



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

RICARDO SÉRGIO DA SILVA

EXTRATO DE *Conocarpus erectus* ASSOCIADO AO POLISSACARÍDEO DO
CONSÓRCIO MICROBIANO BIONAT I: UMA ALTERNATIVA DE USO TÓPICO
COMO SUBSTITUTO TEMPORÁRIO DE PELE

Recife
2018



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

RICARDO SÉRGIO DA SILVA

EXTRATO DE *Conocarpus erectus* ASSOCIADO AO POLISSACARÍDEO DO
CONSÓRCIO MICROBIANO BIONAT I: UMA ALTERNATIVA DE USO TÓPICO
COMO SUBSTITUTO TEMPORÁRIO DE PELE

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

Linha de Pesquisa: Morfologia e Inovações Tecnológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

Co-orientador: Ricardo Yara

Recife
2018

Catálogo na fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Silva, Ricardo Sérgio da

Extrato de *Conocarpus erectus* associado ao polissacarídeo do consórcio microbiano Bionat I : uma alternativa de uso tópico como substituto temporário de pele / Ricardo Sérgio da Silva. - 2018

74 f. : il.

Orientador: Jeymesson Raphael Cardoso Vieira.

Coorientador: Ricardo Yara.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Dermatologia. 2. Agentes dermatológicos. I. Vieira, Jeymesson Raphael Cardoso (Orientador). II. Yara, Ricardo (Coorientador). III. Título.

616.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB - 2018 - 226

RICARDO SÉRGIO DA SILVA

**EXTRATO DE *Conocarpus erectus* ASSOCIADO AO POLISSACARÍDEO DO
CONSÓRCIO MICROBIANO BIONAT I: UMA ALTERNATIVA DE USO TÓPICO
COMO SUBSTITUTO TEMPORÁRIO DE PELE**

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

Aprovada em: 28/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira Orientador – UFPE

Profa. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima Associado – UFPE

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira Adjunto – UFPE

Aos meus amados Pais, **Cícero Sérgio** e **Jacicleide Marcionila**, por existirem, serem minha referência de porto seguro e fazerem dos meus dias inesquecíveis. À minha tia Joana Sibaldina (*Inmemorian*), por todo amor, confiança e incentivo, dedico.

AGRADECIMENTOS

Foram muitos desafios ao longo deste percurso, uma luta diária em busca de ultrapassar os meus limites, dias intensos de muitas escolhas, renúncias, inversão de prioridades e intensificação da fé. Afinal, um sonho é uma parte de nós que decidimos eternizar.

E para que esses limites fossem ultrapassados e os objetivos fossem alcançados, tive o apoio de pessoas extraordinárias, das quais posso fazer menção:

Ao imenso e digníssimo Deus por me proporcionar sabedoria e forças para superar as limitações e enfrentar sempre de cabeça erguida os obstáculos que surgiram ao longo da caminhada.

Aos meus pais, Cícero Sérgio e Jacicleide Marcionila, pelo apoio, incentivo, amor e formação moral, que me direcionaram, sempre me instigando a caminhos mais sólidos e resultados extraordinários.

Ao meu orientador e amigo Professor Dr. Jeymesson Vieira por me receber com muita confiança em seu grupo de pesquisa, ser minha referência de motivação e sempre estar disposto a me ensinar da melhor maneira.

Ao meu coorientador e amigo Professor Dr. Ricardo Yara pelo exemplo de humildade e competência, assim como, pelos grandes ensinamentos concedidos.

Ao Instituto Nacional do semiárido (INSA) pela realização do HPLC.

À Professora colaboradora Dr. Cláudia Lima por me receber tão bem em seu laboratório e por todos os ensinamentos, apoio e incentivo proporcionados.

Ao Instituto Tecnológico das Cadeias BioSSustentáveis (ITCBio) pela concessão de bolsa no projeto “ Jiquiá Sustentável “no período mais difícil do curso.

Ao Professor Dr. Eduardo Lira por nos dá a oportunidade de realizar as análises biológicas em seu laboratório.

À Professora Dra. Dijanah Machado pela realização das análises estatísticas e ser minha referência de Pessoa e Profissional.

Ao departamento de Histologia e Embriologia, na pessoa de Sandrine Arruda, pelo processamento do material biológico.

Ao laboratório de Etnofarmacologia Aplicada (departamento de antibióticos), pelo apoio e disposição de reagentes.

À Eduarda Santana e à Luzia Abílio, pesquisadoras e amigas de laboratório, por todo apoio ao me situar na nova linha de pesquisa e representar um apoio incalculável em todos os momentos.

Aos amigos de laboratório, Edson Renan e Rafael Padilha, pelo auxílio na caracterização fitoquímica das amostras, bem como pela competência que sempre me instigou a ir além dos meus limites.

Aos colegas de laboratório Vinícius Vilas Boas, Ítalo Rafael, Antônio Júnior, Dionísio, pelo auxílio na realização dos testes biológicos.

À Flávia Berenguer por ser uma amiga e pessoa singular em todos os momentos de minha trajetória no laboratório de biofísica. Seus ensinamentos e apoio serão sempre lembrados.

À Regina Picasso pelas contribuições no meu trabalho.

À Maria Dasdores Cavalcanti e ao José Milton pelos ensinamentos e motivação que sempre me direcionaram.

À Marília Grasielly por não medir esforços para compartilhar suas experiências científicas e me auxiliar na construção desse sonho.

À Natália Onofre por sempre estar disposta a ajudar e ser minha referência de tranquilidade em momentos difíceis da caminhada.

Aos amigos André Santos, Amauri Paraíso, Edson Francisco, Kheyveson Everonaldo e Samuel Lima que sempre me incentivam a permanecer no percurso da carreira acadêmica proporcionando um apoio inexprimível.

À casa do Estudante Mista da UFPE por me acolher tão bem durante o período mais difícil do curso.

Ao amigo Elenildo Santos por acompanhar de perto a construção desse sonho e proporcionar incentivo e força.

À minha amiga Ana Patrícia de Melo, pessoa na qual sempre pude contar nos momentos mais árduos da jornada, representando um apoio imensurável.

Ao amigo Wellington Silva por acreditar em minha capacidade intelectual e sempre estar disposto a me incentivar e auxiliar na busca de caminhos mais sólidos.

Ao amigo Júnior Albuquerque pelo apoio e incentivo durante toda minha formação acadêmica.

Aos amigos do Movimento Treinamento de Liderança Cristã (TLC) por todo suporte e companheirismo que, sem dúvidas, me impulsionaram nessa caminhada.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia por todo incentivo e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

“Eu aprendi que a coragem não é ausência de medo, mas o triunfo sobre ele.”

Nelson Mandela, 2013.

RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo humano e atua como barreira seletiva entre o meio externo e o interno. Quando alguma agressão acomete o tecido cutâneo, faz-se necessário uma rápida intervenção, a fim de que se possa garantir a regeneração dos tecidos. As feridas representam um sério problema de saúde pública, correspondente ao grande número de pacientes com alterações na integridade da pele. Nesse contexto, tem-se a necessidade de buscar novas estratégias para o tratamento de feridas, a fim de reduzir a carga de cuidados de modo mais eficiente e econômico. O objetivo deste estudo foi avaliar filmes poliméricos baseados no consórcio microbiano Bionat 1 com incorporação de extrato metanólico de folhas de *Conocarpus erectus* como uma alternativa de uso tópico para substituto de pele. O extrato metanólico foi caracterizado por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em camada fina de alto desempenho. Para analisar e quantificar a presença de compostos fenólicos encontrados nas cromatografias, foi realizado o doseamento de flavonóides nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 250 µg/mL. Os filmes desenvolvidos foram: filmes de polissacarídeo do CM Bionat 1 (R1) e filme de polissacarídeo do CM Bionat 1 incorporado com extrato de *C. erectus* (R2). Para avaliação da atividade cicatrizante foram utilizados 25 ratos *Wistar*, submetidos à indução de ferida cutânea e subdivididos em 5 grupos de 5 animais cada: grupo controle negativo (soro fisiológico-grupo A), grupo controle positivo (Filme de Biocelulose-grupo B), grupo tratado com extrato de *C. erectus* (grupo C), grupo tratado com filme R1 (grupo D) e grupo tratado com filme R2 (grupo E), todos os grupos foram acompanhados no 10º e 15º quinto dia de pós-operatório para avaliações morfométrica e histomorfométrica. O estudo do perfil fitoquímico do extrato de *C. erectus* revelou a presença de flavonoides, ácido clorogênico, catequina, ácido cafeico, geraniina, quercetina e apigenina. Os filmes poliméricos R1 e R2 apresentaram-se macroscopicamente homogêneos, sem rachaduras e flexíveis, entretanto, os filmes R2 apresentaram-se com melhores características quando comparados com o filme R1 não incorporado. O polissacarídeo extraído do consórcio microbiano Bionat 1 mostrou características compatíveis para o desenvolvimento de um substituto temporário de pele. Os resultados da avaliação cicatrizante mostraram que o uso tópico de filmes de polissacarídeo extraído do CM Bionat 1 incorporado ao extrato de *C. erectus*

apresenta efeito significativo na diminuição da área de feridas cutâneas sugerindo a utilização como substituto temporário de pele.

Palavras-Chave: *Conocarpus erectus*. Cromatografia. Filmes poliméricos.

ABSTRACT

The skin is the biggest organ of the human body and acts as a selective barrier between the external and internal environments. When some aggression affects the cutaneous tissue, it is necessary a rapid intervention, in order to guarantee the regeneration of the tissues. The wounds represent a serious public health problem, corresponding to the large number of patients with alterations in skin integrity. In this context, it is necessary to seek out new strategies for the treatment of wounds, in order to reduce the burden of care in an efficient and economical way. The objective of this study was to evaluate polymeric films based on the Bionat 1 microbial consortium with the incorporation of the methanolic extract from the leaves of *Conocarpus erectus* as an alternative topical use for skin substitute. The extract was obtained by infusion with methanol and characterized by high performance liquid chromatography and high performance thin layer chromatography. In order to analyze and quantify the presence of phenolic compounds found in the chromatograms, the dosage of flavonoids at concentrations of 1000 µg / mL, 500 µg / mL and 250 µg / mL was performed. The developed films were: polysaccharide films of CM Bionat 1 (R1) and CM Bionat 1 polysaccharide film incorporated with extract of *C. erectus* (R2). To evaluate the cicatrizant activity, 25 Wistar rats were submitted to cutaneous wound induction and subdivided into 5 groups of 5 animals each: negative control group (physiological saline-group A), positive control group (Biocellulose film- group B), group treated with extract of *C. erectus* (group C), group treated with film R1 (group D) and group treated with film R2 (group E), all groups were followed on the 10th and 15th postoperative day for morphometric and histomorphometric evaluations. The phytochemical profile study from the *erectus C.* extract revealed the presence of flavonoids, chlorogenic acid, catechin, caffeic acid, geranin, apigenin and quercetin. The polymeric films R1 and R2 were macroscopically homogeneous, without cracking and flexible, however, the R2 films presented with better characteristics when compared to the unincorporated R1 film. O polissacarídeo extraído do consórcio microbiano Bionat 1 mostrou características compatíveis para o desenvolvimento de um substituto temporário de pele. Os resultados da avaliação cicatrizante mostraram que o uso tópico de filmes de polissacarídeo extraído do CM Bionat 1 incorporado ao extrato de *C. erectus* apresenta efeito significativo na diminuição da área de feridas cutâneas sugerindo a

utilização como substituto temporário de pele. The polysaccharide extracted from the Bionat 1 microbial consortium showed compatible characteristics for the development of a temporary skin substitute. The results of the cicatrization evaluation showed that the topical use of polysaccharide films extracted from CM Bionat 1 incorporated into the extract of *C. erectus* has a significant effect on the reduction of the area of skin wounds suggesting the use as a temporary substitute for skin.

Keywords: *Conocarpus erectus*. Chromatography. Polymeric film.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Camadas da pele e anexos.....	22
Figura 2 –	Área de manguezal.....	35
Figura 3 –	Estrutura química do ácido elágico.....	38
Figura 4 –	(A) Filmes de polissacarídeo extraído do CM Bionat 1 (R1) e (B) filme de CM Bionatb 1 incorporado com extrato de C. Erectus.....	44
Figura 5 –	Fluxograma do estudo experimental in vivo.....	45
Figura 6 –	Medição inicial da área da ferida cutânea.....	46
Figura 7 –	Grupos de animais (Grupos controles) com soro fisiológico (A) e Curativo de biocelulose (B).....	47
Figura 8 –	Grupos de animais tratados com extrato de C. erectus (C), filme R1 (D) e filme R2 (E).....	48
Figura 9 –	Picos dos compostos fenólicos identificados na cromatografia líquida em alto desempenho.....	50
Figura 10 –	Aspectos macroscópicos das feridas cirúrgicas nos cinco grupos no 10º e 15º dia de pós-operatório.....	52
Figura 11 –	Média da área das feridas.....	54
Figura 12 –	Média da diferença da distância entre os epitélios.....	56
Figura 13 –	Média da diferença da distância entre os epitélios em relação ao tempo.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das feridas.....	26
Tabela 2 – Quantificação do teor de flavonóides (equivalente a quercetina).....	51
Tabela 3 – Area das feridas (mm ²) segundo o grupo e o tempo de pós-operatório.....	53
Tabela 4 – Estatísticas das distâncias das bordas dos epitélios (m) segundo o grupo e o tempo de avaliação.....	55

SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	Microlitros
AE	Ácido elágico
cm^2	Centímetro ao quadrado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EP	Erro padrão
DQF	Departamento de Química Fundamental
DSC	calorimetria de varredura diferencial
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
g	Gramas
h horas cm^{-1} g/	Número de onda gramas por centímetros quadrados
HCL	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia em camada líquida de alta eficiência
HPTLC	Cromatografia em camada fina de alta performance
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
mg/kg	Miligramas por quilo
mg/mL	Miligrama por mililitros
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	Grau celsius
P.A.	Para análise
pH	Potencial hidrogeniônico
R1	Filme à base de Polissacarídeo do complexo microbiano Bionat 1
R2	Filme do complexo microbiano bionat 1 associado ao extrato de <i>C. Erectus</i>
Rf	Índice de retenção
TGA	Análise termogravimétrica

UV-vis	Espectrofotometria de absorção eletrônica na região do ultravioleta visível
μL	Microlitros
Mm	Micrometro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	OBJETIVOS.....	21
1.1.1	Geral.....	21
1.1.2	Específicos.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	PELE.....	22
2.2	FERIDAS CUTÂNEAS.....	25
2.3	CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA E AGENTES AGRAVANTES.....	26
2.4	OS BIOMATERIAIS.....	31
2.5	POLÍMEROS.....	32
2.5.1	Probiótico Kefir e Polissacarídeo.....	33
2.6	MANGUEZAL.....	34
2.6.1	Conocarpus erectus.....	36
2.6.2	Ácido elágico.....	37
2.7	SUBSTITUTOS DE PELE À BASE DE POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DO KEFIR.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	42
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO.....	42
4.3	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO METANÓLICO DE C. <i>ERECTUS</i>	42
4.3.1	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	42
4.3.2	Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE).....	43
4.4	DOSAGEM DE FLAVONOIDES.....	43
4.5	OBTENÇÃO DO FILME E INCORPORAÇÃO DO EXTRATO DE C. <i>ERECTUS</i>	44
4.6	ANÁLISE BIOLÓGICA.....	44
4.6.1	Fluxograma experimental do estudo <i>in vivo</i>.....	44
4.6.2	Animais.....	45
4.6.3	Modelo de excisão das feridas.....	46
4.6.4	Aplicação de solução, extrato e filmes.....	46

4.6.5	Análise morfométrica das feridas cutâneas.....	48
4.6.6	Remoção da cicatriz e análise histomorfométrica.....	48
4.6.7	Análise estatística.....	49
5	RESULTADOS.....	50
5.1	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>C. ERECTUS</i>	50
5.1.1	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	50
5.2	DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES.....	51
5.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE AVALIAÇÃO CLÍNICA DAS FERIDAS CUTÂNEAS.....	51
5.3.1	Avaliação morfométrica.....	51
5.3.2	Análise Histomorfométrica.....	54
6	DISCUSSÃO.....	58
6.1	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>C. ERECTUS</i>	58
6.1.1	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	58
6.1.2	Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE).....	59
6.2	DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES.....	60
6.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE.....	60
6.4	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	62
7	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE MATERIAL BOTANICO.....	73
	ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	74

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, um envoltório relativamente impermeável que atua como barreira seletiva entre o meio externo e o interno, impedindo a entrada de micro-organismos e substâncias nocivas, controlando a perda de água, a movimentação de eletrólitos. Essa barreira cutânea representa o maior sistema de defesa externa que protege o corpo da invasão de patógenos. Por essa razão, a pele é reconhecida como um órgão periférico de defesa do sistema imunológico, sem essa barreira natural, esses agentes patogênicos proliferam e causam diversas infecções (CRUZ; CORDOVIL; BATISTA, 2012; MOTTA et al., 2011; PASSARETTI et al., 2016; SOUZA, 2016).

