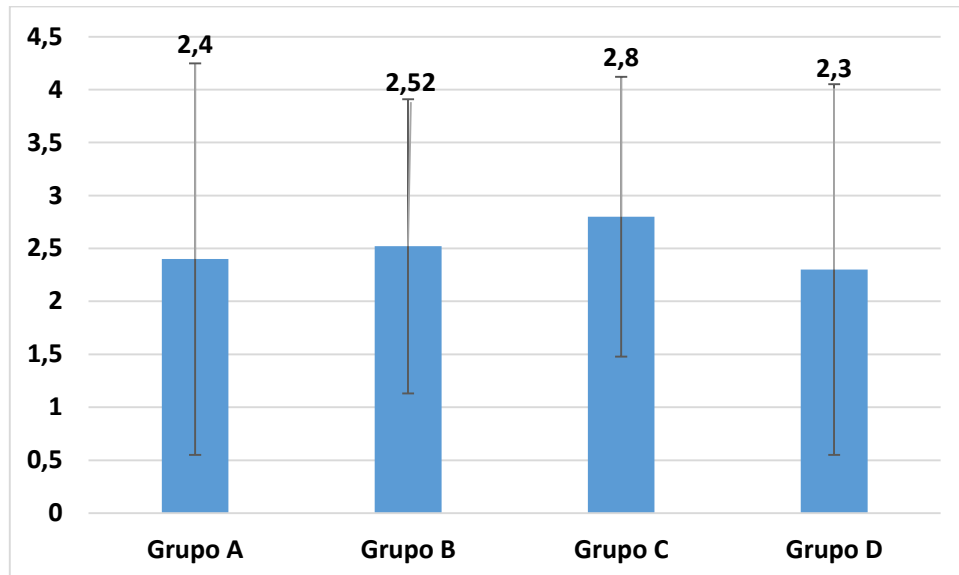
Figura 24 - Número de leucócitos presentes na área de transição dos retalhos em cada grupo



Legenda: Grupo A - Soro fisiológico. Grupo B - Extrato aquoso da *R. mangle*. Grupo C - Filme de RmBg. Grupo D - Filme do biopolímero de betaglucana.
 Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

A contagem de vasos sanguíneos também não evidenciou diferença significativa entre os grupos, no grupo A a média foi de 2,4 (DP $\pm$ 1,84), no grupo B foi de 2,52 (DP $\pm$ 1,38), no grupo C foi de 2,8 (DP $\pm$ 1,32) e no grupo D foi de 2,3 (DP $\pm$ 1,75) (Figura 25).

Figura 25 - Número de vasos sanguíneos presentes na área de transição dos retalhos em cada grupo



Legenda: Grupo A - Soro fisiológico. Grupo B - Extrato aquoso da *R. mangle*. Grupo C - Filme de RmBg. Grupo D - Filme do biopolímero de betaglucana.

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

6.5 DESCRIÇÃO DE EVENTOS ADVERSOS

Em um dos animais do grupo de tratamento com o extrato da *R. mangle* associado ao biopolímero de betaglucana (grupo C), foi observado um padrão totalmente atípico para necrose em retalhos isquêmicos. A necrose neste caso aconteceu no terço proximal do retalho, poupando toda a porção distal, que manteve a textura e características normais (Figura 26).

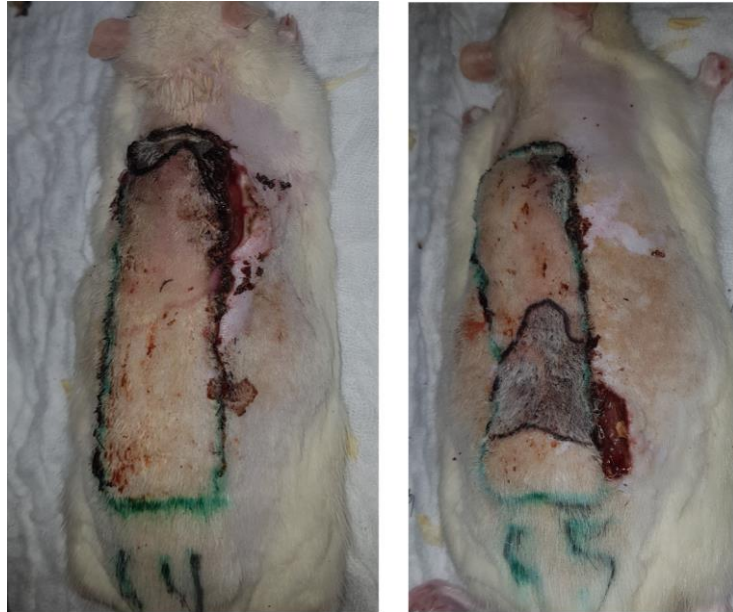
Figura 26 - Animal do Grupo C (filme de RmBg) apresentando necrose atípica em terço proximal do retalho com a porção distal preservada



Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

Observou-se em dois animais do grupo C, que receberam o filme da RmBg, áreas de deiscência na ferida operatória. As áreas de deiscência encontravam-se mais úmidas, porém não havia secreção compatível com pus ou tecido com esfacelos decorrentes de processo infeccioso ou de necrose (Figura 27).

Figura 27 - Deiscência da ferida operatória apresentada em dois animais do grupo C sem sinais de infecção



Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

Além disso, foi observada a formação de uma substância espessada, um pouco gelatinosa e bem aderida tanto ao leito da ferida quanto ao retalho cutâneo. A adesão era importante, pois não era facilmente retirada dos locais, apenas após fricção considerável (Figura 28). O processo de degradação do biopolímero gerou esse composto nos grupos C e D, que receberam o biopolímero impregnado ao extrato ou somente o biopolímero. Também não foram observados indícios de sinais infecciosos justapostos ao composto resultante de degradação do biopolímero.

Figura 28 - Composto aderente ao leito da ferida e o retalho formado pela degradação do biopolímero.



Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

7 DISCUSSÃO

7.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO DA *R. MANGLE*

Os compostos fenólicos foram as substâncias mais abundantes encontradas no nosso extrato. O ácido fenólico p-cumárico foi o componente com maior concentração no extrato da *R. mangle*. É um composto fenólico do grupo dos ácidos hidroxinâmicos e estão presentes em vários alimentos e bebidas de origem vegetal como café, erva mate, maçã, ameixa e outras frutas e cereais. (LAFAY; GIL-IZQUIERDO, 2008). Estudos prévios demonstraram o efeito anti-oxidante e antibacteriano deste ácido (BOZ, 2015; SHAHEEN, 2011).

A quercetina é um flavonóide presente no extrato, que atua protegendo contra a peroxidação lipídica e interrompendo a reação em cadeia de formação de RL (NICOLE COTELLE, 2001). Este composto interage com ampla variedade de sistemas biológicos em mamíferos, apresentando atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antimitótica e com efeitos anticarcinogênicos e antiproliferativos (HAVSTEEN, 2002; PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001). No nosso estudo foi encontrado um derivado glicosídeo da quercitina, que foi a quercitina 3-O glicosídeo. Safwat et al (2018) encontraram atividade antibacteriana deste componente contra espécies de micobactérias em experimentos *in vitro*.

A quercitagenina 3,6,3'- trimetil éter, ou jaceidina, é outro flavonóide encontrado em algumas espécies de plantas, apresentou um fraco efeito anti agregante plaquetário quando estudado em comparação aos outros flavonoides que compõe a espécie *Varthemia spp.* (AFIFI; ABURJAI, 2004). O efeito anti agregante é interessante na viabilidade de retalhos, pois pode impedir a formação de microtrombos nos vasos distais do retalho.

O ácido quínico, um ciclitol que compõe a estrutura complexa dos taninos hidrolisáveis, apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidante em humanos, a partir da sua propriedade catabolizadora da conversão da nicotinamida e do triptofano no trato gastro intestinal (PERO; LUND; LEANDERSON, 2009). Também foram relatadas atividade anti neuro inflamatória, (LEE, S. Y. et al., 2013). anti diabética (ARYA et al., 2014). e radioprotetiva. (CINKILIC et al., 2013). O ácido quínico demonstrou atividade anti inflamatória em artérias coronarianas, atuando na diminuição da produção de TNF- α nas células do músculo liso das artérias, além de reduzir a adesão de monócitos na parede dos vasos. (JANG et al., 2017).

A pelargonina, uma antocianina da classe dos flavonoides, apresentou efeito supressor em respostas alérgicas adquiridas, reduzindo o número das células produtoras de IgE no plasma sanguíneo e dos receptores de IgE nos mastócitos. (KARASAWA; OTANI, 2012).

O gentisalaldeído (2,5 Dihidroxibenzaldeído), tem atividade bactericida contra *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria* e *Salmonelas* entéricas. (FRIEDMAN; HENIKA; MANDRELL, 2003). Também age como sensibilizador de agentes anti fúngicos (NOWOTARSKA et al., 2014) e como anti oxidante. (PALMA et al., 2014).

A composição do nosso extrato, rico em compostos fenólicos é compatível com extratos da *R. mangle* previamente analisados em estudos de outros países. (SÁNCHEZ et al., 1998). (KANDIL et al., 2004).

A associação principalmente dos efeitos anti-inflamatório, antioxidante e antiagregante das várias substâncias encontradas no composto, podem ter influenciado de maneira positiva na diminuição da necrose nas porções distais do grupo tratado com o filme da RmBg.

7.2 ÁREA DE NECROSE

Na prática clínica, o cirurgião plástico dispõe de poucas alternativas para evitar a necrose em porções distais de retalhos isquêmicos, na maioria dos casos apenas espera-se a delimitação do processo isquêmico para posterior desbridamento da área necrótica. Devido a isto que a busca por novas substâncias para melhorar a viabilidade em retalhos isquêmicos continua sendo tema recorrente na literatura e inúmeras substâncias já foram testadas para este fim.

Neste estudo foi observada menor área de necrose com a utilização do extrato da *R. mangle* associado ao biopolímero de betaglucana, com redução em média de 30% da área de necrose em relação ao total de necrose observado no grupo controle. A utilização isolada do extrato aquoso da *R. mangle* ou do biopolímero de betaglucana apenas, não resultaram em diminuição significativa da área de necrose em relação ao grupo controle.

Este fato ressalta a importância da associação entre a *R. mangle* e o biopolímero de betaglucana em forma de filme, pois a liberação lenta dos compostos fenólicos presentes na *R. mangle* promovida pela degradação lenta do biopolímero, pode ter mantido os benefícios dos princípios ativos anti-inflamatórios e antioxidantes por um período de tempo maior. Tendo em vista que a utilização do biopolímero apenas, sem o extrato impregnado, não promoveu a mesma melhora na viabilidade.

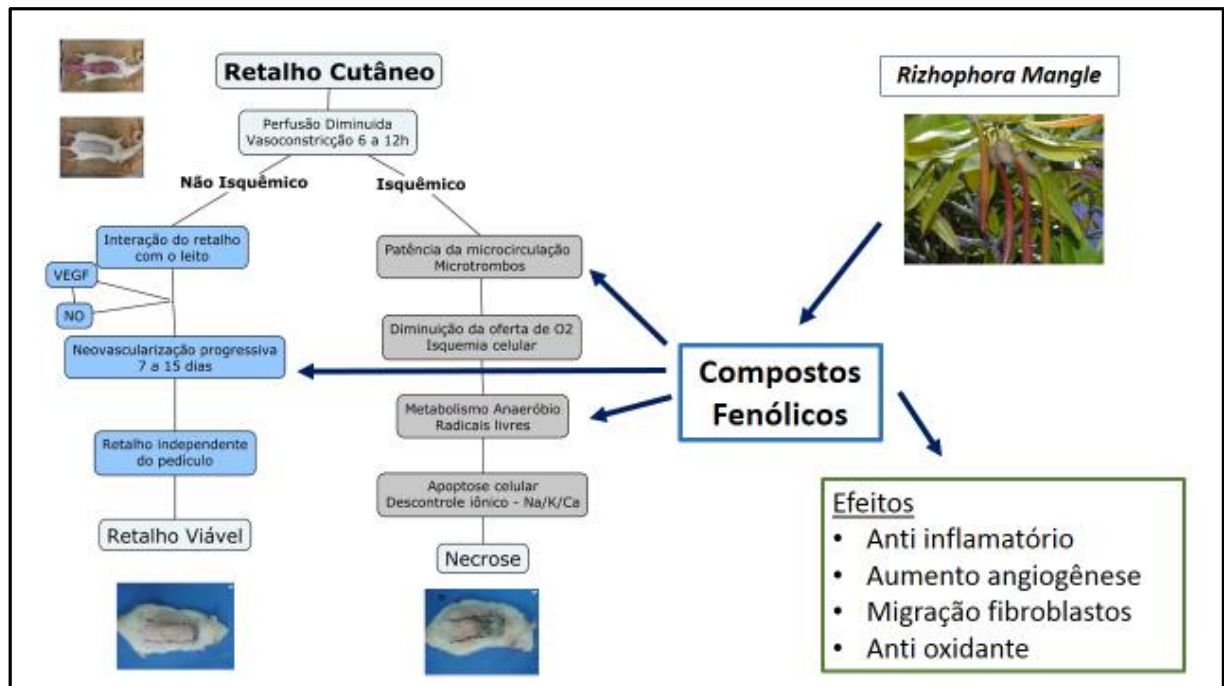
Estudos de avaliação da viabilidade de retalhos cutâneos com extratos de *R. mangle* não foram encontrados na literatura, o que dificulta a comparação com outros trabalhos. Porém, estudos com compostos secundários presentes na planta sugerem efeito benéfico similar ao obtido neste estudo.

A presença de compostos fenólicos no extrato da *R. mangle* pode justificar a maior viabilidade dos retalhos obtida no grupo do filme de RmBg. Ensem et al. (2005) em estudo prévio, utilizaram o extrato da *Hippophae rhamnoides L.* que também é rico em compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, houve redução da área de necrose em retalhos cutâneos isquêmicos em ratos.

Dentre os compostos fenólicos presentes no extrato da *R. mangle*, os taninos estão presentes em significativa concentração e também podem contribuir com efeito anti oxidante para diminuir a necrose em retalhos (SÁNCHEZ et al., 1998). Karaaslan et al. (2010) utilizaram um extrato de protocianidinas derivados de sementes de maçã na alimentação de ratos, nos quais foram confeccionados retalhos abdominais para estudar os efeitos deletérios oxidantes da reperfusão após isquemia. Foi observada redução na área de necrose no grupo que recebeu alimentação rica em taninos, assim como menor infiltrado inflamatório e maior neovascularização neste grupo.

Desta maneira, é possível criar um modelo teórico para justificar a melhora da viabilidade dos retalhos que receberam o filme de RmBg (Figura 29). Na figura abaixo pode-se ver a associação dos efeitos antioxidantes, anti-inflamatório e estimulador de angiogênese estudados anteriormente (FERNANDEZ et al., 2002; MARRERO et al., 2006). Portanto, a característica anti-inflamatória do extrato pode ter atuado na microcirculação, diminuindo a formação de microtrombos e preservando o fluxo sanguíneo nas arteríolas mais distais do retalho. O efeito antioxidante pode atenuar a produção de RL e, conseqüentemente, provocar menor dano celular; e também, a promoção de angiogênese, aumentando o influxo de nutrientes para as porções isquêmicas e contribuindo para melhora da viabilidade cutânea.

Figura 29 - Modelo teórico da atuação do filme de RmBg na diminuição da necrose cutânea dos retalhos isquêmicos



Legenda: Esquema ilustra à esquerda a sequência de eventos que ocorrem num retalho cutâneo que persiste em isquemia e outro não isquêmico, até o desfecho final de ser um retalho totalmente viável ou sofrer necrose. À direita estão alguns efeitos já estudados da *R. mangle* devido aos principais compostos identificados nesta planta. As setas indicam o momento em que estes compostos podem influenciar positivamente para melhorar a viabilidade dos retalhos isquêmicos (1- a partir do efeito anti-inflamatório, inibindo a COX-2, diminui a formação de microtrombos, promovendo melhora na patência da microcirculação. 2 – O efeito antioxidante reduz a quantidade de radicais livres e consequentemente menor dano celular provocado por essas substâncias. 3 – Aumento na permeabilidade capilar e migração celular podendo acelerar o processo de neovascularização e interação entre o retalho isquêmico e o leito da ferida.).

Fonte: Jonathan Augusto Vidal de Oliveira (2018).

7.3 RETRAÇÃO DA ÁREA

Foi verificado nos nossos experimentos que o grupo que recebeu o filme da RmBg apresentou o menor índice de contração do retalho comparado ao grupo que recebeu apenas soro fisiológico e ao grupo que recebeu o biopolímero de betaglucana. Como este grupo apresentou menor área de necrose, consequentemente, a contração esperada é menor, pois a região da necrose tende a retrair para acelerar a cicatrização. Contudo, em comparação ao grupo que recebeu o extrato aquoso da *R. mangle*, a diminuição não foi estatisticamente significativa. Este fato sugere que as substâncias presentes no extrato podem estar envolvidas no menor grau de retração nesses grupos, talvez pelo efeito anti-inflamatório apresentado pelo extrato.

Bayramiçli et al. (1998) avaliaram a retração em retalhos isquêmicos em ilha no abdome de ratos no sétimo dia pós operatório. Observaram um índice de retração de 54% na área dos

retalhos. Este índice de retração foi bastante elevado, mesmo comparando-se ao grupo controle do nosso estudo, que obteve o maior grau de retração (17% da área). Contudo, tratam-se de modelos experimentais bem diferentes, retalhos localizados em porções distintas dos ratos, além de diferenças em proporções e formatos.