Quando alguma agressão acomete o tecido cutâneo, faz-se necessário uma rápida intervenção (SILVA et al., 2013), a fim de que se possa garantir a regeneração e recuperação dos tecidos, evitando complicações que podem levar a morte (VACANTI et al., 2007; ONOFRE, 2014). Dentre as injúrias que podem causar lesões à pele têm-se as cutâneas (GOMES, 2016), que caracterizam um dos grandes problemas de saúde pública (DA SILVA OLIVEIRA et al., 2013). Estima-se que em torno de 1.000.000 de pessoas sejam acometidas por algum tipo de lesão a cada ano, das quais 40 mil demandam hospitalização (CRUZ et al., 2012), representando um dos casos mais negligenciados entre os vários tipos de causas externas (PECK; MOLNAR; SWART, 2009).

Dessa forma, tem-se a necessidade de buscar novas estratégias para o tratamento de feridas, a fim de reduzir a carga de cuidados de modo eficiente e econômico. Muitas tentativas já foram desenvolvidas por pesquisadores para promover a regeneração da pele, entretanto, este novo cenário busca avanços em longo prazo, visando desenvolver potencial para criação de vários órgãos vitais e assim, mediar à substituição da técnica tradicional de transplante de órgãos (VACANTI, et al., 2007).

O desenvolvimento de novos dispositivos que possam ser utilizados como curativos para o tratamento de feridas cutâneas tem se tornado um campo de vasta exploração científica. O avanço tecnológico tem estendido as possibilidades terapêuticas com o objetivo de melhorar a qualidade de vida, para isso vários tipos de

curativos têm sido desenvolvidos e aprimorados (MELO; LIMA, 2017; SANTANA, 2015; SOUZA, 2016).

Nas últimas décadas, foram desenvolvidos filmes poliméricos, curativos que podem atuar como substitutos de pele, simulando muitas das funções dos tecidos lesados. A engenharia de tecidos tem se dedicado ao desenvolvimento desses substitutos, visando simular cada vez mais, histológica, fisiológica e morfologicamente a pele humana, porém, devido à complexidade em sua produção e custos elevados, existe um longo caminho a ser percorrido de forma a ultrapassar esses obstáculos (AUGUSTINE et al., 2014; RODRIGUES, 2012).

Substitutos temporários de pele são produzidos por biomateriais, principalmente por biomateriais poliméricos, que atualmente já são utilizados na medicina. Dentre estes biomateriais temos o consórcio microbiano bionat 1, obtido através de processos de fermentação, no entanto, existem poucas informações sobre as características do polissacarídeo como agente formador de filmes (CARNEIRO, 2010; SANTANA, 2015)

Os extratos de plantas incorporados aos filmes poliméricos podem promover a união de propriedades dos compostos aos filmes. Partindo do pressuposto que as plantas constituem uma imensa fonte de compostos fenólicos de imensa atividade biológica e sua utilização, principalmente no tratamento de doenças infecciosas, representa um grande contributo para a descoberta de novos agentes terapêuticos que podem ser utilizados no tratamento de doenças (ONOFRE, 2014; PORFÍRIO et al., 2009).

É necessário considerar ainda que, uma das características dos filmes é sua capacidade de agregarem componentes do meio, como ácidos nucléicos e proteínas (OLIVEIRA, 2016), dessa forma, cogitamos a possibilidade desses filmes incorporarem os compostos que estão presentes nas folhas de *Conocarpus erectus*. Trata-se de um cenário atual, resultante de uma vivência em uma sociedade cada vez mais global, onde os desafios impostos quanto a inovação e eficácia são cada vez maiores (RODRIGUES, 2012).

Contudo, filmes poliméricos a base do CM bionat 1 foram incorporados ao extrato metanólico de folhas de *Conocarpus erectus* e testados em modelos experimentais in vivo, a fim de obter um substituto temporário de pele como alternativa de baixo custo e para uso tópico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Avaliar filmes poliméricos baseados no polissacarídeo do consórcio microbiano Bionat1 com incorporação de extrato metanólico de folhas de *Conocarpus erectus* como uma alternativa de uso tópico para substituto de pele.

1.1.2 Específicos

- Identificar a presença de compostos químicos em extrato de folhas de *Conocarpus erectus*.
- Incorporar o extrato metanólico de folhas de *Conocarpus erectus* aos filmes do polissacarídeo extraído do consórcio microbiano Bionat 1;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *Conocarpus erectus*;
- Realizar caracterização do estudo fitoquímico do extrato de *Conocarpus erectus*;
- Analisar morfometricamente a área da cicatriz e calcular o grau de contração das feridas cutâneas em ratos Wistar tratados com soro fisiológico, curativo de biocelulose, extrato de *C. erectus*, filmes de polissacarídeo do CMBionat1 (R1) e filme de polissacarídeo do CMBionat 1 incorporado com extrato de *C. erectus* (R2);
- Analisar histomorfometricamente a reepitelização das feridas cirúrgicas em ratos Wistar tratados com extrato de *C. erectus*, filmes R1 e R2;
- Descrever aspectos macroscópicos das feridas cutâneas nos grupos de animais submetidos ao soro fisiológico, curativo de biocelulose, extrato de *C. erectus*, filmes R1 e R2.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, um manto de revestimento do organismo que isola os componentes orgânicos do meio externo. Atua como uma interface entre o meio ambiente e o meio interno e possui a importante função de sobrevivência do ser humano. Como vários procedimentos podem levar à quebra desta barreira protetora, é importante o cuidado com esta membrana que representa ao nascimento cerca de 13% da superfície corporal (GOMES, 2016; MORAIS et al., 2013; ROLIM et al., 2010).

O padrão histológico da pele pode ser estabelecido a partir das três camadas que a constituem. Da superfície para camada mais íntima, temos: a epiderme, derme e uma camada subcutânea, a hipoderme (Figura1) na qual realizam as três funções principais: percepção de estímulos e sensações, regulação da temperatura corporal e proteção (BARBOSA, 2011; RIBEIRO, 2014; SANTANA, 2015; SAÚDE, 2012).

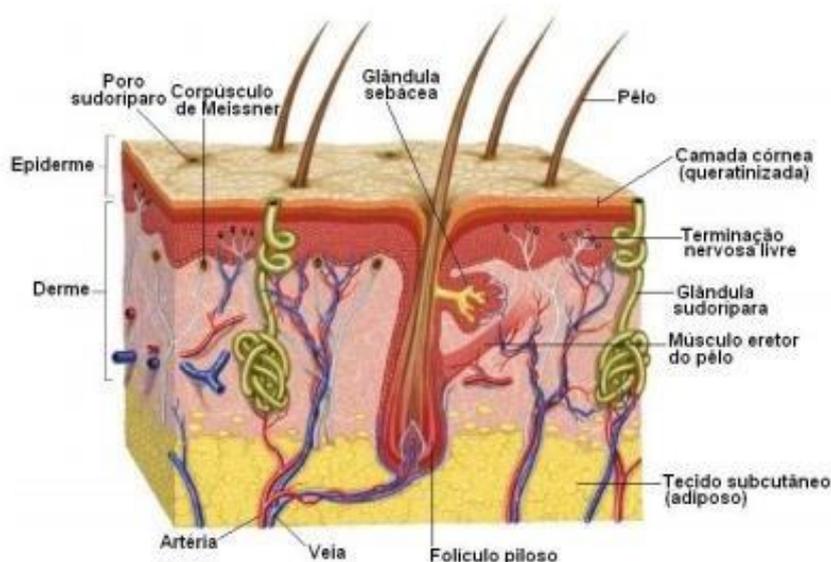


Figura 1. Camadas da pele e anexos
Fonte: (PEREIRA, 2011).

A epiderme é a camada superior da pele e produz uma classe de proteínas chamada de queratina que compõe a parte externa, a maioria das barreiras físicas e a melanina pigmentada para proteção contra radiação ultravioleta (UV) (RATNER et

al., 2004). Ao analisarmos a epiderme de forma macroscópica podemos observar as seguintes camadas:

Camada basal: também denominada de camada germinativa rica em células-tronco. Apresenta intensa atividade mitótica, sendo encarregada de junto com a camada espinhosa (camada superior), pela constante renovação. De modo que, assim que a nova camada de células seja formada, eles substituem a camada já existente, movendo-se para fora e sofrendo mudanças de composição química (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; RIBEIRO, 2014).

Camada Espinhosa: é formada por células cuboides e ligeiramente achatadas, apresenta núcleo central, e citoplasma com feixes de filamentos de queratina. Nesta camada também são encontradas junções caracterizadas de desmossomos, responsáveis pela manutenção da coesão entre as células e resistência ao atrito, desempenhando esse papel juntamente com os filamentos de queratina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Camada granulosa: camada composta de 3 a 5 fileiras de células poligonais achatadas e citoplasma carregado de grânulos basófilos, chamados de grânulos de querato-hialina. Esses grânulos são importantes por contribuir para formação de uma barreira que torna a pele impermeável, evitando a desidratação do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Camada lúcida: camada composta por células achatadas sem núcleo e com a presença de organelas citoplasmáticas. Interior citoplasmático rico em filamentos de queratina, podendo apresentar também junções do tipo desmossomos (GOMES, 2016; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Camada Córnea: de espessura variada, é constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo e citoplasma rico em queratina. É nessa camada que os filamentos de queratina se aglutinam com os grânulos de querato-hialina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A derme está diretamente abaixo da epiderme e corresponde a maior parte da pele, é composta por proteína colágeno com a presença de elastina e glicosaminoglicanos, é o tecido que serve de apoio a epiderme e une a pele ao tecido subcutâneo, possui espessura variável, sendo, por exemplo, mais espessa na planta

dos pés. Sua constituição é dada pela presença de duas camadas de fronteiras pouco distintas, a camada papilar, superficial, e a camada reticular, mais intrínseca (GOMES, 2016; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; METCALFE; FERGUSON, 2007).

A camada papilar é composta por tecido conjuntivo frouxo, que forma as papilas dérmicas. Nesta camada são encontradas as fibrilas de colágeno que contribuem para oclusão da derme na epiderme. Os pequenos vasos sanguíneos nessa camada encontrados são os responsáveis pela nutrição e oxigenação da epiderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A camada reticular é composta por tecido conjuntivo denso, com a presença de fibras elásticas, responsáveis pela elasticidade da pele. Pode-se encontrar ainda estruturas como oriundas da epiderme, assim como, folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A hipoderme localiza-se logo abaixo da derme e dispõe de uma quantidade considerável de tecido adiposo bem vascularizado, auxiliando as propriedades mecânicas e termorreguladoras da pele (METCALFE; FERGUSON, 2007).

Algumas alterações na integridade da pele são conhecidas como lesões cutâneas, úlceras e ou queimaduras e constituem um dos sérios problemas de saúde pública. Ambas as alterações na integridade da pele representam um grande problema de saúde pública brasileira, pois, além de causar um grande número de mortes ao longo dos anos acarretam em sequelas físicas e psicológicas (CAMUCI et al., 2014; PAOLILLO et al., 2014).

As três camadas acima descritas exercem um importante papel na proteção do corpo e de qualquer dano mecânico, como ferimento. Após sofrer uma dessas lesões a pele fica comprometida exigindo do organismo o desencadear de um mecanismo de cicatrização para reestabelecer a estrutura e funções do órgão (METCALFE; FERGUSON, 2007; RIBEIRO, 2014).

2.2 FERIDAS CUTÂNEAS

Segundo os estudos de Rocha (2014), ferida é o estado de pele caracterizado pela interrupção de sua integridade, as lesões, são o resultado não especificado de um fator externo sobre o organismo. Existe uma confusão acerca de tais conceitos, alguns acreditam que são sinônimos, outros acreditam no contrário (LOPES, 2004; ROCHA, 2014).

Dentro do espectro das chamadas feridas complexas, temos as úlceras por pressão, que são definidas como uma lesão localizada, acometendo a pele e/ou tecidos subjacentes, frequentemente sobre uma proeminência óssea, resultante de pressão, ou pressão associada a cisalhamento e/ou fricção (“NPUAP - The National Pressure Ulcer Advisory Panel”, 2007).

A reepitelização resulta de sucessivas reações anabólicas e catabólicas que possui leucócitos como um dos protagonistas mais importantes. A avaliação de feridas é fundamental para a administração de um tratamento adequado, visto que envolve desde a etiologia até as características do leito da lesão, área circundante, e demais doenças pelas quais o paciente possui (ROCHA, 2014).

Considerando que feridas são rupturas da estrutura e funcionamento da organização anatômica normal, classificá-las se mostra relevante, quando se leva em conta a necessidade de sistematizar o cuidado com estas. Além disso, ao explanarmos a terapêutica de feridas é de grande importância que os profissionais envolvidos neste processo tenham embasamento sobre os eventos complexos que permeiam os eventos fisiológicos da cicatrização. É importante salientar ainda, que registros sobre os atendimentos aos portadores de feridas são instáveis, o que dificulta a descoberta do verdadeiro perfil deste problema (ROCHA, 2014).

A avaliação das feridas define uma parte fundamental do processo de tratamento das lesões cutâneas, pois só o diagnóstico preciso do tipo e estágio da lesão vai possibilitar a decisão correta sobre as medidas a serem administradas e os recursos a serem utilizados (COSTA, 2014). O intuito dessa avaliação de feridas é a identificação de um bom plano de cuidados, a quantificação e monitorização da eficiência das diversas modalidades de tratamento, e o estabelecimento de uma previsão satisfatória da taxa de cicatrização (MANDELBAUM; PAMPADO DI SANTIS;

SANT'ANA MANDELBAUM, 2003).

Pensando nesses aspectos faz-se necessário classificar as feridas com o intuito de estabelecer um tratamento adequado aos pacientes e elucidar a necessidade de sistematizar o cuidado com estas (ROCHA, 2014).

De acordo com o Manual de Orientações aos profissionais da saúde (2011), as feridas podem ser classificadas quanto à causa, a constituição do conteúdo microbiano, ao tipo de cicatrização, ao grau de abertura e ao tempo de duração (Tabela 1).

 CLASSIFICAÇÃO DAS FERIDAS

Quanto as Causas	<p>Cirúrgicas: quando provocadas intencionalmente;</p> <p>Incisão: quando não ocorre perda de tecido e as extremidades (bordas) geralmente fechadas por sutura;</p> <p>Excisão: quando se verifica remoção de uma área de pele;</p> <p>Punção: quando se origina de procedimentos terapêuticos diagnósticos (por exemplo, cateterismo cardíaca ou biópsia);</p> <p>Traumáticas: quando provocadas acidentalmente; Mecânico: quando há contenção, perfuração ou corte;</p> <p>Químico: causado por iodo, cosméticos, ácido sulfúrico e dentre outros;</p> <p>Físico: Propiciado por frio, calor ou radiação.</p>
Quanto ao conteúdo antimicrobiano	<p>Limpas, feridas em condições assépticas, sem a presença de microorganismos; Limpas contaminadas, feridas que apresentam tempo inferior a 6 horas, em relação ao trauma e o atendimento, sem contaminação satisfatória; Contaminadas: as, feridas ocorridas com tempo superior a 6 horas entre o trauma e o atendimento, sem apresentar sinal de infecção;</p> <p>Infectadas: feridas apresentando agente infeccioso no local e com sinal de intensa reação inflamatória e destruição de tecidos, podendo apresentar pus.</p>
Quanto ao tipo de cicatrização	<p>De primeira intenção, quando a região acometida é fechada cirurgicamente com condições de assepsia e sutura das bordas; nestas não ocorre perda de tecidos e as bordas da pele e/ou seus constituintes ficam justapostos;</p> <p>De segunda intenção, quando há perda de tecidos e as bordas da pele ficam distantes; nelas a cicatrização ocorre lentamente quando comparadas as feridas cicatrizadas por primeira intenção;</p> <p>De terceira intenção, quando as feridas são corrigidas cirurgicamente após a formação do tecido de granulação, ou para controle infecções, com o intuito de que apresentem resultados mais satisfatórios, tanto funcionais quanto estéticos.</p>
Quanto ao grau de abertura	<p>Abertas, caracterizadas por feridas em que as bordas da pele encontram-se afastadas;</p> <p>Fechadas, definidas por feridas em que as bordas da pele estão justapostas.</p>

Tempo de duração	Agudas: quando são ferimentos recentes; Crônicas: quando as feridas possuem um tempo de cicatrização maior que o imaginado devido a sua etiologia, havendo um retardo em seu processo cicatricial.
------------------	---

Tabela 1. Classificação das feridas.

Fonte: Santos, et al., (2011), adaptado

Conforme os levantamentos de Rocha (2014, p. 16 apud Souza et al., 2009, p. 318) outras lesões de pele também são frequentes em UTIs, um exemplo disso são as úlceras por Pressão (UPPs) que mesmo apesar das condutas preventivas exercidas pela enfermagem, por muitas vezes são inevitáveis devido à influência exercida por fatores inerentes ao comprometimento nutricional desses pacientes (SOUZA et al., 2009).

Mesmo sabendo que o reparo tecidual caracteriza uma evolução natural do organismo, sabe-se que os processos de reepitelização podem incluir tempo e diferentes alternativas medicamentosas e cirúrgicas, dependendo da etiologia e das características da ferida. Isto por que esses processos envolvem a interação complexa de vários tipos celulares, como citocinas, mediadores e da matriz extracelular (ECM), fazendo com que as respostas vasculares, a atividade celular, e quimiotática, e a liberação de mediadores químicos no tecido afetado sejam combinadas, visando uma maior velocidade de regeneração dos tecidos lesados (CARVALHO et al., 2006; PETROIANU et al., 2001).

2.3 CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA E AGENTES AGRAVANTES

As tentativas de intervir no processo de cicatrização de feridas, sejam acidentais ou intencionais, surgiram desde à antiguidade, demonstrando que desde então já se pressupunha à importância de protegê-las de forma a driblar complicações que pudessem repercutir em danos locais ou gerais dos pacientes acometidos (SECRETARIA DE SAÚDE DE FLORIANÓPOLIS, 2008).

Embora o reparo tecidual caracterize uma evolução do próprio organismo para resolução de feridas, cuidados especiais para a cura adequada fazem-se indispensáveis. Considerando que a cicatrização de feridas é um processo dinâmico

que compreende: fase inicial ou inflamatória, fase proliferativa ou de fibroplasia e por último a fase de remodelação ou maturação; seguindo sequência conservada de eventos que se sobrepõem no tempo e incluem inflamação, proliferação e remodelação tecidual (MANDELBAUM; PAMPADO DI SANTIS; SANT'ANA MANDELBAUM, 2003; PETROIANU et al., 2001).

Mediante a isso, faz-se necessário ter o conhecimento a respeito desses processos, para que se possa intervir no mesmo, auxiliar e acelerar a cicatrização, além de promover homeostasia do organismo e o bem-estar do paciente (DE OLIVEIRA; DA CUNHA DIAS, 2012).

Ao explorarmos o assunto “terapêutica de feridas” é de grande importância que se tenha conhecimento sobre as fases complexas da cicatrização descritas abaixo:

Fase Inicial ou Inflamatória

Nessa fase ocorrem alterações nas junções e/ou nas células endoteliais, podendo ocorrer a ruptura de vasos sanguíneos e hemorragia. Logo que a injúria é apresentada, ocorre vasoconstrição como decorrência de descargas adrenérgicas por ação de células nervosas, tamponamento da lesão e agregação plaquetária. As plaquetas são as primeiras a chegar à área acometida. A fase inflamatória é definida pelo aparecimento de sinais típicos no processo inflamatório localizado, ou seja, dor, calor, rubor, edema e perda da função local. Nesta fase a área acometida é reconhecida por grande quantidade de tecido desvitalizado, em virtude das chances de contaminação bacteriana (BRINGEL, 2011; CAMARGO, 2011; NITSCHKE, 2010; ROCHA, 2014; SANTOS; SILVA, 2011).

Fase proliferativa ou de regeneração

Considerada a segunda etapa do processo cicatricial, possui a duração de cerca de três semanas, é responsável pelo fechamento da lesão, onde a mitose celular é atividade que predomina. De acordo com as respostas agudas de hemostasia e inflamação, inicia-se o reparo da ferida através de angiogênese, fibroplasia e epitelização. Nessa fase acontece a formação do tecido granuloso, que consiste de leito capilar, fibroblasto, macrófagos, colágenos, fibronectina e ácido hialurônico

(CAMARGO, 2011; NITSCHKE, 2010; SANTOS; SILVA, 2011).

A angiogênese é definida como o processo de desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, fundamentais para suportar o ambiente de cicatrização da ferida. Já os fibroblastos são células especializadas que se diferenciam a partir das células mesenquimais em repouso no tecido conjuntivo, e que não alcançam o local acometido por diapedese das células circulantes (SANTOS et al., 2011).

Fase de maturação ou remodelação tecidual

Na última fase da cicatrização é iniciado o processo de “remodelação” da ferida, com equilíbrio entre síntese e degradação de colágeno, dura meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição da área total da cicatriz e do eritema. A contração da ferida surge por movimento centrípeto em toda a espessura ao redor da pele, reduzindo a quantidade de cicatriz desorganizada. A retração da ferida é proveniente do processo de contração da ferida, em contraste, é uma constrição física ou limitação da função. Essas retrações ocorrem quando a excessiva cicatriz ultrapassa a contração da ferida normal, o que resulta em uma inutilidade funcional (DE OLIVEIRA; DA CUNHA DIAS, 2012; NITSCHKE, 2010; SANTOS; SILVA, 2011).

Assim como foi mencionado acima, danos de qualquer natureza (física, química ou biológica) provocam uma série de eventos que de forma simples traduzem-se como rubor, tumor, calor e dor. Estes sinais resultam de ativação de células nervosas, estromais, vasculares e circulatórias seja por estímulos físicos ou por sinalização química desenvolvida por estrutura das células rompidas, fragmentos dos elementos inertes dos tecidos, como colágenos, a elastinas, fibronectinas, proteínas séricas que extravasam dos vasos rompidos e por atividade de mediadores inflamatórios, liberados por plaquetas, mastócitos e terminações nervosas periféricas. Estas moléculas ao se ligarem a receptores dispostos na superfície da membrana celular local, desencadeiam profundas modificações no seu metabolismo, na expressão de seus genes e por consequência em seu fenótipo (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; CONTRAN, R S.; KUMAR, V.; COLLINS, 2001).

Em virtude do próprio trauma ou ativação celular, o microambiente tem sua

composição físico- química modificada, ou seja, baixa tensão de O₂, diminuição de pH, presença de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, fazendo desta também uma outra forma de sinalização que ativa as células envolvidas no reparo tissular (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

No tratamento de lesões cutâneas, principalmente aquelas que denotam dificuldades de cicatrização, os efeitos colaterais e a resistência aos medicamentos se tornou um grande desafio para ao campo clínico. Frente às limitações da terapêutica tradicional para a descontaminação de feridas e reparo tecidual, a utilização de novas tecnologias podem representar um método alternativo de tratamento (PAOLILLO et al., 2014). Entre esses métodos alternativos pode-se empregar os biomateriais para otimizar a reabilitação de lesões (PAOLILLO et al., 2014; SANTOS, 2009).

2.4 OS BIOMATERIAIS

O termo biomaterial vem sendo definido de diferentes formas ao longo dos últimos anos. Na primeira Conferência de Consenso da Sociedade Europeia de Biomateriais (ESB) em 1976, um "biomaterial" foi definido como "um material não viável utilizado em um dispositivo médico, proposto a interagir com sistemas biológicos (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Pires, Bierhalz e Moraes (2015) conceituam biomateriais como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos, com aplicações diagnósticas, vacinas, cirúrgicas ou terapêuticas, permitindo ser constituídos de compostos de origem natural ou sintética, assim como de materiais naturais modificados, seja em forma sólida quanto em géis, pastas e líquidos, não sendo necessariamente fabricados como válvulas cardíacas de porcos e retalhos de pele humana preparados para implantes.

Entretanto, a nova definição da ESB traz o seguinte conceito "material destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo". Esta modificação sutil na definição é indicativa de como o campo dos biomateriais progrediram. Os biomateriais passaram de apenas interagir com o corpo para influenciar os processos biológicos em direção ao objetivo da regeneração tecidual (O'BRIEN, 2011).

Mello (2004) relata que um dos problemas em se trabalhar com os biomateriais tem sido o estudo da biocompatibilidade dos materiais empregados, ou seja, a tolerância do organismo na presença de um corpo estranho no seu interior, assim como, sua toxicidade. Sendo a compatibilidade o quesito mais importante de um biomaterial e um assunto já discutido há cerca de 50 anos. Os protótipos que envolvem materiais são respostas das duas fases do complexo biomaterial-tecido e uma interface do fenômeno que entra em ação quando se estabelece o contato. Provavelmente, o fato mais importante é o mecanismo pelo qual os materiais e os tecidos interagem (MELLO, 2004; PINHO, 2016; WILLIAMS, 2014).

Biomateriais apresentam a vantagem de ser bastante análogos a macromoléculas presentes no ambiente biológico, estando preparado para reconhecer e lidar metabolicamente. Desta forma, problemas relacionados à citotoxicidade são evitados. Esses materiais são associados a dispositivos médicos, especialmente em implantes internos ou externos de forma permanente ou temporária. Quanto à sua composição química, os biomateriais podem ser classificados em metais, cerâmicos, compósitos e polímeros (GOMES et al., 2016; ONOFRE, 2014; PINHO, 2016).

Para a utilização de Biomateriais como substitutos cutâneos, a classe comumente mais utilizada tem sido a dos materiais poliméricos (ONOFRE, 2014).

2.5 POLÍMEROS

Os polímeros são compostos químicos constituídos por macromoléculas resultantes da união de pequenas unidades estruturais, formadas por uma repetição de um grupo de átomos (ADRIÃO, 2011). Usualmente, há três grupos individuais de biomateriais, denominados, cerâmicas, polímeros sintéticos, geralmente derivados do Petróleo e polímeros naturais, ambos utilizados na engenharia de tecidos (O'BRIEN, 2011). Cada um desses grupos de biomateriais individuais apresentam vantagens específicas e, desnecessário salientar, desvantagens, de maneira que a utilização de andaimes compostos constituídos por diferentes fases está se tornando cada vez mais rotineiro. Diferente dos materiais sintéticos baseados em polímeros, os polímeros naturais são biologicamente ativos e promovem uma satisfatória adesão celular e crescimento, além de serem biodegradáveis, estas características propiciam sua

utilização como biomateriais (O'BRIEN, 2011; ONOFRE, 2014).

Dentre os polímeros provenientes de processos fermentativos temos o CM bionat 1, um polissacarídeo oriundo de uma associação microbiana denominada kefir (CARNEIRO, 2010). Nos últimos tempos têm sido utilizado um polímero semelhante ao nosso como base para produção de substitutos temporários de pele, o polissacarídeo extraído do probiótico kefir e suas características são descritas a seguir.

2.5.1 Probiótico Kefir e Polissacarídeo

O Ministério da Agricultura e Pecuária define kefir como um “produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por cultivos ácido- lácticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono, o qual é formado por cultura mista de bactérias ácido lácticas, bactérias acéticas e leveduras. Os grãos de Kefir que fazem a bebida que leva o mesmo nome, trata-se de pequenos grânulos de forma irregular ricos em microrganismos que vivem em simbiose em uma matriz de polissacarídeos (ANTONIASSI; MARTINS; QUEIROZ-FERNANDES, 2017; BRASIL, 2007; PRADO, 2014).

Na literatura são relatados vários efeitos benéficos do kefir para a saúde humana (FIORDA et al., 2017; RODRIGUES, 2016). Recentemente, um aumento no consumo de kefir foi relatado devido a suas propriedades sensoriais específicas, juntamente com os benefícios para a saúde associados a seu consumo.