Toda ferida, retalho, enxerto ou cicatriz operatória apresenta retração e diminuição da área no pós-operatório. Esta retração geralmente não repercute em problemas funcionais, porém, quando um retalho ou enxerto é realizado para cobrir um defeito em uma região delicada e nobre como pálpebra ou nariz, a retração pode causar tração nessas regiões e deformidade no contorno. Na pálpebra pode repercutir em ectrópio e exposição de esclera e no nariz pode causar desvio da ponta nasal (MULLINS et al., 1997).

A contração secundária é maior em enxertos de pele, mas também ocorre em retalhos cutâneos. Estudos prévios já estabeleceram uma relação direta entre a maior viabilidade de retalho ou enxerto com menor grau de contração cicatricial (ARAKI et al., 2014). Este fato é explicado pelo papel crítico exercido pelos fibroblastos dérmicos que regulam a contração, deposição de matriz extracelular e neovascularização cutânea (WANG et al., 2014).

7.4 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

No estudo histomorfométrico das amostras, não foi identificada diferença na contagem média de fibroblastos entre os grupos. Durante a cicatrização de cirurgias de retalhos cutâneos, um aspecto importante depende da aderência entre o retalho, o leito da ferida e a vizinhança. Os fibroblastos são as células mais comumente presentes no tecido conectivo da pele e são as células aderentes que aparentam ter um importante papel na cicatrização de feridas (LU et al., 2000). Os fibroblastos ativados contribuem na formação do tecido de granulação, inicialmente com colágeno tipo III e, posteriormente, vai sendo enriquecido com colágeno tipo I, até que, lentamente ocorre a maturação e remodelamento da matriz extracelular (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Na análise histológica do processo inflamatório, não foi evidenciada diferença significativa entre os grupos na contagem de leucócitos. Apesar da propriedade anti-inflamatória presente no extrato da *R. mangle* relatada em estudos prévios (MARRERO et al., 2006) não foi observado um número menor de leucócitos nos tecidos dos animais tratados com o filme da RmBg ou mesmo com o extrato aquoso. Cetinkale et al (1996) descreveram que o maior número de leucócitos presentes no retalho cutâneo implica também em maior área de necrose. Esta implicação deve-se ao efeito danoso e progressivo sobre o endotélio mediado pela

ação dos leucócitos (SCHEIN; WESTREICH; SHALOM, 2012). Esta relação proporcional entre infiltrado inflamatório e área de necrose não foi constatada em nosso estudo.

A contagem de vasos sanguíneos presentes na transição entre as áreas viáveis e necróticas não demonstrou diferença entre os grupos. A quantificação dos vasos sanguíneos presentes no retalho pode avaliar a angiogênese que ocorre a partir do leito da ferida para o retalho a partir do segundo ou terceiro dias pós operatórios e restaura a vascularização da área isquêmica do retalho (SCHEIN; WESTREICH; SHALOM, 2012). Estudos prévios com o extrato da *R. mangle* demonstraram a propriedade de promoção de angiogênese, (FERNANDEZ et al., 2002; MARRERO et al., 2006; OFORI-KWAKYE; KWAPONG; BAYOR, 2011). assim como os taninos, que estão presentes entre os principais compostos do extrato da *R. mangle*, também exibiram atividade pró angiogênica. (LI et al., 2011).

7.5 ESCOLHA DA VIA

A grande maioria dos estudos sobre viabilidade de retalhos utiliza substâncias administradas sistemicamente, por via enteral (BITTENCOURT et al., 2005), intraperitoneal (BIN et al., 2015; ROCHA et al., 2012). , intravenosa (MUNEUCHI; HOSSAIN; YAMAGUCHI, 2013). e tópica sobre a pele, chamada de trans epidérmica (DAVIS et al., 1999). Na administração sistêmica, os efeitos colaterais podem ser mais evidentes e frequentes, tendo em vista que a substância tem que circular por órgãos que não são alvos para que possa alcançar nível de concentração considerável na pele e subcutâneo, onde efetivamente precisa atingir para promover os efeitos benéficos esperados (GOZU; PODA, 2010; MANCHIO et al., 2009; NEZAMI; TALAB; EMAMI, 2009).

A via de administração trans epidérmica foi escolhida na maior parte dos estudos devido à facilidade de aplicação em forma de pomada, gel ou creme. Contudo, diversas propriedades podem interferir na absorção de fármacos na pele. As características das moléculas do fármaco, (FORTENBACH; MODJTAHEDI; MAIBACH, 2008). as condições biológicas da pele e a composição do veículo usado para a incorporação da substância ativa alteram significativamente a penetração, afetando a biodisponibilidade do fármaco (OTTO; PLESSIS, DU; WIECHERS, 2009; SANNA; PEANA; MORETTI, 2009). Dentre os principais fatores que interferem na penetração e absorção do fármaco através da pele, pode-se destacar: dose, estado da pele, como o comprometimento da função barreira, sítios regionais da pele, idade, hidratação, composição do veículo e características do fármaco.

Neste estudo, foi escolhida a via de administração subcutânea na tentativa de aliar as características positivas previamente citadas do extrato da *R. mangle* à capacidade de liberação lenta de substâncias que estão associadas aos biopolímeros (YADAV, 2015). Desta maneira, os efeitos anti-inflamatório, anti oxidante e pró angiogênico da *R. mangle* poderiam ser mantidos por mais tempo, com liberação das substâncias ativas localmente, evitando a circulação e metabolização sistêmica, repercutindo em menor incidência de efeitos adversos, e com aplicação em tempo único, sem necessidade de reaplicações periódicas.

No entanto, a utilização da via subcutânea foi relatada em poucos estudos, em alguns deles com a associação de matrizes degradáveis a substâncias com atividades pró angiogênicas ou indutoras de produção de fibroblastos (LEE et al., 2017). A ideia principal do uso dessas plataformas ou matrizes subdérmicas está baseada na propriedade de degradação gradual das mesmas. Geralmente são polímeros, naturais ou sintéticos, com liberação das substâncias impregnadas de maneira sustentada durante o período desejado, evitando-se os picos de concentração durante a aplicação sistêmica da medicação ou falta da substância nos intervalos entre aplicações (MILCH et al., 2010).

Em estudo com modelo de retalho semelhante ao do nosso estudo, Milch et al. (2010) testaram uma matriz biodegradável de colágeno com partículas de policaprolactone com capacidade de suportar monócitos. A hipótese era que a entrega direta na ferida e com liberação lenta de monócitos poderia estimular a angiogênese e diminuir a necrose cutânea. Porém, apesar de aumento na angiogênese na análise histológica, não houve diminuição macroscópica da área de necrose no grupo tratado.

Lee et al. (2017) utilizaram uma matriz sintética formada pelo polímero de diglicerídeo aspartado de etileno argininil para “entregar” ao subcutâneo do retalho substâncias ativas como VEGF e fator de crescimento transformador beta 3 (TGF- β 3). Observaram melhora na viabilidade cutânea em retalhos isquêmicos em ratos com a utilização do polímero associado ao VEGF e TGF- β 3, além de aumento na formação de neovasos nas porções distais do retalho. Em alguns animais foi observada uma inflamação branda na ferida operatória e os autores consideraram a possibilidade da mesma ter sido induzida pelo polímero utilizado.

7.6 EVENTOS ADVERSOS

Em um dos animais do grupo no qual foi utilizado o filme de RmBg foi observado um padrão de necrose bastante atípico, com a porção distal do retalho preservada, apresentando tecido viável, e a porção média do retalho com necrose bem delimitada. Naturalmente, a necrose

em retalhos cutâneos, ocorre de maneira contínua até a porção mais distal do retalho e não de forma “alternada”, com tecido viável localizado mais distal em relação à necrose. Acreditamos que neste caso houve a formação de hematoma na porção média do retalho, constatada pela presença abundante de hemácias livres nas amostras analisadas microscopicamente deste animal.

Glass e Nanchahal (2012) conseguiram explicar bem este fenômeno da necrose induzida por hematomas, tanto pela pressão exercida no pedículo vascular ou arteríolas periféricas pelo volume de sangue, quanto pelo efeito bioquímico gerado em cascata pelas citocinas geradas pela degradação de plaquetas, recrutamento de neutrófilos e liberação de radicais livre e enzimas proteolíticas. Estas reações promovem ativação de mecanismos pró trombóticos e oclusão de pequenos vasos sanguíneos com consequente isquemia e necrose tecidual.

Apesar da justificativa de como o hematoma localizado pode ter induzido a necrose na porção média do retalho, ainda não explica como a porção distal sobreviveu mesmo sem o aporte sanguíneo provido pela base do retalho. É possível que esta necrose na porção proximal ocorreu por um mecanismo diferente do restante dos animais, portanto, a cascata do hematoma aconteceu de maneira mais lenta que as outras necroses. Desta forma, houve um fluxo sanguíneo durante um período de tempo maior para a porção distal, o que pode ter induzido a formação de neovasos que promoveram o efeito de enxerto cutâneo a partir da troca de nutrientes entre a porção distal e o leito da ferida.