O polissacarídeo extraído do probiótico kefir é um dos polímeros obtidos pelos processos de fermentação. O termo probiótico foi concedido por R. Fuller em 1989 sendo definido por uma comissão especializada conjunta FAO/WHO como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades pertinente, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (ARAYA et al., 2002; CARNEIRO, 2010).

Polissacarídeos são polímeros provenientes de carboidratos que podem ser formados de um tipo único de monossacarídeos ou de diversos tipos. Estas macromoléculas são solúveis em água, onde exercem um importante papel como

espessante, gelificante, emulsificante e hidratante (MARGUERITE, 2008). O seu desenvolvimento promove uma grande área de aplicações, aproveitando suas propriedades específicas, como, biodegradabilidade e atividade biológicas de alguns deles. Geralmente os polímeros naturais são inertes, não tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis, de baixo, não causam danos ao meio ambiente e são encontrados em exuberância na natureza. Essas características promovem ótimas condições de aplicabilidade variada na indústria, principalmente na área alimentícia e farmacêutica (MARGUERITE, 2008; PRAJAPATI et al., 2014; VASCONCELOS; ARAÚJO; SANTANA, 2015).

Marguerite, (2008) relata que os polissacarídeos são importantes por serem solúveis em água e assim desempenhar papel importante como o espessamento, gelificação, emulsão, hidratação e suspensão de polímeros. Além do mais, as atividades biológicas desempenhadas pelos polissacarídeos são cada vez mais reconhecidas nas aplicações humanas (MARGUERITE, 2008).

Nos últimos anos, houve um crescimento estimado na pesquisa, caracterização e desenvolvimento de polímeros para engenharia biomédica, microeletrônica e outras aplicações tecnológicas avançadas (BUCIO; BURILLO, 2007). No entanto, há pouca informação sobre as características do polissacarídeo extraído de kefir como agente formador de filmes. Novas pesquisas trazem o objetivo de compreender as mudanças que ocorrem nos biopolímeros e determinar sua composição e relação com outros biopolímeros e plastificantes (BUCIO; BURILLO, 2007; PIERMARIA et al., 2011).

2.6 MANGUEZAL

Os manguezais são ecossistemas costeiros restritos a regiões tropicais e subtropicais, geralmente são encontrados em estuários, lagunas e planícies de marés, na transição entre os ambientes terrestres e marinhos. Estes ecossistemas apresentam uma grande importância social, econômica e ambiental, por dispor de uma rica estrutura peculiar que acomoda uma grande variedade de plantas, animais e micro-organismos, além de servir como berçário para diversas espécies de seres vivos, que localizam nesse ambiente condições ideais de reprodução. As estruturas dessas plantas dispõem de uma série de fisionomias vegetais resistentes ao fluxo das

marés, possuindo árvores de diferentes espécies arbustivas, desenvolvidas em bancos de lama e de sal, pântanos salinos. Portanto, é considerado mundialmente um dos ecossistemas mais produtivos, sendo muito explorado para o desenvolvimento de medicamentos tradicionais (ARAÚJO, 2015; BUSSMANN et al., 2011; QUERINO; MOURA, 2013).

No que concerne a importância dos manguezais, o ministério do Meio Ambiente (2009) destaca, que o Manguezal são “ecossistemas-chave” devido a sua riqueza em recursos naturais e aos serviços ambientais que oferecem. Servem de abrigo para uma grande diversidade e abundância de organismos, como, artrópodes, moluscos, peixes, aves e micro-organismos, totalizando cerca de 800 espécies.



Figura 2. Área de manguezal.

Fonte: Ministério do Meio Ambiente Foto: disponível em <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-aquatica/zona-costeira-e-marinha/manguezais>

Nos últimos tempos, tem sido presenciado um crescente interesse pelo uso de plantas medicinais e dos seus respectivos extratos na terapêutica, resultando, em certas circunstâncias, um grande contributo nos cuidados primários de saúde e um complemento terapêutico, compatível com a medicina tradicional. Uma boa parte dessas plantas são utilizadas desde a sociedade primitiva em análise ao

conhecimento popular, observando a carência de conhecimento científico de seus atributos farmacológicos e toxicológicos, sendo muito utilizada no tratamento de doenças e representando uma fonte natural e rica de biomoléculas disponível na natureza (FIRMO et al., 2011).

De acordo com o mapeamento realizado pelo Ministério do Meio Ambiente (2009), os manguezais abrangem por volta de 1.225.444 hectares em quase todo o litoral brasileiro, desde o Oiapoque, no Amapá, até a Laguna em Santa Catarina, sendo composto por zonas de elevada produtividade biológica, haja vista, que acolhem representantes de todos os elos da cadeia alimentar.

O Brasil dispõe de grandes áreas de manguezais ao longo de sua região costeira, da foz do Rio Oiapoque, no estado do Amapá, até as divisas de Laguna, no estado de Santa Catarina, onde alcançam cerca de 10 mil a 25 mil km², o que representa cerca de 6 a 15% dos manguezais no mundo. Dentre as espécies de manguezais temos *Conocarpus erectus*, crescente sobre linhas costeiras nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2009; BAILY, 1976).

2.6.1 *Conocarpus erectus*

De acordo com os estudos de Martins et al., (2006) o Brasil dispõe de enorme flora riquíssima em matéria prima que tem manifestado o interesse de pesquisadores de várias Universidades e instituições dedicadas a fitoterapia.

C. erectus (Combretaceae), conhecido popularmente como mangue de botão, é uma árvore de 6 m de altura com casca de cor cinza ou marrom é uma das espécies mais encontradas nos manguezais e muito utilizada na medicina popular no tratamento de anemia, catarro, conjuntivite, diabetes, diarreia, febre, gonorréia, dor de cabeça, hemorragia, orquite, brotoeja, inchaços e sífilis, todavia, estudos sobre seus benefícios são pouco explorados cientificamente.

C. erectus é a espécie que habita a porção mais alta do perfil de maré, sendo encontrada na fração mais arenosa e topograficamente mais elevada do leito do rio e seu tronco atinge um diâmetro de 30 centímetros e possui forma de “V”, razão pela

qual o faz ser utilizado na fabricação de pequenas embarcações desenvolvidas pela comunidade ribeirinha (MAIA et al., 2005; SANTANA et al., 2013).

A utilização de produtos naturais, para fins medicinais define uma realidade desde os primórdios da civilização. Em decorrência desse uso crescente de plantas com aplicação medicinal, é importante e necessário explorar seus constituintes, seu mecanismo de ação terapêutica e identificar seus princípios ativos responsáveis pelas diversas atividades biológicas. Além do mais, um estudo preciso sobre plantas empregadas nas tradições locais de saúde, bem como sua avaliação farmacológica e parentes taxonômicos podem ser oportuno para o desenvolvimento de drogas responsáveis pela cura de diversas doenças (FIRMO et al., 2011; LANA et al., 2012; SHIRZAD; TAJI; RAFIEIAN-KOPAEI, 2011).

Os representantes da família Combretaceae apresentam hábito lenhoso; tricomas lepidotos distintos nas porções vegetativas e reprodutivas; folhas simples, inteiras; flores tetrâmeras ou pentâmeras, sésseis ou subsésseis, ovário ínfero, unilocular com (1)2–8(20) óvulos dispostos de placentação apical e frutos indeiscentes, com presença de uma semente. Essas plantas lenhosas se desenvolvem em semelhança a florestas e crescem melhor onde energia, baixa onda e abrigo permitem a deposição de sedimentos finos e estabelecimento consecutivo de propágulos de manguezal (NETO; CORDEIRO; LOIOLA, 2014; PERILLO et al., 2009).

Conocarpus erectus encontra-se incluso em linhas costeiras nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, dispõe de propriedades antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, e hepatoprotetora em suas diferentes partes, folhas, caules, frutos e flores. Na medicina popular, demonstrou ser adstringente, hemostático e eficaz na prevenção da anemia, infecções catarrais, conjuntivite, diabetes, diarreia, febre, gonorreia, dor de cabeça, hemorragia, orquite, brotoeja, inchaços e sífilis. Estudos fitoquímicos (ABDEL- HAMMED et al., 2012) de diferentes extratos de folhas de *C. erectus* indicaram a presença de flavonóides, taninos, triterpenos e saponinas em seus extratos (ABDEL-HAMEED; BAZAID; SABRA, 2013; ABDEL-HAMMED et al., 2012; BAILY, 1976).

2.6.2 Ácido elágico

O ácido elágico (AE) (2,3,7,8-tetrahidroxi-cromeno[5,4,3-cde]-cromeno5,10-

diona, H4EA) é um composto fenólico de ocorrência natural próprio do grupo dos elagitaninos (ET), que por sua vez pertencem ao grupo de taninos hidrolisáveis dos polifenóis (JORDÃO, 2016; VATTEM; SHETTY, 2005).

Elagitaninos são ésteres de glicose com ácido elágico que, quando hidrolisados (hidrólise ácida ou básica), concedem o ácido hexahidroxi-difênico, que se reordena espontaneamente em AE. Esse composto pode ser identificado em vegetais em sua forma livre, ou na forma de elagitaninos que são componentes estruturais da parede celular vegetal, e na membrana celular (JORDÃO, 2016).

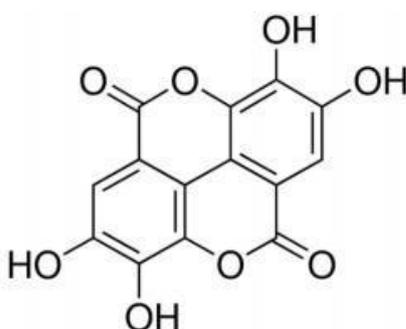


Figura 3. Estrutura química do ácido elágico
Fonte: Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com)

Fitoquímicos fenólicos como o ácido elágico são constituintes importantes de frutas e vegetais e são parcialmente responsáveis por efeitos benéficos sobre doenças crônicas associadas à oxidação, como o câncer e doenças vasculares. No que diz respeito ao funcionamento deste composto, acredita-se que eles funcionam por meio de contração dos efeitos negativos do estresse oxidativo, se comportando como um antioxidante, ativando ou induzindo grupos de enzimas antioxidantes celulares. É nítido que estudos ainda são poucos sobre estes assuntos, ocorrendo limitações quanto as funções mais abrangentes relacionadas aos antioxidantes dos fitoquímicos e sobre o conhecimento a respeito de seus efeitos benéficos direcionado aos sistemas biológicos (VATTEM; SHETTY, 2005).

Muitas das propriedades do ácido elágico já são descritas na literatura. Falsaperla et al., (2005) relata que o ácido elágico é encontrado em diversas espécies de plantas com flores e este antioxidante determina a apoptose, regulação negativa do IGF-II, ativa a p21 (waf1 / Cip1), auxilia o efeito cumulativo na fase de transição G1/S e evita a destruição do gene p-53 pelas células cancerígena. Em estudos

posteriores Ylmaz e Usta (2013) demonstraram que a ação do AE promove também o vaso-relaxamento em artérias isoladas de ratos. As atividades aqui relatadas fazem deste composto um agente promissor no combate a doenças crônicas (JORDÃO, 2016).

Pesquisas sobre a utilização de agentes antioxidantes naturais tem repercutido muito nas últimas décadas por demonstrar sua importância no que diz respeito ao seu potencial de conservação e à baixa toxicidade ao organismo. Pode-se destacar ainda que os compostos fenólicos no qual o AE está inserido distribuem-se de forma abrangente pelo reino vegetal e seu poder antioxidante anteriormente descrito é desencadeado devido a sua capacidade de neutralizar e sequestrar radicais livres (ACHKAR et al., 2013).

Nesse contexto, a incorporação do extrato metanólico de *C. erectus* pode adicionar aos filmes propriedades dos compostos fenólicos ali presentes, sendo estes capazes de auxiliar no processo de regeneração tecidual.

2.7 SUBSTITUTOS DE PELE À BASE DE POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DO KEFIR

Nos dias atuais a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa, campos emergentes da sociedade, têm contribuído para o avanço no tratamento de muitas doenças. No Brasil, as feridas representam um sério problema de saúde pública, correspondente ao grande número de pacientes com alterações na integridade da pele. O tratamento de feridas nos últimos tempos têm sido palco de imensurável progresso, abordagem e sobretudo novos materiais (RODRIGUES, 2012; SANTOS et al., 2014).

Frente a necessidade de se desenvolver novos métodos que viabilizem o processo de regeneração tecidual, surge a ideia de aderir as propriedades das folhas de *C. erectus* aos filmes a base CM bionat 1.

Ultimamente têm sido desenvolvidos biomateriais poliméricos que podem atuar como substitutos inteligentes de pele, desempenhando muitas das funções do tegumento. Estudos nesta área têm possibilitado a utilização de materiais biossintéticos e de engenharia de tecidos para o avanço de substitutos de pele. Os

filmes desenvolvidos a partir de polímeros naturais surgem como uma alternativa para a utilização como um substituto temporário de pele, por apresentar características desejáveis (AUGUSTINE et al., 2014; GOMES, 2016).

A incorporação de extratos de plantas, com potencial ação antimicrobiana e cicatrizante também já faz parte da realidade (GOMES, 2016), pois promovem a união de propriedades inerentes aos filmes poliméricos (ONOFRE, 2014). *Conocarpus erectus* representa uma alternativa para utilização na incorporação de filmes por possuir atividades antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, e hepatoprotetora em suas diferentes partes, folhas, caules, frutos e flores e ser muito utilizada na medicina popular. (ABDEL-HAMEED; BAZAID; SABRA, 2013; ABDEL-HAMMED et al., 2012; GOMES, 2016; ONOFRE, 2014).

Ao longo de séculos o tratamento de feridas variou com o objetivo de resultados cicatriciais mais satisfatórios em tempo recorde. Segundo Smaniotto et al, (2010), há no mercado mundial diversas alternativas de materiais que podem ser utilizados nas etapas do tratamento de feridas, tais como: na higienização, no desbridamento, para diminuição da população bacteriana, para controle do exsudato e como estímulo à granulação. Dentre os métodos clínicos mais frequentemente utilizados destacam-se os curativos (BLANES, 2004; SMANIOTTO; CARVALHO; FERREIRA, 2010). O Portal Educação (2016) relata que os principais fatores a serem considerados na escolha do curativo adequado são: os recursos financeiros do paciente e/ou da unidade de saúde, a necessidade de continuidade da utilização do curativo, incluindo com visitas domiciliares. O portal relata ainda que a avaliação de benefícios e custos são aspectos a serem considerados no momento da decisão do tipo de curativo, que devem ser adequados à natureza, à localização e a área da ferida. Embora exista inúmeros tipos de curativos, um só tipo não estabelece os requisitos para ser aplicado em todos os tipos de feridas cutâneas.

De acordo com Smaniotto et al. (2010), surgiram curativos constituídos por princípios ativos, estes dispõem de ação tópica local às composições químicas que carregam em suas fórmulas. Os substitutos à base de princípios ativos estabelecem destaque frequentemente no desbridamento e no controle da população bacteriana durante a organização do leito de uma ferida. Mesmo com a grande variedade de curativos existentes, e a pressão da indústria farmacêutica para ocupar espaço no mercado, ainda não se têm curativos ideais (SMANIOTTO; CARVALHO; FERREIRA,

2010).