Além disso, estudo prévio demonstrou que uma determinada pressão leve exercida na porção distal do retalho pode aumentar a sua viabilidade devido ao efeito de enxerto e facilitação da pressão osmótica e passagem de nutrientes (KAUFMAN et al., 1985). No entanto, não foi possível evidenciar qualquer tipo de pressão exercida sobre o retalho, tendo em vista que os animais não foram manipulados nos dias seguintes ao procedimento cirúrgico.

Neste experimento, dois animais que receberam o filme da RmBg apresentaram deiscência de pequeno segmento na ferida operatória. O mau posicionamento do filme sobre a borda da ferida naquela região pode ter agido como um corpo estranho no local e ter influenciado negativamente na coaptação das bordas da ferida com consequente deiscência. Além disso, como observado por Lee et al. (2017) que flagrou processo inflamatório na borda do retalho causado pelo polímero sintético utilizado no seu estudo, o nosso biopolímero pode ter induzido um processo inflamatório durante a sua degradação na borda da ferida e provocado a deiscência, apesar de serem polímeros bem diferentes.

8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Um fator que pode ser confundidor dos resultados é o fato do retalho ser de espessura relativamente fina e permanecer em contato com o leito da ferida durante os 7 dias. Desta maneira, pode haver troca de nutrientes entre o leito da ferida e o retalho, funcionando como um enxerto local e podendo diminuir áreas de necrose que não seriam irrigadas pela base do retalho, porém serão nutridas a partir da embebição de nutrientes do leito da ferida. Vários autores já discutiram sobre essa questão e propuseram maneiras de evitar esse contato direto entre o leito e o retalho, com modificações no modelo ao propor retalhos tubulares (KELLY et al., 2010). ou com aposição de uma membrana de silicone ou outros materiais para servirem como barreira entre o leito e o retalho cutâneo (CAMPBELL; MOSS; HUGO, 1992; JONES et al., 2001; MUTAF; TASAKI; FUJII, 1994). As membranas de barreira se mostraram eficientes para impedir a troca, contudo, por se tratar de um corpo estranho que não é metabolizado, criavam um caminho para entrada de bactérias e facilitavam infecções, além de poderem causar irritação e aumento do processo inflamatório. (KELLY et al., 2010).

No entanto, a importante interação entre o retalho e o leito da ferida ocorre fisiologicamente em quase todas as cirurgias de retalhos na prática clínica, devido a este fato decidimos utilizar a substância entre o leito e o retalho, pois a mesma poderia apresentar efeito positivo na relação entre eles e, de certa forma, contribuir para diminuição da necrose tecidual. Também não entendemos que o biopolímero fosse uma barreira significativa para que a troca entre o retalho e o leito pudesse ocorrer, já que o mesmo é um exopolissacarídeo de origem biológica, que não é impermeável e vai sendo degradado durante alguns dias.

Embora a pele do rato não tenha as mesmas características da humana, parte dos trabalhos destinados ao estudo da isquemia e da circulação cutânea tem utilizado este animal. A diferença entre ambas reside principalmente nas características do tecido subjacente à derme. No rato a camada muscular, ou *panniculus carnosus*, é aderida a cútis e frouxamente a fáscia profunda, pelo tecido areolar frouxo, enquanto que, no ser humano, a gordura superficial ou *panniculus adiposus* é mais firmemente aderida à fáscia profunda. Em relação à irrigação cutânea, essas camadas são comparáveis pela grande quantidade de vasos presentes. Portanto, tanto no rato quanto no homem, um retalho pediculado deve possuir o panículo para conter os vasos sanguíneos necessários a sua sobrevivência. (MCFARLANE; DEYOUNG; HENRY, 1965).

Optou-se pelo modelo experimental em ratos pela facilidade de aquisição e manejo dos animais, e devido ao fato da maioria dos estudos envolvendo retalhos cutâneos serem realizados

com esse tipo de animal o que facilita comparações de ordem anatômica e fisiológica, além disso, esse modelo facilita a busca por resultados comparáveis a outros estudos.

A utilização do biopolímero de betaglucana associado ao extrato aquoso da *R. mangle* em retalhos isquêmicos para prevenção da necrose em porções distais ainda não havia sido testada. Portanto, a aplicação deste produto é uma proposta inicial para prosseguir a investigação com vista a solucionar uma complicação cirúrgica de morbidade relevante na prática diária das cirurgias reconstrutoras.

Uma limitação importante desse estudo é a não avaliação da microcirculação por meio de algum método invasivo de imagem, como por exemplo a cintilografia. Apesar da avaliação histológica da microcirculação, que foi realizada ao quantificar os vasos sanguíneos presentes, um método de imagem invasivo poderia quantificar e documentar a área de necrose a partir da difusão da substância radioativa na microcirculação. Além de não ter sido possível a mensuração de metabólitos para avaliação do estresse oxidativo como por exemplo a superóxido desmutase (SOD) e, desta forma, seria possível testar a hipótese de diminuição da formação de radicais livres, como citado acima.

A concentração do extrato também foi um fator limitador, pois a mesma foi determinada a partir da concentração máxima que a impregnação no biopolímero permitiu. Foi preciso utilizar uma concentração de 0,45%, enquanto estudo prévio de cicatrização de feridas com o mesmo extrato utilizado neste estudo aplicou uma solução a 5% e apresentou melhora na qualidade de epitelização em feridas cutâneas abertas, quando comparada ao grupo controle (ARAÚJO, 2015).

Apesar de não termos constatado menor infiltrado inflamatório ou maior quantidade de vasos nos grupos tratados com o extrato da *R. mangle* ou com o filme da RmBg, houve menor necrose macroscópica com a utilização do filme da RmBg. Este fato pode ser justificado talvez pelo efeito anti oxidante promovido pelo filme, ou ainda por um efeito anti-inflamatório que não repercutiu em menor infiltrado de leucócitos, e sim em menor produção de prostaglandinas e, conseqüentemente, uma menor cascata química inflamatória. Alanko et al. (1999) relataram que os compostos fenólicos têm efeito duplo sobre a síntese de prostaglandinas, em baixas concentrações estimulam sua produção, enquanto altas concentrações a inibem; durante a estimulação estes compostos atuariam como substratos redutores dos intermediários oxidados da prostaglandina sintase.

9 CONCLUSÃO

- O extrato da *Rhizophora mangle* deste estudo foi compatível com estudos prévios sobre esta planta.
- A associação do extrato da *R. mangle* ao biopolímero de betaglcana mostrou-se eficaz em diminuir a necrose cutânea em retalhos isquêmicos em ratos quando comparado ao grupo controle.
- O grupo que recebeu o filme da RmBg apresentou menor grau de retração do retalho quando comparado ao grupo controle (SF 0,9%) e com o grupo do biopolímero de betaglcana.
- No estudo histomorfométrico não foi observada diferença significativa na análise dos fibroblastos, leucócitos e vasos sanguíneos entre os grupos estudados.
- Foram observados segmentos de deiscência de ferida operatória em dois animais do grupo tratado com o filme da RmBg e necrose atípica em um animal.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO-BOGADO, C. E. et al. Efeito da hialuronidase na sobrevida de retalhos cutâneos em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, [s.l.], v. 17, nº suppl 1, p. 14–16, 2002. ISSN: 0102-8650, DOI: 10.1590/S0102-86502002000700004.
- ADAMSON, J. E. et al. The effects of dimethyl sulfoxide on the experimental pedicle flap: a preliminary report. **Plastic and reconstructive surgery**, [s.l.], v. 37, nº 2, p. 105–10, 1966. ISSN: 0032-1052.
- AFIFI, F. U.; ABURJAI, T. Antiplatelet activity of *Varthemia iphionoides*. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 75, nº 7–8, p. 629–633, 2004. ISSN: 0367326X, DOI: 10.1016/j.fitote.2004.04.014.
- AHMED, Z. et al. Characterization of new exopolysaccharides produced by coculturing of *L. kefir* strains with yoghurt strains. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], v. 59, p. 377–83, 2013. ISSN: 1879-0003, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.075.
- ALANKO, J. et al. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 26, nº 1–2, p. 193–201, 1999. ISSN: 08915849, DOI: 10.1016/S0891-5849(98).00179-8.
- ALMEIDA, K. G. De et al. Ação do dimetil-sulfóxido na isquemia de retalhos randômicos de pele em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, [s.l.], v. 19, nº 6, p. 649–657, 2004. ISSN: 0102-8650, DOI: 10.1590/S0102-86502004000600012.
- ANGEL, M. et al. Augmentation of skin flap survival with allopurinol. **Ann Plast Surg**, [s.l.], v. 18, p. 494–498, 1987.
- _____. The critical relationship between free radicals and degrees of ischemia: evidence for tissue intolerance of marginal perfusion. **Plast Reconstr Surg**, [s.l.], v. 81, p. 233–239, 1988.
- ARAKI, J. et al. Application of Normobaric Hyperoxygenation to an Ischemic Flap and a Composite Skin Graft. **Plastic and Reconstructive Surgery Global Open**, [s.l.], v. 2, nº 5, p. e152, 2014. ISSN: 2169-7574, DOI: 10.1097/GOX.0000000000000029.
- ARAÚJO, J. G. De. **Desenvolvimento de creme de *Rhizophora mangle* L: avaliação do potencial cicatrizante em feridas cutâneas**. 2015. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- ARYA, A. et al. **Synergistic effect of quercetin and quinic acid by alleviating structural degeneration in the liver, kidney and pancreas tissues of STZ-induced diabetic rats: A mechanistic study**. Food and Chemical Toxicology, [s.l.], v. 71, p. 183–196, 2014. ISSN: 02786915, DOI: 10.1016/j.fct.2014.06.010.
- ASAI, S.; FUKUTA, K.; TORII, S. Topical administration of prostaglandin E1 with iontophoresis for skin flap viability. **Annals of plastic surgery**, United States, v. 38, n. 5, p. 514–517, 1997. ISSN: 0148-7043.
- ASHOORI, F. et al. Possible contributions of mastocytosis, apoptosis, and hydrolysis in pathophysiology of randomized skin flaps in humans and guinea pigs. **Plastic and reconstructive surgery**, United States, v. 98, n. 3, p. 491–501, 1996. ISSN: 0032-1052 (Print).

ATALAY, C. et al. Efficacy of topical nitroglycerin and transcutaneous electrical nerve stimulation on survival of random-pattern skin flaps in rats. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery / Nordisk plastikkirurgisk forening [and] Nordisk klubb for handkirurgi*, Sweden, v. 37, n. 1, p. 10–13, 2003. ISSN: 0284-4311 (Print).

AUGER, C. et al. Catechins and Procyanidins in Mediterranean Diets. **Food Research International**, [s.l.], v. 37, p. 233-45, 2004.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 41, n. 1, 2005. ISSN: 1516-9332, DOI: 10.1590/S1516-93322005000100004.

BANBURY, J.; SIEMIONOW, M.; PORVASNIK, S. Muscle flaps' triphasic microcirculatory response to sympathectomy and denervation. **Plast Reconstr Surg.**, [s.l.], v. 104, p. 730–737, 1999.

BASU, G. et al. Prevention of distal flap necrosis in a rat random skin flap model by gene electrotransfer delivering VEGF 165 plasmid. **The Journal of Gene Medicine**, [s.l.], v. 16, n. 3–4, p. 55–65, 2014. ISSN: 1099498X, DOI: 10.1002/jgm.2759.

BAYRAMIÇLI, M.; YILMAZ, B.; NUMANOĞLU, A. Contraction of experimental skin flaps. **Annals of plastic surgery**, [s.l.], v. 41, n. 2, p. 185-90, 1998. ISSN: 0148-7043.

BERENGUER, B. et al. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. **Journal of ethnopharmacology**, [s.l.], v. 103, n. 2, p. 194–200, 2006. ISBN: 0378-8741 (Print). r0378-8741 (Linking). ISSN: 0378-8741, DOI: 10.1016/j.jep.2005.08.029.

BIN, C. et al. Beneficial effects of Xuebijing injection on random skin flap survival in rats. **Journal of Surgical Research**, [s.l.], v. 196, n. 2, p. 421-426, 2015. ISSN: 0022-4804, DOI: 10.1016/j.jss.2015.03.012.

BITTENCOURT, R. de C. et al. Influence of minoxidil on ischemic cutaneous flaps in rats. **Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, Brazil, v. 20, n. 6, p. 450–454, 2005. ISSN: 0102-8650. DOI: /S0102-86502005000600010.

BOZ, H. p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. **International Journal of Food Science & Technology**, [s.l.], v. 50, n. 11, p. 2323-2328, 2015. ISSN: 09505423, DOI: 10.1111/ijfs.12898.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 46, 23 de Outubro de 2007. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados.**, [s.l.], p. 16, 2007.

BUEMI, M. et al. Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps. *Acta. Acta Derm Venereol*, [s.l.], v. 82, p. 411-417, 2002.

CALLEGARI, P. R. et al. An anatomic review of the delay phenomenon: I. Experimental studies. **Plast Reconstr Surg.**, v. 89: p. 397-407, 1992.

CAMPBELL, S. P.; MOSS, M. L.; HUGO, N. E. When does a random flap die? **Plastic and reconstructive surgery**, [s.l.], v. 89, n. 4, p. 718–21, 1992. ISSN: 0032-1052.

CELIK, A. et al. Comparison of the effects of troxerutin and heparinoid on flap necrosis. **British Journal of Plastic Surgery**, [s.l.], v. 63, n. 5, p. 875-883, 2010. ISSN: 1748-6815, DOI: 10.1016/j.bjps.2009.01.082.

CETINKALE, O. et al. Neutrophil-mediated injury in ischemic skin flaps: amelioration of ischemic injury by cyclosporine in the rat. **Annals of plastic surgery**, [s.l.], v. 37, n. 1, p. 66–74, 1996. ISSN: 0148-7043.

CHEN, Z. et al. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. **International Dairy Journal**, [s.l.], v. 43, p. 15-21, 2015. ISSN: 09586946, DOI: 10.1016/j.idairyj.2014.10.004.

CHEON, Y. W.; TARK, K. C.; KIM, Y. W. Better Survival of Random Pattern Skin Flaps Through the Use of Epigallocatechin Gallate. **Dermatol Surg**, [s.l.], v. 38, p. 1835-1842, 2012. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2012.02566.x.

CHUNG, T.; HOLTON, L.; SILVERMAN, R. The effect of Fondaparinux versus Enoxaparin in the survival of a congested skin flap in a rabbit model. **Ann Plast Surg**, [s.l.], v. 56, p. 312-315, 2006.

CINKILIC, N. et al. Radioprotection by two phenolic compounds: Chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 53, p. 359-363, 2013. ISSN: 02786915, DOI: 10.1016/j.fct.2012.12.008.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 126, n. 1, p. 159–175, 2009. ISSN: 03788741, DOI: 10.1016/j.jep.2009.07.016.

COURTEMANCHE, D. J. et al. Acute choke zone effects: Lessons from radioactive and fluorescent microspheres in a pig model muscle flap. **Plastic surgery** (Oakville, Ont.), [s.l.], v. 23, n. 3, p. 171-176, 2015. ISSN: 2292-5503.

CZACZYK, K.; MYSZKA, K. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS). and its role in microbial biofilm formation. **Polish Journal of Environmental Studies**, [s.l.], v. 16, n. 6, p. 799–806, 2007. ISBN: 1230-1485, ISSN: 12301485.

DAVIES, B. W.; LEWIS, R. D.; PENNINGTON, G. The impact of vasodilators on random-pattern skin flap survival in the rat following mainstream smoke exposure. **Annals of plastic surgery**, United States, v. 40, n. 6, p. 630–636, 1998. ISSN: 0148-7043.

DAVIS, R. E. et al. Comparison of topical anti-ischemic agents in the salvage of failing random-pattern skin flaps in rats. **Archives of facial plastic surgery**, United States, v. 1, n. 1, p. 27-32, 1999. ISSN: 1521-2491.

DINIZ, R. O.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. SCHNEENEDORF, J. M. Atividade antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 13, p. 19-21, 2003.

DORION, D. et al. Role of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic skeletal muscles in the pig and humans. **J Appl Physiol**, [s.l.], v. 75, p. 246–250, 1993.

DUARTE, S.; GOMES, H.; FERREIRA, L. Effect of dimethyl sulphoxide on necrosis of skin flaps in rats. **Con. J. Plast. Surg.**, [s.l.], v. 9, p. 93–7, 1998.

EMAMI, H. et al. Na⁺ – H⁺ exchange inhibition attenuates ischemic injury in rat random pattern skin flap : The role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. **European Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 698, n. 1-3, p. 330-334, 2013. ISSN: 0014-2999, DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.10.022.

EMSEN, I. M. A New Agent for Flap Survival – Hippophae Rhamnoides L. (Sea Buckthorn): an experimental study in rats. **Canadian Journal of Plastic Surgery**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 195-198, 2005. ISSN: 1195-2199, DOI: 10.1177/229255030501300404.

FAN, Z.; HE, J. Preventing necrosis of the skin flaps with nitroglycerin after radical resection for breast cancer. **Journal of surgical oncology**, United States, v. 53, n. 3, p. 210, 1993. ISSN: 0022-4790 (Print).

FERNANDEZ, O. et al. Efficacy of Rhizophora mangle aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 73, n. 7-8, p. 564-568, 2002. ISSN: 0367-326X, DOI: 10.1016/S0367-326X(02).00229-0.