A partir dessa necessidade surgem os substitutos de pele, que podem ser utilizados isoladamente ou como parte de um sistema complexo relacionado aos componentes dos sistemas vivos, em qualquer procedimento terapêutico, em medicina humana ou veterinária (ADRIÃO, 2011).

Pupp (2005) elenca que para que os substitutos de pele possam ser utilizados os mesmos precisam dispor de critérios específicos para substituir as diversas funções da pele humana (SANTOS et al., 2014). Halim (2010) destaca, como ideais as seguintes características:

- Capacidade de resistir à infecção;
- Capacidade de evitar a perda de água;
- Capacidade de suportar as forças de cisalhamento;
- Ser economicamente viáveis;
- Amplamente disponível;
- Possuir longa vida útil e fácil de armazenar;
- Falta de antigenicidade;
- Ser flexível em espessura;
- Durável com a estabilidade da ferida a longo prazo;
- Ser conformado com superfícies de feridas irregulares;
- Fácil de ser protegido e aplicado.

Até o momento não se tem um substituto de pele ideal que preencha todos os requisitos acima mencionados, entretanto, a engenharia de tecidos e a biotecnologia estão orientadas para desenvolver tais características. Compete aos profissionais da saúde fazer a melhor escolha, considerando sempre o quadro sistêmico que o paciente está envolvido no tratamento de feridas (HALIM; KHOO; YUSSOF, 2010; SMANIOTTO; CARVALHO; FERREIRA, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *C. erectus* (Combretaceae) foram coletadas em estágio adulto na floração no mês de abril de 2016, no manguezal da cidade de Itamaracá, distrito de Vila Velha, estado de Pernambuco - Brasil com 7 ° 40 'de latitude sul e 34 ° 50' de longitude oeste, sendo folhas verdes selecionadas, aparência vistosa, visualmente intacta, livre de danos mecânicos, pragas, doenças ou cor alterada. Um exemplo de voucher foi identificado por Marlene Barbosa e depositado no Herbário da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob UFP número 69.655. A coleção foi autorizada pela empresa Pernambuco para Controle de Poluição Ambiental e Administração de Recursos Hídricos sob autorização CA DFRB N. 120/2014.

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO

O extrato metanólico de *C. erectus* foi preparado no Instituto Nacional do semiárido - INSA, em Campina Grande, Paraíba, Brasil. Folhas frescas de *C. erectus* (2 kg) foram moídas em uma Pulverisette 14 (Fritsch). O extrato foi produzido através de extração de solvente acelerado (ASE 350, Thermo Scientific) usando células de extração de aço inoxidável de 100 mL. Trinta gramas de material vegetal moído foram preenchidos em uma célula e extraídos a 40 ° C e aproximadamente 100 bar com 100 mL de metanol (P.A.). O processo foi repetido 19 vezes para obter um total de 7,6 L de extrato. O extrato foi concentrado sob pressão reduzida a 40 ° C (Genevac Rocket TM (Genevac), aplicando o programa predefinido para solventes com baixo ponto de ebulição. O extrato concentrado foi dividido com metanol na proporção de 1: 1, v / v.

3.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO METANÓLICO DE *C. ERECTUS*

3.3.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O extrato foi analisado por CLAE (1200 Infinity Series, Agilent) equipado com bomba de quarentena, amostrador automático, forno de coluna e detector de matriz de diodos. A separação foi realizada em uma coluna RP 18 (Zorbax SB-C18, Agilent,

4,6x250mm, 5µm). A amostra (5 µL) foi submetida ao seguinte gradiente linear a uma taxa de fluxo de 2,4 mL / min e 30 °C (A: 0,3% de ácido acético em água, B: acetonitrilo): 98% A (0min) -90% A (10 min) - 15% A (27 min).

3.3.2 Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE)

A Cromatografia em camada delgada é um tipo de cromatografia de adsorção, onde se faz passar lentamente por meio de uma coluna de material adsorvente uma mistura líquida, onde seus componentes vão se depositando em diferentes zonas da coluna, pois as separações ocorrem com base nas diferenças de velocidade de arrastamento de cada um, isto é na velocidade de migração (ZUCULA, 2013).

Módulos CAMAG HPTLC consistindo em um TLC Sampler 4 automático, automática câmara de desenvolvimento ADC2 e software integrado WINCATS (versão 1.4.46337) foram utilizados para a análise do extrato de *C. erectus* em diferentes amostras. A fase estacionária foi a placa de vidro de gel de sílica pré-revestida 60F254 (10 cm x 10 cm) comprada de E. Merck (Darmstadt, Alemanha). O extrato de *C. erectus* foi carregado no prato a 9,5 mm Bandas largas com distância de 8 mm da parte inferior e 20 mm do lado, e o espaço entre dois pontos foi de 12 mm, com taxa de aplicação constante de 150 nL / s sob um fluxo de gás N₂. O primeiro estágio foi chamado de pré-revelação, onde as placas permaneceram vazias e o segundo estágio foi chamado de Pós-revelação, onde as concentrações foram inseridas e as bandas identificadas.

3.4 DOSAGEM DE FLAVONOIDES

A determinação dos flavonoides seguiu a metodologia proposta por (WOISKY; PALATINO, 1998) adaptado. O experimento consiste na pipetagem de 1 mL do extrato em tubos (1 mg / mL) e adicionando 1 mL de cloreto de alumínio (5% de ALCL₃, hexahidratado) em metanol e 2 mL de metanol. Para o experimento, o espaço em branco foi preparado usando 3 mL de metanol e 1 mL de cloreto de alumínio. A amostra é aguardada por 30 minutos no escuro e o espectrofotômetro é lido a 425 nm. A quercetina foi utilizada como padrão nas concentrações de 1000, 500 e 250 µg / mL

para a construção da curva de calibração. Da equação da linha obtida, o cálculo do conteúdo de flavonoides, expresso como o equivalente de quercetina da amostra (mg de extrato WH / g), foi realizada.

3.5 OBTENÇÃO DO FILME E INCORPORAÇÃO DO EXTRATO DE *C. ERECTUS*

Os filmes a base de polissacarídeo extraído do CM Bionat 1 foram obtidos do laboratório de Biofísica Química, seguindo o protocolo desenvolvido por Onofre, (2014). Para a incorporação dos filmes poliméricos foi diluído 23 mg de extrato em 10 ml de água destilada, ambos foram homogeneizados no agitador magnético e posteriormente adicionados a solução filmogênica a base do polissacarídeo, posteriormente os filmes foram levados a estufa de secagem onde passaram cerca de 24 horas para secagem (Figura 4).

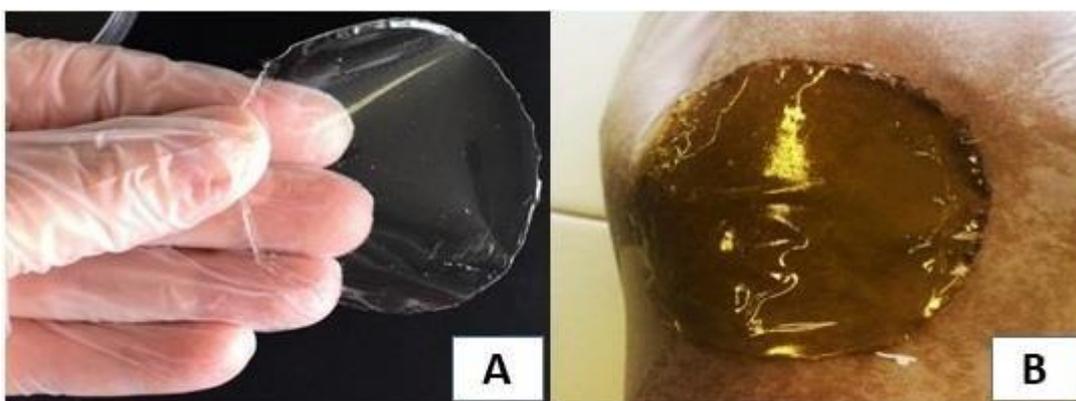


Figura 4. (A) Filmes de polissacarídeo extraído do CM Bionat 1 (R1) e (B) filme de CM Bionatb 1 incorporado com extrato de *C. erectus*.

Fonte: O próprio autor.

3.6 ANÁLISE BIOLÓGICA

3.6.1 Fluxograma experimental do estudo *in vivo*

A figura 5 mostra o fluxograma do estudo experimental *in vivo* realizado com ratos Wistar em e tratados com 10 e 15 dias.

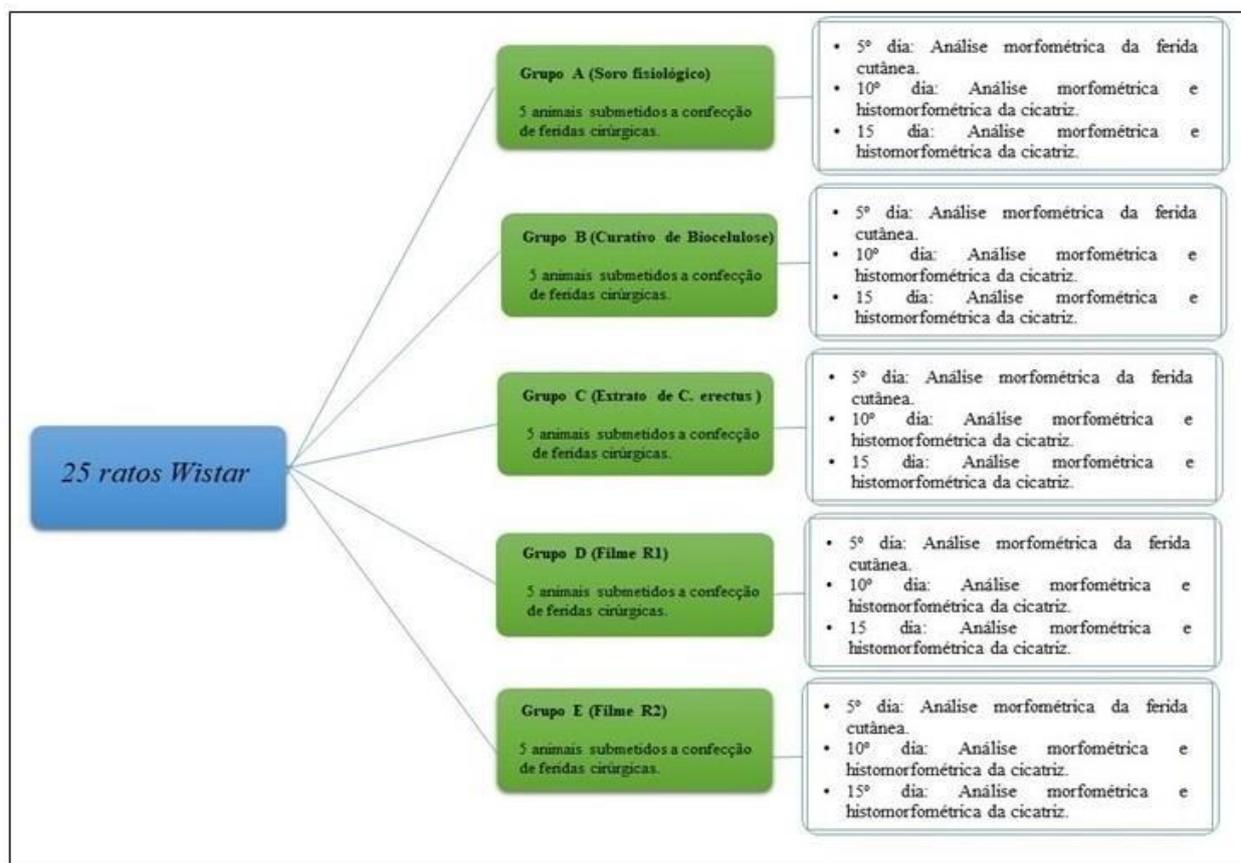


Figura 5. Fluxograma do estudo experimental in vivo.

Fonte: O próprio autor.

3.6.2 Animais

Nesta parte do estudo foram utilizados 25 ratos *Wistar*, machos, com idades entre 8 a 12 semanas, da mesma linha reprodutiva, provenientes do Departamento de Fisiologia e farmacologia CB/UFPE. Os animais foram divididos ao acaso em 5 grupos de 5 animais cada: grupo controle negativo (grupo A), grupo controle positivo (grupo B), grupo tratado com extrato de *C. erectus* (grupo C), grupo tratado com filme R1 (grupo D) e grupo tratado com filme R2 (grupo E). Cada grupo foi subdividido em 2 e 3 animais para eutanásia no 10º e 15º dia pós-operatório. Os animais foram mantidos a 27 ± 2 ° C, com umidade relativa 44 a 56% e ciclos de luz e escuro de 10 e ;/14 h, respectivamente, durante 1 semana antes e durante os experimentos. Ambos os grupos receberam dieta padrão (Labina purina®, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados no período da manhã de acordo com as diretrizes atuais para o cuidado dos animais de laboratório e as diretrizes éticas para a

investigação de dor experimental em animais conscientes, sob a aprovação do comitê de ética em experimentação animal com o número

3.6.3 Modelo de excisão das feridas

Os animais dos grupos A, B, C, D e E foram subdivididos em cinco subgrupos com 2 e 3 animais cada um, respectivamente, para eutanásia no 10º e 15º DPO (dia de pós-operatório). Os animais foram previamente anestesiados com injeção intramuscular em região dorsal de associação de ketamina (10mg/Kg de peso corpóreo) e xilazina (1mg/Kg de peso corpóreo). Após a anestesia, realizou-se a pesagem dos animais em balança analógica e procedeu-se à tricotomia na região dorsal de aproximadamente 6 cm² de área (Figura 6). Em seguida, foi feita a assepsia com álcool 70% na ferida cutânea, de aproximadamente 485 mm², com a utilização de bisturi com lâmina estéril número 15 até a exposição da fáscia muscular dorsal. Logo após da hemostasia, por compressão local, foi aplicado soro fisiológico a 0,9% nas feridas dos animais do grupo A, no grupo B aplicou-se o curativo de biocelulose (nexfil), no grupo C foi aplicado o extrato dissolvido de *C. erectus*, no grupo D foi aplicado o filme R1 e no grupo E o filme R2.



Figura 6. Medição inicial da área da ferida cutânea.

Fonte: Próprio autor.

3.6.4 Aplicação de solução, extrato e filmes

Nos dias subsequentes de pós-operatório, os animais foram tratados com a aplicação dos respectivos tratamentos em uma única vez sem realização de curativo

até o dia da eutanásia (ferida aberta). Ao final de cada subgrupo do 10o e 15o dia, realizou-se além da medição do comprimento e largura final com aplicação das fórmulas supracitadas para análise morfométrica. Uma nova intervenção cirúrgica foi realizada com anestesia já referida, e em seguida remoção da cicatriz com margem de 1 cm de pele em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do animal, e colocadas em solução tamponada de formol a 10%.

Todas as etapas foram documentadas por fotografias em câmera digital Cannon EOS 1000D. Cada subgrupo animal foi sacrificado através da câmara de CO2 ao fim dos experimentos.

Realizou-se a confecção de lâminas coradas por hematoxilina-eosina e então, procedeu-se a realização de microfotografia da lâmina em *scanner Pannoramic Midi* (3DHISTECH). A aferição da distância entre os epitélios na cicatrização – durante processo de reepitelização – foi realizada através do software *Pannoramic Viewer* versão 1.15.4 ano 2014.



Figura 7. Grupos de animais (Grupos controles) com soro fisiológico (A) e Curativo de biocelulose (B).
Fonte: Próprio autor.



Figura 8. Grupos de animais tratados com extrato de *C. erectus* (C), filme R1 (D) e filme R2 (E).
Fonte: Próprio autor

Nos dias subsequentes foi realizado o registro das características macroscópicas das feridas.

3.6.5 Análise morfométrica das feridas cutâneas

O potencial cicatrizante foi avaliado através da mensuração, por paquímetro universal da marca Digimess, dos tamanhos da ferida cirúrgica antes da utilização das substâncias – valores iniciais de comprimento e largura; e a avaliação final da cicatriz no 10° e 15° dia de pós-operatório.

3.6.6 Remoção da cicatriz e análise histomorfométrica

Ao final de cada subgrupo no 10° e 15° dia, foi realizada uma nova intervenção cirúrgica com remoção da cicatriz com margem de 1 cm de pele em volta da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do animal, e vertidas em formalina tamponada a 10%. Posteriormente à fixação as amostras foram processadas em técnica histológica convencional no departamento de histologia e Embriologia (UFPE). Os cortes emblocados em parafina tiveram o tamanho de 5 μ m e as preparações foram coradas em hematoxilina- eosina. Cada animal foi eutanasiado através do interrompimento do diafragma.

Com as lâminas obtidas procedeu-se a realização de escaneamento de todas as lâminas no laboratório de Patologia Oral do departamento de Odontologia (UFPE). Para obtenção das microfotografias do local da cicatriz foi utilizado o scanner de

lâminas Panoramic Midi (3DHISTECH). Em seguida, foram utilizadas as microfotografias para mensurar a distância entre os dois epitélios, traçando-se uma reta entre as duas bordas da cicatriz. Esse processo foi feito por meio do software Panoramic Viewer versão 1.15.4 ano 2014.

4.6.7 Análise estatística

As análises biológicas dos dados foram analisados descritivamente e inferencialmente. A análise descritiva correspondeu às medidas: média, desvio padrão e mediana e a análise inferencial foi através dos testes estatísticos. Para a comparação entre os grupos em cada avaliação foi utilizado os testes F (ANOVA) ou Kruskal-Wallis e para a comparação entre os tempos de avaliação foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IBM SPSS na versão 23.

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO METANÓLICO DE *C. ERECTUS*

4.1.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises cromatográficas em HPLC foram positivas para a presença de ácido clorogênico, catequina, ácido cafeico, geraniina, quercetina, Apigenina em pequenas quantidades, apresentando como pico majoritário o ácido elágico seguido pelo ácido p-cumarico (Figura 9), ambos predominaram no extrato metanólico das folhas de *C. erectus*, de acordo com o tempo de retenção em comparação com os padrões.

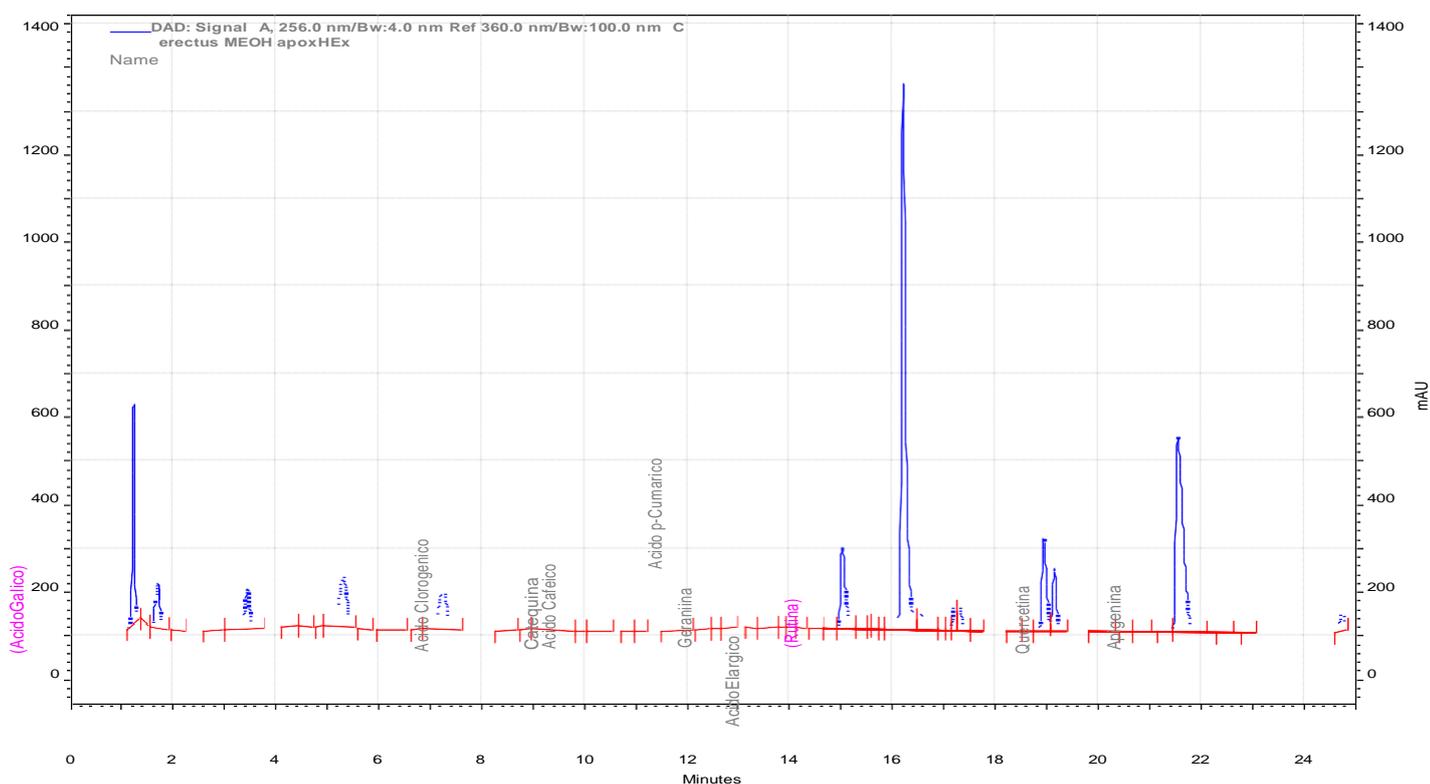


Figura 9. Picos dos compostos fenólicos identificados na cromatografia líquida em alto desempenho.
Fonte: Próprio autor.

4.2 DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES

Os resultados do teste quantitativo para a presença de flavonóides equivalentes ao padrão de quercetina do extrato concentrado nas concentrações de 1000, 500 e 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$ são mostrados na Tabela 1. *C. erectus* apresentou conteúdo de flavonoides de $72,52 \pm 5,12$, $36,54 \pm 1,13$ e $17,29 \pm 1,45$, respectivamente.

Planta	Dosagem de flavonoides (mg / g Ext.) -Conc.		
	1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	250 $\mu\text{g}/\text{ml}$
<i>C. erectus</i>	$72,52 \pm 5,12$	$36,54 \pm 1,13$	$17,29 \pm 1,45$

Tabela 2 - Quantificação do teor de flavonóides (equivalente a quercetina).

Fonte: Próprio autor.

4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE AVALIAÇÃO CLÍNICA DAS FERIDAS CUTÂNEAS

A avaliação macroscópica das feridas foi realizada com o intuito de acompanhar o processo de cicatrização ao decorrer do pós-operatório. Nas análises macroscópicas realizadas foram evidenciadas características diferentes entre os cinco grupos analisados. Os grupos A e B apresentaram crostras grandes sem ser constatado a presença de secreções ao longo do experimento. O grupo C apresentou grandes crostras em todos os animais com a formação de tecido de granulação em alguns animais. No grupo (D) foi observado crostras médias em relação aos demais grupos com a formação de tecido de granulação em algumas feridas. No grupo (E) foi verificada a presença de pequenas crostras em todos os animais com sangramento em um dos animais onde uma nova intervenção foi realizada para ajuste do filme e posterior reepitelização da ferida. Todos os animais do grupo (E) apresentaram tecido de granulação e cicatrizes com bom aspecto macroscópico.

4.3.1 Avaliação morfométrica

Neste estudo, a análise morfométrica das feridas cutâneas através das análises das lesões no 10^o e 15^o dia pós-operatório segundo o grupo e o tempo de avaliação (Figura 10).

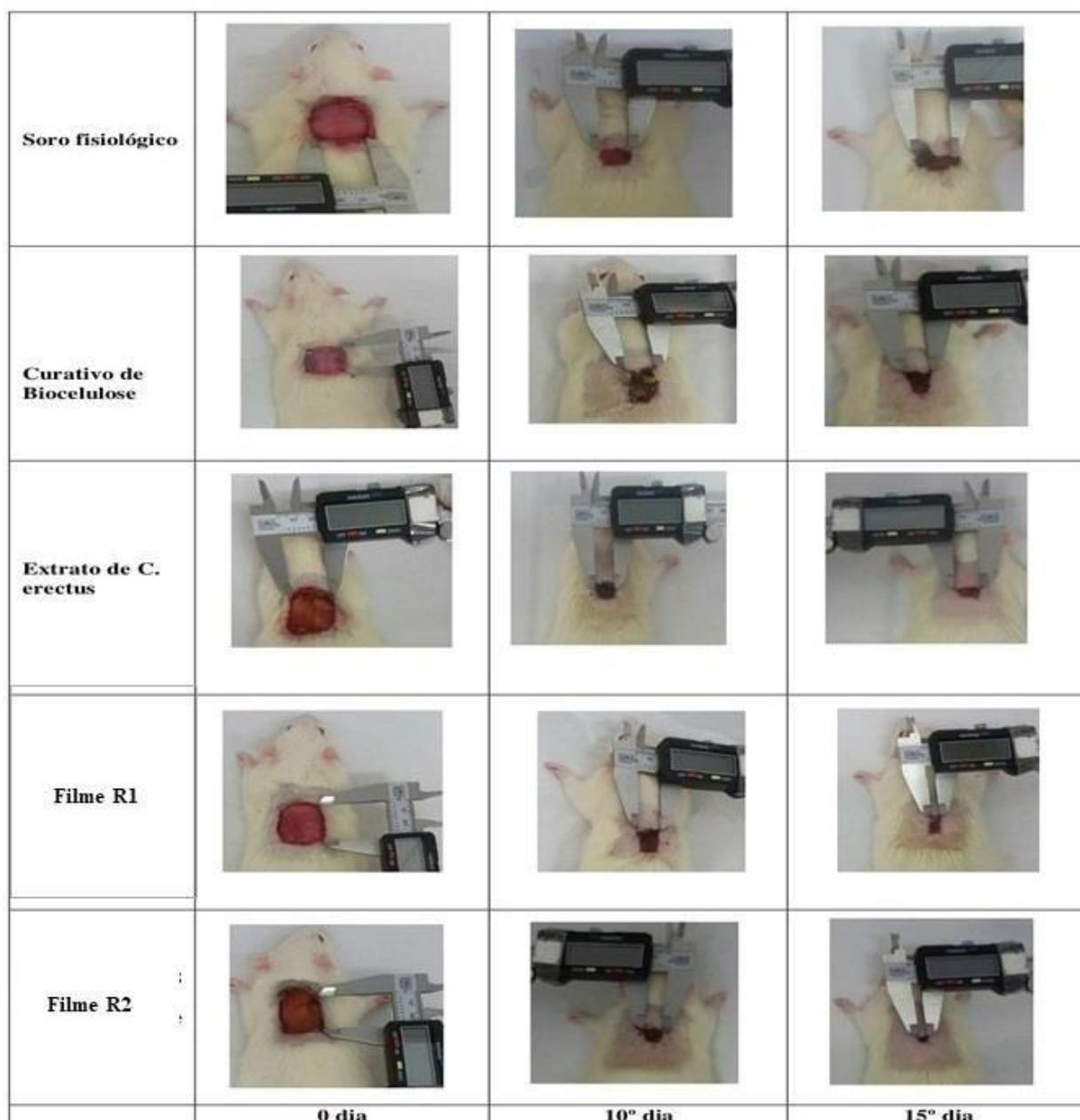


Figura 10. Aspectos macroscópicos das feridas cirúrgicas nos cinco grupos no 10º e 15º dia de pós-operatório.

Fonte: Próprio autor.

Na avaliação com 10 dias se comprova diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo E (Filme R2) e o grupo A (soro fisiológico). Através dos testes de comparações múltiplas se comprova uma maior redução da área das feridas no grupo E (Filme R2) quando comparado aos grupos A (Soro fisiológico) e grupo D (Filme R1). Na avaliação do 15º dia as médias variaram de $5,50 \text{ mm}^2$ no grupo (E) e $8,79 \text{ mm}^2$ no grupo (D), entretanto, não foi verificada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos (Tabela

3).

Grupo	Avaliação		Valor de p
	10 dias Média ± DP	15 dias Média ± DP	
A (Soro fisiológico)	13,18 ± 2,99 ^(A)	7,92 ± 1,84	p ⁽¹⁾ = 0,400
B (Curativo de biocelulose)	10,64 ± 1,68 ^(AB)	7,67 ± 1,18	p ⁽¹⁾ = 0,400
C (Extrato de <i>C. erectus</i>)	10,68 ± 0,48 ^(AB)	6,63 ± 0,18	p ⁽¹⁾ = 0,200
D (Filme R1)	13,05 ± 3,43 ^(A)	8,79 ± 0,62	p ⁽¹⁾ = 0,400
E (Filme R2)	9,20 ± 1,33 ^(B)	5,50 ± 2,47	p ⁽¹⁾ = 0,200
Valor de p	p ⁽²⁾ = 0,048*	p ⁽³⁾ = 0,269	

Tabela 3. Áreas das feridas (mm²) segundo o grupo e o tempo de pós-operatório.

Legenda: (1) Através do teste de Mann-Whitney; (2) Através do teste F (ANOVA) com comparações de DMS (diferenças mínimas significativas);(3) Através do teste de Kruskal-Wallis.

Quando se avaliou as áreas das feridas dos animais de 10^o dia com os animais do 15^o dia pós-operatório e comparou-se entre os grupos observou-se que as médias foram correspondentemente mais elevadas no 10^o dia em cada um dos grupos, entretanto sem diferenças significativas para nenhum dos grupos (p > 0,05). A variabilidade expressa pelo desvio padrão se mostrou reduzida desde que os referidos valores foram inferiores a 1/3 das médias correspondentes.