FIORENTINI, Â. M. et al. The influence of different combinations of probiotic bacteria and fermentation temperatures on the microbiological and physicochemical characteristics of fermented lactic beverages containing soybean hydrosoluble extract during refrigerated storage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 31, n. 3, p. 597-607, 2011. ISSN: 0101-2061, DOI: 10.1590/S0101-20612011000300008.

FORTENBACH, C. R.; MODJTAHEDI, B. S.; MAIBACH, H. I. Role of Physical Chemical Properties in Drug Relay into Skin Compartments. **Skin Pharmacology and Physiology**, [s.l.], v. 21, n. 6, p. 294-299, 2008. ISSN: 1660-5535, DOI: 10.1159/000148221.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Antibacterial Activities of Phenolic Benzaldehydes and Benzoic Acids against Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Salmonella enterica. **Journal of Food Protection**, [s.l.], v. 66, n. 10, p. 1811-1821, 2003. ISSN: 0362-028X, DOI: 10.4315/0362-028X-66.10.1811.

GARCÍA FONTÁN, M. C. et al. Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. **International Dairy Journal**, [s.l.], v. 16, n. 7, p. 762–767, 2006. ISSN: 09586946, DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.07.004.

GDALEVITCH, P. et al. Effects of nitroglycerin ointment on mastectomy flap necrosis in immediate breast reconstruction: a randomized controlled trial. **Plastic and reconstructive surgery**, United States, v. 135, n. 6, p. 1530–1539, 2015. ISSN: 1529-4242 (Electronic), DOI: 10.1097/PRS.0000000000001237.

GHASEMLOU, M. et al. Structural investigation and response surface optimisation for improvement of kefir production yield from a low-cost culture medium. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 133, n. 2, p. 383–389, 2012. ISSN: 03088146, DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.01.046.

GLASS, G. E.; NANCHAHAL, J. Why haematomas cause flap failure: an evidence-based paradigm. **Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS**, Netherlands, v. 65, n. 7, p. 903-910, 2012. ISSN: 1878-0539 (Electronic). DOI: 10.1016/j.bjps.2011.12.014.

GOZU, A.; PODA, M. Pretreatment with octreotide modulates iNOS gene expression, mimics surgical delay, and improves flap survival. **Ann Plast Surg.**, [s.l.], v. 65, p. 245–9, 2010.

GUL, O. et al. Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 98, n. 3, p. 1517–1525, 2015. ISSN: 00220302, DOI: 10.3168/jds.2014-8755.

GUMUS, N. et al. Effect of topically applied minoxidil on the survival of rat dorsal skin flap. **Aesthetic plastic surgery**, United States, v. 36, n. 6, p. 1382–1386, 2012. ISSN: 1432-5241 (Electronic), DOI: 10.1007/s00266-012-9966-2.

_____. The effect of topical minoxidil pretreatment on nonsurgical delay of rat cutaneous flaps: further studies. **Aesthetic plastic surgery**, United States, v. 37, n. 4, p. 809–815, 2013. ISSN: 1432-5241 (Electronic), DOI: 10.1007/s00266-013-0161-x.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 96, n° 2–3, p. 67–202, 2002. ISSN: 01637258, DOI: 10.1016/S0163-7258 (02). 00298-X.

IBRAHIM, A. M. S. et al. Vasopressors and reconstructive flap perfusion: a review of the literature comparing the effects of various pharmacologic agents. **Annals of plastic surgery**, United States, v. 73, n. 2, p. 245–248, 2014. ISSN: 1536-3708 (Electronic), DOI: 10.1097/SAP.0b013e31828d70b3.

IM, M. et al. Effect of allopurinol on the survival of hyperemic island skin flaps. **Plast Reconstr Surg**, [s.l.], v. 73, p. 276-278, 1984.

IRIGOYEN, A. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 90, n. 4, p. 613-620, 2005. ISSN: 03088146, DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.04.021.

JANG, S. A. et al. Quinic acid inhibits vascular inflammation in TNF- α -stimulated vascular smooth muscle cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 96, p. 563–571, 2017. ISSN: 07533322, DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.021.

JANSEN, G. et al. Increased survival of ischaemic musculocutaneous flaps in rats after acupuncture. **Acta physiologica Scandinavica**, [s.l.], v. 135, n. 4, p. 555–8, 1989. ISSN: 0001-6772, DOI: 10.1111/j.1748-1716.1989.tb08616.x.

JEONG, D. et al. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* DN1 isolated from kefir. **Food Control**, [s.l.], v. 78, p. 436–442, 2017. ISSN: 09567135, DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.02.033.

JONES, M. et al. Influence of recipient-bed isolation on survival rates of skin-flap transfer in rats. **Journal of reconstructive microsurgery**, [s.l.], v. 17, n. 8, p. 653–8; discussion 659, 2001. ISSN: 0743-684X, DOI: 10.1055/s-2001-18821.

KANDIL, F. E. et al. Polyphenolics in *Rhizophora mangle* L. leaves and their changes during

leaf development and senescence. **Trees**, v. 18, p. 518-528, 2004. DOI: 10.1007/s00468-004-0337-8.

KARAASLAN, O. et al. Protective effect of grape seed extract against ischaemia/reperfusion injury in a rat epigastric flap model. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, [s.l.], v. 63, n. 4, p. 705-710, 2010. ISSN: 17486815, DOI: 10.1016/j.bjps.2009.01.018.

KARASAWA, K.; OTANI, H. Anti-Allergic Properties of a Matured Fruit Extract of the Date Palm Tree (*Phoenix dactylifera* L.). in Mite-Sensitized Mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, [s.l.], v. 58, n. 4, p. 272-277, 2012. ISSN: 0301-4800, DOI: 10.3177/jnsv.58.272.

KAUFMAN, T. et al. The salutary effects of the bed on the survival of experimental flaps. **Ann Plastic Surg**, v. 14, p. 64-73, 1985.

KELLY, C. P. et al. A new design of a dorsal flap in the rat to study skin necrosis and its prevention. **British Journal of Plastic Surgery**, [s.l.], v. 63, n. 9, p. 1553-1556, 2010. ISSN: 1748-6815, DOI: 10.1016/j.bjps.2009.08.011.

KERRIGAN, C. L. Skin flap failure: pathophysiology. **Plastic and reconstructive surgery**, [s.l.], v. 72, n. 6, p. 766-777, 1983. ISSN: 0032-1052.

KESENKAS H. et al. Antioxidant Properties of Kefir Produced from Different Cow and Soy Milk Mixtures. **Journal of Agricultural Sciences**, [s.l.], v. 17, p. 253-259, 2011. ISSN: 1300-7580, DOI: 10.15832/tbd.44259.

KOMOROWSKA-TIMEK, E. et al. The effect of single administration of vascular endothelial growth factor or L-arginine on necrosis and vasculature of the epigastric flap in the rat model. **British journal of plastic surgery**, England, v. 57, n. 4, p. 317-325, 2004. ISSN: 0007-1226, DOI: 10.1016/j.bjps.2003.12.036.

KREIDSTEIN, M. L. et al. The isolated perfused human skin flap: design, perfusion technique, metabolism, and vascular reactivity. **Plastic and reconstructive surgery**, [s.l.], v. 87, n. 4, p. 741-9, 1991. ISSN: 0032-1052.

KRYGER, Z.; DOGAN, T.; ZHANG, F. Effects of VEGF administration following ischemia on survival of the gracilis muscle flap in the rat. **Ann Plast Surg**, [s.l.], v. 43, p. 172-178, 1999.

KRYGER, Z.; ZHANG, F.; DOGAN, T. The effect of VEGF on survival of a random flap in the rat. **Br J Plast Surg**, [s.l.], v. 53, p. 234-239, 2000.

KUTUN, S. et al. Is transdermal nitroglycerin application effective in preventing and healing flap ischaemia after modified radical mastectomy? **South African journal of surgery**, v. 48, n. 4, p. 119-121, 2010.

LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. **Phytochemistry Reviews**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 301-311, 2008. ISSN: 1568-7767, DOI: 10.1007/s11101-007-9077-x.

LEE, M. S. et al. Dual delivery of growth factors with coacervate-coated poly (lactic-co-

glycolic acid). nanofiber improves neovascularization in a mouse skin flap model.

Biomaterials, [s.l.], v. 124, p. 65–77, 2017. ISSN: 01429612, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.036.

LEE, S. Y. et al. Quinic acid derivatives from *Pimpinella brachycarpa* exert anti-neuroinflammatory activity in lipopolysaccharide-induced microglia. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 23, n. 7, p. 2140–2144, 2013. ISSN: 0960894X, DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.01.115.

LEVIN, R. et al. Nitroglycerin stimulates synthesis of prostacyclin by cultured human endothelial cells. **J Clin Invest**, [s.l.], v. 67, p. 762–769, 1981.

LI, K. et al. Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz. promote cutaneous wound healing in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 86, 2011. ISSN: 1472-6882, DOI: 10.1186/1472-6882-11-86.