A figura 11 mostra as médias das áreas das feridas. Interessante notar que as médias das áreas do grupo E (Filme R2) são maiores em relação ao grupo A (soro) e ao grupo D (Filme R1).

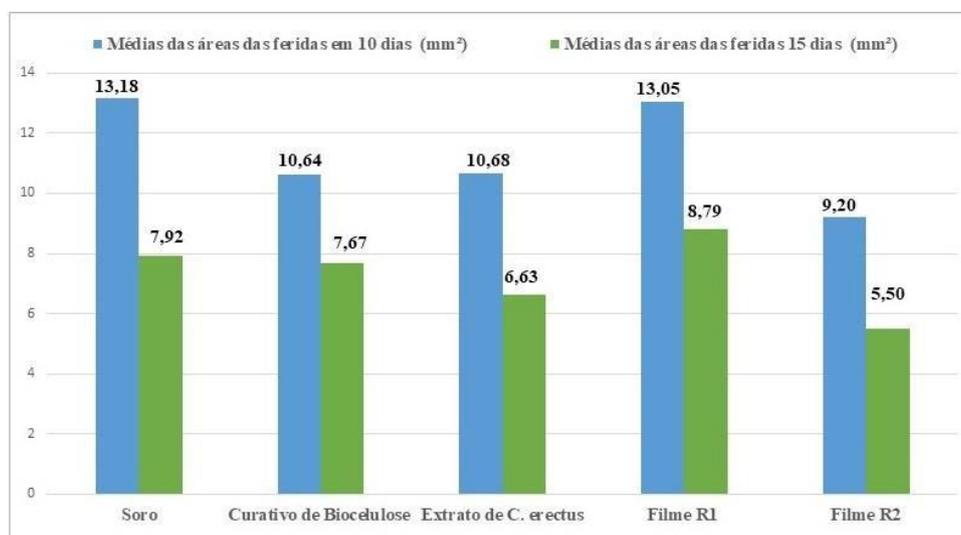


Figura 11. Média da área das feridas.

Fonte: Próprio autor

4.3.2 Análise Histomorfométrica

Na avaliação histomorfométrica foi evidenciada redução das bordas dos epitélios nos animais avaliados com 10 dias apresentando a média de 5.132,46 μm no grupo D (Filme R1) e 9.751,81 μm no grupo B (Curativo de Biocelulose), enquanto que na avaliação com 15 dias as médias variaram de 1.093,54 no grupo A (soro fisiológico) e 8.595,77 no grupo D (Filme R1), entretanto, para a margem de erro fixada (5%) não foram comprovadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tempos de avaliação para nenhum dos grupos (Tabela 4). Também não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos em nenhuma das duas avaliações.

A variabilidade expressa através do desvio padrão oscilou de baixa a elevada desde que os valores dos desvios padrão variaram de valores inferiores a 1/3 (baixa variabilidade) a valores superiores (variabilidade bem elevada) das médias correspondentes.

Grupo	Avaliação		Valor de p
	10 dias	15 dias	
	Média ± DP Mediana	Média ± DP Mediana	
A Soro Fisiológico	8.141,25 ± 1.130,76 8.141,25	1.093,54 ± 1.814,07 93,06	p ⁽¹⁾ = 0,083
B Curativo de biocelulose	9.751,81 ± 2.287,58 9.751,81	2.243,86 ± 1.131,79 2.585,62	p ⁽¹⁾ = 0,083
C Extrato de C. Erectus	7000,84 ± 3.923,76 7.064,10	5.407,88 ± 5.136,30 5.407,88	p ⁽¹⁾ = 0,564
D Filme R1	5.132,46 ± 5.075,61 5.132,46	8.595,77 ± 780,75 8.940,38	p ⁽¹⁾ = 0,248
E Filme R2	7.706,27 ± 3.807,33 7.507,57	5.407,88 ± 5.136,30 5.407,88	p ⁽¹⁾ = 0,564
Valor de p	p⁽²⁾ = 0,738	p⁽²⁾ = 0,223	

Tabela 4. Estatísticas das distâncias das bordas dos epitélios (m) segundo o grupo e o tempo de avaliação.

Legenda: (1) Através do teste de Mann-Whitney; (2) Através do teste de Kruskal-Wallis.

Fonte: Próprio autor.

A figura 12 mostra as médias das distâncias das bordas dos epitélios (m) segundo o grupo e o tempo de avaliação. Interessante notar que mesmo a média das

distâncias das bordas dos epitélios no grupo A (Soro) foi menor em relação a média dos demais grupos, porém, foram verificadas diferenças significativas entre os grupos em nenhuma das duas avaliações.

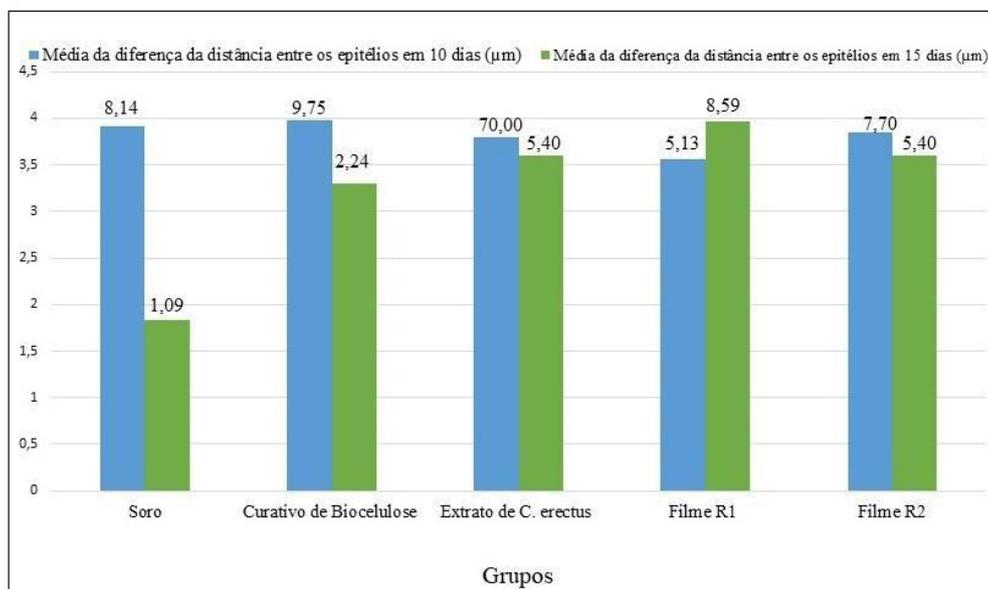


Figura 12. Média da diferença da distância entre os epitélios.

Fonte: Próprio autor

No 10^o e 15^o dia de pós-operatório, os grupos não apresentaram distância entre os epitélios com 100% das cicatrizes reepitelizadas. É importante notar que mesmo apresentando variação entre as médias dos grupos não houve diferença significativa (Figura 13).

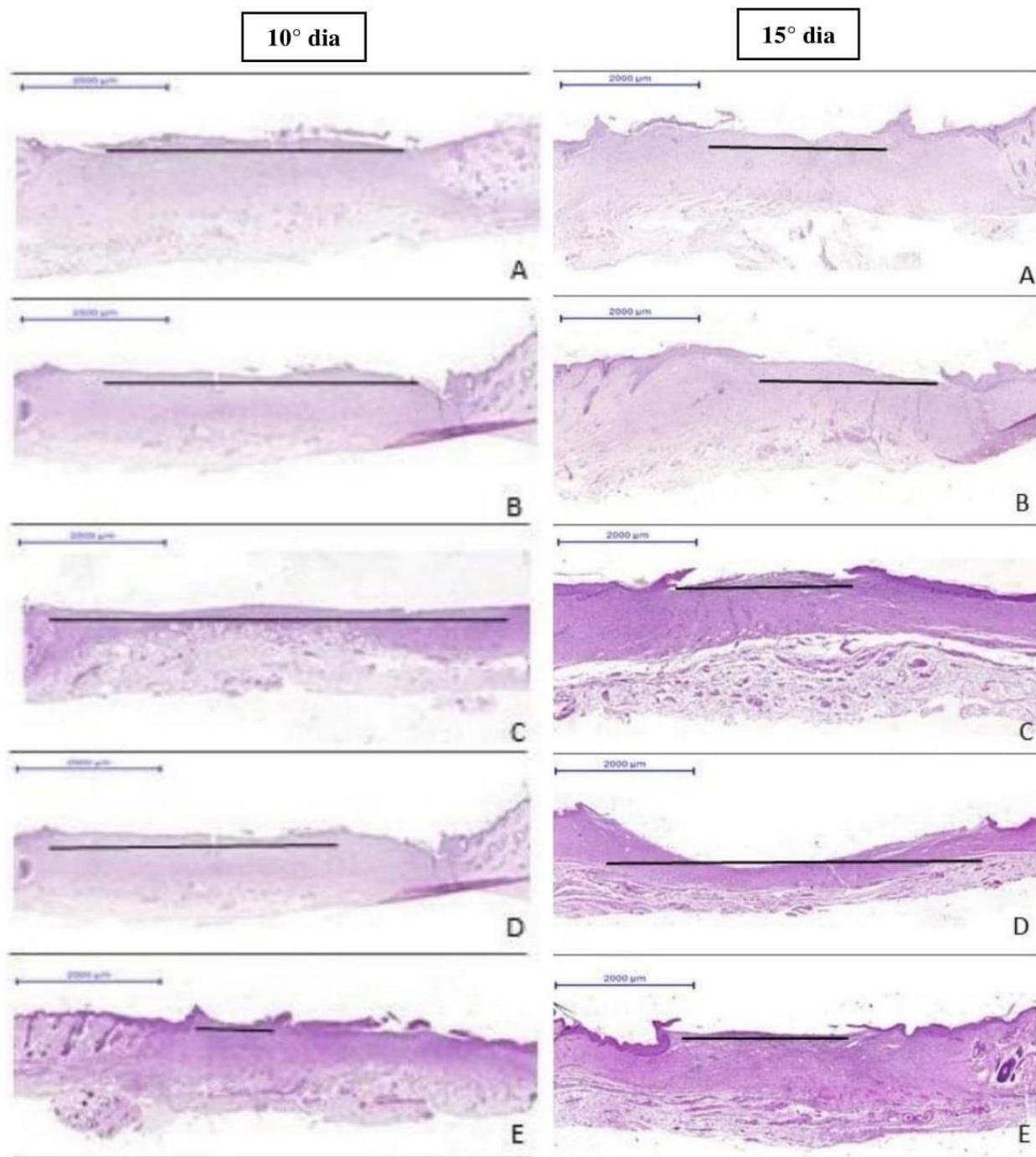


Figura 13. Média da diferença da distância entre os epitélios em relação ao tempo.

Legenda: A (Soro fisiológico); B (Curativo de Biocelulose) ; C (Extrato de *C. erectus*); D (Filme R1); E (Filme R2). Observação: 10º e 15º dia, respectivamente. **Fonte:** Próprio autor.

5 DISCUSSÃO

5.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO METANÓLICO DE *C. ERECTUS*

5.1.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O extrato metanólico de *C. erectus* apresentou em sua composição, ácido clorogênico, catequina, ácido cafeico, geraniina, quercetina, apigenina em pequenas quantidades, apresentando como substância majoritária o ácido elágico seguido pelo ácido p-cumarico, ambos predominaram no extrato metanólico das folhas de *C. erectus*, de acordo com o tempo de retenção em comparação com os padrões. De fato, Abdeel Hameed et al., (2012) por fracionamento sucessivo do extrato MeOH de *C. erectus* identificou a presença de quercetina em diferentes partes da planta, corroborando assim com os dados encontrados nesse estudo.

A quercetina é conhecida como um poderoso antioxidante natural que já possui aplicações no âmbito terapêutico. É encontrada em diferentes espécies de plantas, mostrando atividades antimicrobianas, antitumorais e antioxidantes. Já foi constatada sua eficácia na redução da formação de placas gordurosas nas artérias, no combate às alergias e sua atividade antiangiogênica frente a células endoteliais humanas (ARAS et al., 2014; COSTA, 2005; SEPÚLVEDA et al., 2011; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Abdel-Hammed et al., (2012) em seus relatos sobre o estudo fitoquímico do extrato metanólico de *C. erectus*, também identificou a presença dos compostos, catequina, quercetina, apigenina e ácido elágico demonstrando que o ácido elágico é um dos principais componentes do fruto desta planta. Esses dados reforçam os dados encontrados nesse estudo e nos permite sugerir que *C. erectus* apresenta compostos fenólicos em diversas partes da planta (ABDEL-HAMMED et al., 2012).

Já foi reportado por Mininel (2015) a presença de ácido elágico no extrato hidroalcoólico de folhas de *Terminalia catappa* L. uma outra espécie pertencente à família Combretaceae. Desta forma podemos sugerir que o referido composto representa uma característica própria desta família.

O ácido elágico é um poderoso composto bioativo de ocorrência natural próprio do grupo dos elagitaninos (ET), os taninos hidrolisáveis dos polifenóis (JORDÃO,

2016; VATTEM; SHETTY, 2005). Em estudo desenvolvido por Silva (2004) foi verificado uma forte intensidade de taninos nas folhas e cascas de extrato metanólico de *C. erectus*. (SILVA, 2004).

Os taninos são utilizados em tratamentos que promovem a cicatrização de feridas (FERNANDEZ et al., 2002; DE-FARIA et al., 2012). Chen et al. (1994) utilizaram uma preparação a base de taninos em feridas cutâneas. De acordo com Araújo (2015) a película utilizada por Chen et al., (1994) pode estar relacionada ao complexo formado por taninos não hidrolisáveis com proteínas, o que resultou em resultados satisfatórios. Sendo o composto majoritário do nosso estudo um tipo de tanino esses dados reportados na literatura nos possibilita direcionar o extrato de *C. erectus* como uma substância importante para associação aos filmes poliméricos.

5.1.2 Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE)

A análise do perfil cromatográfico CCDAE indicou a presença de flavonoides do tipo quercetina no extrato metanólico de *C. erectus*, é certo que este resultado reforça os dados já encontrados na cromatografia líquida de alta performance-HPLC.

Os flavonóides são compostos fenólicos que possuem atividade antioxidante, moléculas responsáveis pela eliminação de radicais livres (ABDOU et al., 2010). Compostos fenólicos são estruturas químicas provenientes do metabolismo secundário das plantas que expõem hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os concede o poder antioxidante (ANGELO; JORGE, 2007; NACZK; SHAHIDI, 2004).

Saadullah e colaboradores (2016) avaliaram o extrato metanólico das partes aéreas e das raízes de uma espécie do gênero *Conocarpos*, o qual indicou a presença de flavonoide do tipo quercetina, além de outros compostos como ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cumérico, ácido sinápico, ácido ferúlico e ácido cafeico.

Segundo El-Sayed e colaboradores (2012) em suas pesquisas analisando o perfil cromatográfico pela técnica CLAE, o extrato metanólico de *C. erectus* apresentou oito tipos de compostos dentre eles os flavonóides quercetina, rutina e apigenina.