LIU, J. R.; CHEN, M.; LIN, C. Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk-Kefir and Soymilk-Kefir. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s.l.], v. 53, p. 2467–74, 2005.

LIVAOĞLU, M. et al. The effect of Hirudoid on random skin-flap survival in rats. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, [s.l.], v. 63, n. 6, p. 1047–1051, 2010. ISSN: 17486815, DOI: 10.1016/j.bjps.2009.03.018.

LU, W. W. et al. Biomechanical properties of thin skin flap after basic fibroblast growth factor (bFGF). administration. **British Journal of Plastic Surgery**, [s.l.], v. 53, n. 3, p. 225–229, 2000. ISSN: 00071226, DOI: 10.1054/bjps.1999.3264.

MANCHIO, J. et al. Duration of smoking cessation and its impact on skin flap survival. **Plast Reconstr Surg**, [s.l.], v. 124, p. 1105–17, 2009.

MANSON, P. et al. The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. **Ann Surg**, [s.l.], v. 198, p. 87–90, 1983.

MARRERO, E. et al. COX-2 and sPLA2 inhibitory activity of aqueous extract and polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). **Fitoterapia**, [s.l.], v. 77, n. 4, p. 313–5, 2006. ISBN: 0367-326X (Print). r0367-326X (Linking), ISSN: 0367-326X, DOI: 10.1016/j.fitote.2006.03.009.

MATSUU, M. et al. The protective effect of fermented milk kefir on radiation-induced apoptosis in colonic crypt cells of rats. **Journal of radiation research**, [s.l.], v. 44, n. 2, p. 111–5, 2003. ISSN: 0449-3060.

MCCORD, J. Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injuries. **N Engl J Med**, [s.l.], v. 312, p. 159-163, 1985.

MCDLOUD, T. et al. Extraction of Bioactive Molecules from Plants. In: PROCEEDINGS of the International Congress on Natural Products Research. Park City, UT: [s.n.], 1988.

MCFARLANE, R.; DEYOUNG, G.; HENRY, R. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. **Plast Reconstr Surg**, [s.l.], v. 35, n. 177, 1965.

MELCHOR, G. et al. Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* bark. **Fitoterapia**, [s.l.], v.

72, n. 6, p. 689–691, 2001. ISSN: 0367326X, DOI: 10.1016/S0367-326X (01). 00294-5.

MÉLEGA, J. M.; VITERBO, F.; MENDES, F. **Cirurgia plástica: os princípios e a atualidade**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 59-66 p. ISBN: 978-85-277-1648-2.

MIDDLETON, E. J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Review**, [s.l.], v. 52, p. 673-751, 2000.

MIGUEL, M. G. da C. P. et al. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 1875–1884, 2011. ISSN: 0959-3993, DOI: 10.1007/s11274-010-0646-6.

MILCH, H. S. et al. Enhancement of ischemic wound healing by inducement of local angiogenesis. **The Laryngoscope**, [s.l.], v. 120, n. 9, p. 1744-1748, 2010. ISSN: 0023852X, DOI: 10.1002/lary.21068.

MIYAWAKI, T. et al. The effect of lowmolecularweight heparin in the survival of a rabbit congested skin flap. **Plast Reconstr Surg.**, [s.l.], v. 109, p. 1994–9, 2002.

MOREIRA, M. E. C. et al. Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de kefir. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, p. 1738–42, 2008.

MULLINS, J. B. et al. Complications of the transconjunctival approach. A review of 400 cases. **Archives of otolaryngology--head & neck surgery**, [s.l.], v. 123, n. 4, p. 385–8, 1997. ISSN: 0886-4470.

MUNEUCHI, G.; HOSSAIN, A.; YAMAGUCHI, F. The rare sugar D-allose has a reducing effect against ischemia-reperfusion injury on the rat abdominal skin island flap model. **Journal of Surgical Research**, [s.l.], v. 183, n. 2, p. 976–981, 2013. ISSN: 0022-4804, DOI: 10.1016/j.jss.2013.03.006.

MUTAF, M.; TASAKI, Y.; FUJII, T. Is bed isolation necessary during flap prefabrication? An experimental study in rats. **Annals of plastic surgery**, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 392–400, 1994. ISSN: 0148-7043.

NEEDELMAN, P.; CORR, P.; JOHNSON, E. Drugs used for the treatment of angina: Organic nitrates, calcium channel blockers, and beta-adrenergic antagonists. The Pharmacological Basis for Therapeutics. 7 ed. New York: Macmillan, 1985. p. 806–826.

NEZAMI, B.; TALAB, S.; EMAMI, H. et al. Chronic upregulation of the endogenous opioid system impairs the skin flap survival in rats. **Ann Plast Surg.**, [s.l.], v. 63, p. 558–63, 2009.

NICHTER, L. S.; SOBIESKI, M. W.; EDGERTON, M. T. Efficacy of topical nitroglycerin for random-pattern skin-flap salvage. **Plastic and reconstructive surgery**, United States, v. 75, n. 6, p. 847-852, 1985. ISSN: 0032-1052.

NICOLE COTELLE, B. S. P. Role of Flavonoids in Oxidative Stress. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 1, n. 6, p. 569–590, 2001. ISSN: 15680266, DOI: 10.2174/1568026013394750.

NOWOTARSKA, S. et al. Effect of Structure on the Interactions between Five Natural Antimicrobial Compounds and Phospholipids of Bacterial Cell Membrane on Model Monolayers. **Molecules**, [s.l.], v. 19, n. 6, p. 7497-7515, 2014. ISSN: 1420-3049, DOI: 10.3390/molecules19067497.

OFORI-KWAKYE, K.; KWAPONG, A. A.; BAYOR, M. T. Wound healing potential of methanol extract of *Spathodea campanulata* stem bark formulated into a topical preparation. **African Journal of Traditional**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 218–23, 2011. ISSN: 0189-6016.

OTTO, A.; PLESSIS, J. DU; WIECHERS, J. W. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. **International journal of cosmetic science**, [s.l.], v. 31, n. 1, p. 1-19, 2009. ISSN: 1468-2494, DOI: 10.1111/j.1468-2494.2008.00467.x.

PAIVA, I. M. de. **Caracterização estrutural e avaliação da capacidade imunomodulatória de exopolissacarídeos produzidos por lactobacilos isolados de kefir**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Departamento de Biologia Geral, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PALMA, A. et al. Determination of Antioxidant Activity of Spices and Their Active Principles by Differential Pulse Voltammetry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 62, n. 3, p. 582-589, 2014. ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021/jf404578a.

PANG, C. Y. et al. Hemodynamics and vascular sensitivity to circulating norepinephrine in normal skin and delayed and acute random skin flaps in the pig. **Plastic and reconstructive surgery**, [s.l.], v. 78, n. 1, p. 75-84, 1986. ISSN: 0032-1052.

PANG, Y.; LINEAWEAVER, W.; LEI, M. Evaluation of the mechanism of vascular endothelial growth factor improvement of ischemic flap survival in rats. **Plast Reconstr Surg**, [s.l.], v. 112, p. 556-564, 2003.

PERO, R. W.; LUND, H.; LEANDERSON, T. Antioxidant metabolism induced by quinic acid. increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 23, n. 3, p. 335–346, 2009. ISSN: 0951418X, DOI: 10.1002/ptr.2628.

PERREIRA, R. J.; CARDOSO, M. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PICARD-AMI, L. A. J.; MACKAY, A.; KERRIGAN, C. L. Pathophysiology of ischemic skin flaps: differences in xanthine oxidase levels among rats, pigs, and humans. **Plastic and reconstructive surgery**, United States, v. 87, n. 4, p. 750-755, 1991. ISSN: 0032-1052.

PICASSO, R. S. **Caracterização estrutural e atividade citotóxica e imunomodulatória de um novo exopolissacarídeo extraído dos grãos de kefir**. 94 f. 2017. Dissertação (Mestrado em Morfotecnologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

PRADA, F. S. et al. Effect of allopurinol, superoxide-dismutase, and hyperbaric oxygen on flap survival. **Microsurgery**, United States, v. 22, n. 8, p. 352–360, 2002. ISSN: 0738-1085 (Print), DOI: 10.1002/micr.10073.

PRICE, M. A.; PEARL, R. M. Multiagent pharmacotherapy to enhance skin flap survival:

lack of additive effect of nitroglycerin and allopurinol. **Annals of plastic surgery**, United States, v. 33, n. 1, p. 52–56, 1994. ISSN: 0148-7043 (Print).

PUUPPONEN-PIMIA, R. et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 90, n. 4, p. 494-507, 2001. ISSN: 1364-5072, DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01271.x.

QING, L. et al. Inflammatory response associated with choke vessel remodeling in the extended perforator flap model. **Experimental and therapeutic medicine**, [s.l.], v. 13, n. 5, p. 2012–2018, 2017. ISSN: 1792-0981, DOI: 10.3892/etm.2017.4205.

REES, R. et al. The role of xanthine oxidase e xanthine dehydrogenase in skin ischemia. **Surg Res**, [s.l.], v. 56 (2), p. 162–7, 1994.

REES, R. S. et al. Oxidant stress: the role of the glutathione redox cycle in skin preconditioning. **The Journal of surgical research**, United States, v. 58, n. 4, p. 395-400, 1995. ISSN: 0022-4804, DOI: 10.1006/jsre.1995.1061.

REINISCH, J. F. The pathophysiology of skin flap circulation: the delay phenomenon. **Plastic and reconstructive surgery**, [s.l.], v. 54, n. 5, p. 585-598, 1974. ISSN: 0032-1052.

REZAEIAN, F. et al. Erythropoietin protects critically perfused flap tissue. **Ann Surg**, [s.l.], v. 248, p. 919–929, 2008.

_____. Erythropoietin-induced upregulation of endothelial nitric oxide synthase but not vascular endothelial growth factor prevents musculocutaneous tissue from ischemic damage. **Lab Invest**, [s.l.], v. 90, p. 40-51, 2010.

ROCHA, F. P. da et al. Effects of hyperbaric oxygen and N-acetylcysteine in survival of random pattern skin flaps in rats. **Indian journal of plastic surgery**, India, v. 45, n. 3, p. 453-458, 2012. ISSN: 0970-0358, DOI: 10.4103/0970-0358.105941.

ROHRICH, R. J.; CHERRY, G. W.; SPIRA, M. Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment. **Plastic and reconstructive surgery**, United States, v. 73, n. 6, p. 943–948, 1984. ISSN: 0032-1052.

SAFWAT, N. A. et al. Quercetin 3-O-glucoside recovered from the wild Egyptian Sahara plant, *Euphorbia paralias* L., inhibits glutamine synthetase and has antimycobacterial activity. **Tuberculosis**, [s.l.], v. 108, p. 106-113, 2018. ISSN: 14729792, DOI: 10.1016/j.tube.2017.11.005.

SAGI, A. et al. Improved survival of island flaps after prolonged ischemia by perfusion with superoxide dismutase. **Plastic and reconstructive surgery**, United States, v. 77, n. 4, p. 639-644, 1986. ISSN: 0032-1052 (Print).

SÁNCHEZ, L. M. et al. Caracterización química y toxicológica de una formulación cicatrizante de *Rhizophora mangle* L. **Salud Animal**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 69–72, 1998.

SANNA, V.; PEANA, A. T.; MORETTI, M. D. L. Effect of vehicle on diclofenac sodium permeation from new topical formulations: in vitro and in vivo studies. **Current drug delivery**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 93-100, 2009. ISSN: 1567-2018.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. Taninos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 1096.

SCHEIN, O.; WESTREICH, M.; SHALOM, A. Effect of intradermal human recombinant copper-zinc superoxide dismutase on random pattern flaps in rats. **Head & neck**, [s.l.], v. 35, n. 9, p. 1265-1268, 2012. DOI: 10.1002/hed.23114.

SCHNEEDORF, J. M.; ANFITEATRO, D. Fitoterápicos antiinflamatórios aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. In: CARVALHO, J. C. T. (Org.). **Fitoterápicos antiinflamatórios aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. p. 443-467.

SCHWEIZER, D. F. et al. Botulinum toxin A and B raise blood flow and increase survival of critically ischemic skin flaps. **Journal of Surgical Research**, [s.l.], v. 184, n. 2, p. 1205-1213, 2013. ISSN: 0022-4804, DOI: 10.1016/j.jss.2013.04.004.

SENEL, O. et al. Oxygen free radicals impair wound healing in ischemic rat skin. **Annals of plastic surgery**, United States, v. 39, n. 5, p. 516-523, 1997. ISSN: 0148-7043.

SHAHEEN, U. Y. P-Coumaric Acid Ester with Potential Antioxidant Activity from the Genus Salvia. **Free Radicals and Antioxidants**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 23–27, 2011. ISSN: 22312536, DOI: 10.5530/ax.2011.1.5.

SHALOM, A.; FRIEDMAN, T.; WESTREICH, M. Effect of Aspirin and Heparin on Random Skin Flap Survival in Rats. **Dermatol Surg**, [s.l.], p. 785-790, 2008.

SILVA, S.; FERNANDES, B. Relação entre gradiente vegetacional e atributos do solo nos bosques de mangue do Furo Grande, Bragança- PA. Boletim do Laboratório de Hidrobiologia, [s.l.], v. 17, p. 19-27, 2004.

SMITH, D. K.; DOLAN, R. W. Effects of vasoactive topical agents on the survival of dorsal skin flaps in rats. **Otolaringol Head Neck Surg**, v. 121, n. 3, p. 220-223, 1999. ISSN: 0194-5998.

SOMENSI, F. Y. K. **Bioprodução de β - (1-6)-D-Glucana e obtenção de derivado de por carboximetilação visando atividade biológica**. 101 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica do Paraná, Pato Branco, 2014.

TAIZ, LINCOLN; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 339-364 p.

TALHOUK, R. et al. Antiinflammatory bioactivities in plant extracts. Journal of Medicinal Food. **Journal of Medicinal Food**, [s.l.], v. 10, p. 1–10, 2007.

TOPP, S. G. et al. Role of nitric oxide in surgical flap survival. **Journal of the American College of Surgeons**, United States, v. 201, n. 4, p. 628–639, 2005. ISSN: 1072-7515, DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2005.05.026.

TOPP, S.; ZHANG, F.; CHATTERJEE, T. Role of nitric oxide in surgical flap survival. **J Am Coll Surg**, [s.l.], v. 201, p. 628–639, 2005.

TÖRKVIST, L. et al. Heparin protects against skin flap necrosis: relationship to neutrophil recruitment and anticoagulant activity. **Inflamm Res.**, [s.l.], v. 53, p. 1-3, 2004.

VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J. B 1, 3-Glucan in Cancer Treatment. **American Journal of Immunology**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 38–43, 2012. ISBN: ISSN 1553-619X, ISSN: 1553619X, DOI: 10.3844/ajavsp.2012.38.43.

VICENT, K. et al. Gene therapy progress and prospects: therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease. **Gene Ther**, [s.l.], v. 14, p. 781-789, 2007.

VIEIRA, M. G. A. et al. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, [s.l.], v. 47, n. 3, p. 254-263, 2011. ISSN: 00143057, DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011.

WANG, C. et al. Local injection of deferoxamine improves neovascularization in ischemic diabetic random flap by increasing HIF-1 α and VEGF expression. **PloS one**, United States, v. 9, n. 6, p. e100818, 2014. ISSN: 1932-6203 (Electronic), DOI: 10.1371/journal.pone.0100818.

WESCHENFELDER, S.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Atividade anti-escherichia coli em kefir e soro de kefir tradicionais. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, [s.l.], v. 64, p. 49-56, 2009.

YADAV, P. Biomedical Biopolymers, their Origin and Evolution in Biomedical Sciences: A Systematic Review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, [s.l.], v. 9, n. 9, p. 21–25, 2015. ISSN: 2249782X, DOI: 10.7860/JCDR/2015/13907.6565.

YUN, M. H. et al. The Effect of Low-Dose Nitroglycerin Ointment on Skin Flap Necrosis in Breast Reconstruction after Skin-Sparing or Nipple-Sparing Mastectomy. **Archives of Plastic Surgery**, [s.l.], v. 44, n. 6, p. 509–515, 2017. ISSN: 2234-6163, DOI: 10.5999/aps.2017.00934.

ZHANG, F, OSWALD T, LIN S. Vascular endothelial growth factor expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. **Br J Plast Surg**, [s.l.], v. 56, p. 654–659, 2003.

ZHANG, F.; BROOKS, D.; CHEN, W. Improvement of venous flap survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat model. **Ann Plast Surg**, [s.l.], v. 56, p. 670–673, 2006.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 52, p. 275–288, 2016. ISSN: 0268005X, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.07.003.

ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DA COLETA DO MATERIAL VEGETAL

CA DRFB N° 120/2014

24 de outubro de 2014.

Ao Senhor

JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

Prezado Senhor,

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

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

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

Atenciosamente,


CINTHIA RENATA VIEIRA DE LIMA

Diretoria de Recursos Florestais e Biodiversidade

ANEXO B - APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 18 de maio de 2016.

Ofício nº 42/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira**
Departamento de Histologia e Embriologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo: 0005/2016

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Aplicação do biopolímero da *Rhizophora mangle* em retalhos cutâneos isquêmicos para prevenção de necrose tecidual.**"

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Antibióticos (CB/UFPE); Animais: ratos heterogênicos; Linhagem: Wistar; Sexo: fêmeas; Idade: 8-12 semanas; Peso: 220-275g; Número total de animais previsto no protocolo: 60 animais.

Atenciosamente,


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