5.2 DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES

O doseamento de flavonoides do extrato de *C. erectus* foi determinado como equivalente de quercetina nas concentrações de 1000, 500 e 250 µg / mL mostrou um conteúdo de flavonoides de $72,52 \pm 5,12$, $36,54 \pm 1,13$ e $17,29 \pm 1,45$, respectivamente. Nascimento et al. (2016), destaca a presença desses compostos em extrato aquoso de folhas de *C. erectus*. Saadullah et al., (2016) em seus estudos sobre a atividade antioxidante de água da raiz e partes aéreas de *Conocarpus lancifolius* extraído em diclorometano e metanol encontraram as concentrações de flavonoides de $104,2 \pm 0,06$ e $629,4 \pm 1,57$ respectivamente, tendo como referência a quercetina.

Raza et al., (2016) analisando o potencial antioxidante dos ramos e folhas do extrato etanólico bruto de *C. erectus* com referência ao equivalente a quercetina verificou uma quantidade de flavonoides de $4,34 \pm 0,32$. Ambos os estudos corroboram com nossas descobertas. Segundo Milstersteiner et al., (2003) o efeito farmacológico dos flavonoides se deve à ação na inibição de certas enzimas e à capacidade antioxidante.

Em contraste, Hussien, (2016) analisando qualitativamente a presença de compostos fenólicos em extrato metanólico de folhas de *C. erectus* não verificou a presença de flavonoides. Com isso podemos sugerir que o teste qualitativo realizado por ele não foi suficiente para identificar a presença de tais compostos.

Testes quantitativos para a espécie *C. erectus* ainda são mínimos na literatura, portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de mais estudos que explorem as diversas partes desta planta.

5.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE

A inspeção das feridas cirúrgicas revelou que ambos os grupos apresentaram crostas sem a presença de processos infecciosos nas feridas durante o período do estudo. Entretanto apenas o grupo E (Filme R2) apresentou crostas menores e com maior tecido de granulação macroscopicamente. A análise microscópica nos grupos avaliados com 10 dias, as médias das áreas variaram de 9,20 mm² no grupo E (Filme R2) a 13,19 no grupo A (Soro fisiológico) onde é observada diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$), onde foi comprovada maior reepitelização do grupo E

(Filme R2) quando comparados aos grupos A (Soro fisiológico) e D (Filme R1)

Esses resultados podem ser explicados pela presença de polifenóis no grupo E (Filme R2), representando um agente medicinal onde muitas das suas ações parecem depender da sua capacidade de complexar com proteínas e polissacarídeos, auxiliando na cura de feridas e inflamações (HASLAM, 1996).

De acordo com Haslam (1996) os polifenóis agem produzindo uma camada impermeável (proteína de polifenol e ou polissacarídeo complexo) sob a qual a cura natural possa ocorrer (HASLAM, 1996). Em específico esses resultados podem ser explicados pela presença do ácido elágico, um tanino hidrolisável já muito reportado na literatura.

Segundo Rodrigues et al., (2013) no processo cicatricial de feridas cutâneas, os taninos têm a capacidade de formar pontes de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas duradouras com proteínas, polissacarídeos ou ambos. Desse modo, ocorre a formação do complexo tanino-proteína ou tanino-poliissacarídeo, que por serem insolúveis em água formando uma camada protetora (crosta) sobre a lesão (RODRIGUES, 2012). Pode-se levar em conta ainda a ação antibacteriana dos taninos que possa representar uma diminuição no risco de infecção de ferida, evitando o retardo da cicatrização (ARAÚJO, 2015).

Bueno et al., (2014) investigaram *in vitro* as propriedades dos taninos a partir de extrato hidroalcoólico de *Poincianella pluviosana* cura de feridas e constaram que eles influenciam na fisiologia das células da pele através de suas propriedades farmacológicas, aumentando a proliferação celular. Os dados já dispostos na literatura confirmam os resultados obtidos nesse estudo e evidencia a importância que os taninos estabelecem frente a regeneração de feridas.

Já é discutido na literatura a ação anti-inflamatória dos flavonoides (NASCIMENTO et al., 2016), seria outra hipótese, a possibilidade destes atuarem simultaneamente com os taninos para reepitelização das feridas.

Quando se avaliou as áreas das feridas dos animais de 10^o dia com os animais do 15^o dia pós- operatório observou-se que as médias foram correspondentemente mais elevadas no 10^o dia em cada um dos grupos, entretanto sem diferenças significativas para nenhum dos grupos ($p > 0,05$).

Resultado semelhante já foi constatado por Araújo (2015) quando avaliou o potencial cicatrizante da *Rizhophora mangle* (coletada na mesma área de estudo de nossa pesquisa) e não encontrou diferença significativa entre os subgrupos do 15º dia.

Kirsner et al., (2008) destaca que o processo cicatrizante está relacionado ao tempo da injúria inicial, e que a terceira fase do processo de cicatrização inclui o remodelamento da cicatriz com contração de feridas podendo ocorrer também a sua hipertrofia.

5.4 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Ao mensurar a distância entre os epitélios em nosso estudo, podemos constatar que foram observadas as menores médias para o grupo tratado com o filme R1, também observamos médias aproximadas a esse no grupo controle (soro fisiológico), caracterizando um resultado inesperado. Já no 15º dia de pós-operatório foi observado que as médias também variam entre os grupos, sendo apresentada uma maior reepitelização para o grupo controle (soro fisiológico), seguido do grupo experimental (filme de EPS do CM Bionat 1), não apresentando diferenças significativas em nenhum dos grupos.

Araújo (2015) utilizando o creme de *Rizhophora mangle* em feridas abertas verificou que houve 100% de reepitelização, não corroborando com o aspecto clínico e morfométrico da ferida. Estes resultados sugerem que o veículo creme agiu de maneira homogênea na cicatrização de feridas. Em contrapartida, nossos resultados morfométricos mostraram diferenças significativas entre os grupos avaliados em 10 dias de tratamento, porém não foi verificada esta diferença para o estudo histomorfométrico. Além disso, as feridas abertas apresentam problemas clínicos diferentes das feridas incisadas e saturadas (COELHO et al., 1999), o que também pode explicar os resultados encontrados nesse estudo.

Segundo Jones, Currie e Martin (2002) os materiais utilizados como substitutos de pele são mais adequados para regiões superficiais, onde constroem um ambiente propício para regeneração epidérmica, proporcionando uma barreira contra infecções e controle da perda de água. Frente aos resultados encontrados por estes autores podemos sugerir que as menores médias encontradas apenas na análise

morfométrica são explicadas pelos substitutos de peles os substitutos de pele serem veículos específicos para agir na epiderme.

Os resultados desse estudo podem ser explicados estatisticamente pela variabilidade expressa através do desvio padrão, que oscilou de baixa a elevada desde que os valores dos desvios padrão variaram de valores inferiores a 1/3 (baixa variabilidade) a valores superiores (variabilidade bem elevada) das médias correspondentes, e isso pode ter alterado a veracidade dos resultados, onde, muitos animais foram avaliados apenas no 10º dia do pós-operatório, gerando uma desproporção nas quantidades de dados a serem analisados estatisticamente.

Estudos da avaliação cicatrizante com base em filmes incorporados com o extrato de *C. erectus* não foram encontrados na literatura, o que dificulta a comparação com outros trabalhos. Entretanto, como foi possível perceber, estudos com compostos secundários presentes na planta sugerem que seu efeito cicatrizante ocorreu devido aos compostos fenólicos.

6 CONCLUSÃO

- Na avaliação do perfil fitoquímico de *C. erectus* foi detectado a presença de flavonóides, dentre eles sugere-se a presença do composto ácido elágico. A presença de compostos fenólicos foi detectada, justificando a sua utilização na medicina popular. Os resultados obtidos sugerem a continuidade de estudos com a planta, incluindo o fracionamento sucessivo do extrato para comprovação dos constituintes encontrados e análise dos demais compostos.
- Os resultados da avaliação cicatrizante mostram que o uso tópico de filmes de polissacarídeo extraído do CM Bionat 1 incorporado ao extrato de *C. erectus* apresenta efeito significativo na diminuição da área de feridas cutâneas sugerindo a utilização como substituto temporário de pele. Entretanto, o isolamento de compostos de *C. erectus* responsáveis pela influência positiva no processo de reparação de tecidos deve ser realizado, com o intuito de se direcionar melhor próximos estudos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, E. S. S.; BAZAID, S. A.; SABRA, A. N. A. Protective effect of conocarpus erectus extracts on CCL4-induced chronic liver injury in mice. **Global Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 52–60, 2013.
- ABDEL-HAMMED, E. S. et al. Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant , Anticancer and Antimicrobial Properties of Conocarpus erectus L . Growing in Taif , Saudi Arabia. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 2, n. 2, p. 93–112, 2012.
- ACHKAR, M. T. et al. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 398–406, 2013.
- ADRIÃO, R. J. B. Biomateriais e reacções de hipersensibilidade - um problema ortopédico ?
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANTONIASSI, F. M.; MARTINS, B. L.; QUEIROZ-FERNANDES, G. M. Identificação presuntiva
- ARAS, A. et al. Targeting Cancer with Nano-Bullets: Curcumin, EGCG, Resveratrol and Quercetin on Flying Carpets. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 9, p. 3865–3871, 2014.
- ARAÚJO, J. G. Desenvolvimento de creme de Rhizophora Mangle L.: Avaliação do Potencial cicatrizante em feridas cutâneas. 2015.
- ARAYA, M. et al. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. **Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**, p. 1–11, 2002.
- BAILY, E. . **Hortus Third" a Concise Dictionary of Plants Cultivated in the United States and Canada**. [s.l: s.n.].
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.
- BARBOSA, F. S. Modelo de impedância de ordem fracional para a resposta inflamatória cutânea. 2011.
- BLANES, L. Tratamento de feridas. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**, p. 1–379, 2004.
- BRASIL, M. A. P. Estabilidade E Qualidade De logurte Adicionado De Luteína E Validação De Método Para Determinação De Riboflavina Em

logurte. **Universidade Estadual De Campinas**, v.

BRINGEL, F. DE A. Avaliação morfofuncional de pele humana conservada em glicerol e submetida à radiação gama : estudo em camundongos atômicos. p. 1–122, 2011.

BUCIO, E.; BURILLO, G. Radiation grafting of pH and thermosensitive N-isopropylacrylamide and acrylic acid onto PTFE films by two-steps process. **Radiation Physics and Chemistry**, 2007.

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

BUSSMANN, R. W. et al. Plant use in Odo-Bulu and Demaro, Bale region, Ethiopia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 7, p. 1–21, 2011.

CAMARGO, M. C. Pró - reitoria de pesquisa e pós-graduação mestrado em ciência animal aplicabilidade de uma película de celulose cristalina no tratamento de feridas cutâneas induzidas em ratos. 2011.

CAMUCI, M. B. et al. Epidemiological Characterization of Adult Patients Hospitalized in a Burns Intensive. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 1277, 2014.

CARNEIRO, R. P. Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir. p. 143, 2010.

CARVALHO, P. D. T. C. DE et al. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta cirurgica brasileira/Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 21, n. 3, p. 177–183, 2006.

CERQUEIRA, M. A. et al. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 179–185, 2011.

CHEN, Z. P.; CAI, Y.; PHILLIPSON, J. D. Studies on the Anti-Tumour, Anti-Bacterial, and Wound-Healing Properties of Dragon's Blood. *Planta Med*, v. 60, p. 541–545, 1994.

Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525–542, 2003.

COELHO, M. C. O.; REZENDE, C. M. F.; TENORIO, A. P. M. Contraction of wound after cover with temporal skin substitutes. *Ciência Rural*, v. 29, n. 2, p. 297–303, 1999
CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. R. Patologia estrutural e funcional. **Guanabara Koogman**, p. 44–100, 2001.

COSTA, I. DE MELO. Estudo de pré-formulação com o composto polifenólico quercetina. p. 1– 198, 2005.

CRUZ, B. DE F.; CORDOVIL, P. B. L.; BATISTA, K. DE N. M. Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 11, n. 4, p. 246–250, 2012.
de leveduras de interesse biotecnológico em grãos de kefir. v. 8, p. 111–117, 2017.

DEOLIVEIRA, I. V. P. M.; DACUNHADIAS, R. V. Cicatrizaçãodeferidas: Fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 267–271, 2012.
Dermatologia. Rio de Janeiro: Elsevier., v. 141, p. 2147-2158, 2008.

DUARTE, M. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil.

FALSAPERLA, M. et al. Support ellagic acid therapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC) on standard chemotherapy using vinorelbine and estramustine phosphate. **European Urology**, v. 47, n. 4, p. 449–454, 2005.

feridas - curativos Clinical treatment of wounds – dressings. v. 89, n. Lim 04, p. 137– 141, 2010.

FERNANDEZ, O. et al. Efficacy of Rhizophora mangle aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. **Fitoterapia**, v. 73, n. 7–8, p. 564–568, 2002.

FIORDA, F. A. et al. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. **Food Microbiology**, v. 66, p. 86–95, 2017.

FIRMO, W. D. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, v. 18, n. n. especial, p. 90–95, 2011.

GOMES, D. . et al. Efeito dos íons Ca⁺⁺ na liberação de extratos de Anadenanthera Colubrina em filmes poliméricos baseados em alginato, visando o desenvolvimento de substitutos temporários de pele. 2016.

GOMES, D. DO N. A NADENANTHERA COLUBRINA (V ELL .) BRENAN VISANDO O. v. Único, p. 1–104, 2016.

HALIM, A. S.; KHOO, T. L.; YUSSOF, S. J. M. Substitutos cutâneos biológicos e sintéticos: uma visão geral. 2010.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205–215, 1996.

JORDÃO, J. B. R. Efeitos protetores do ácido elágico sobre as lesões

- cardiovasculares causadas pela hipertensão em ratos. p. 1–72, 2016.
Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.43, n.6, p.413–423, 2007.
- JUNQUEIRA, L. .; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. [s.l.:s.n.].
 KAČURÁKOVÁ, M.; WILSON, R. H. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. **Carbohydrate Polymers**, v.44, n.4, p.291–303, 2001.
- KASSAKUL, W. et al. Characterization of the mucilages extracted from hibiscus rosa-sinensis linn and hibiscus mutabilis linn and their skin moisturizing effect. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 11, p. 453–457, 2014.
- KIRSNER, R.S. Cicatrização de feridas. In: BOLOGNIA, J.L.; JORIZZO, J.L.; RAPINI, R.P. (Ed),
- LANA, D. F. D. et al. Uma Revisão Sobre As Propriedades Farmacológicas, Morfoanatomia E Toxicidade De Xanthium Cavanillesii Schouw (Asteraceae). **Saúde (Santa Maria)**, v. 38, n. 2, p. 57–70, 2012.
- LEITE, G. B. Análise de portadores assintomáticos Staphylococcus aureus no hospital Universitário de Brasília. **Microbial Pathogen Data Sheets**, n. May, p. 1–4, 2008.
- Ligas de Titânio para Implantes Ortopédicos. p. 113, 2004.
- LOPES, F. **Administração Central do Sistema da Saúde, IP**, 2004.
- MAIA, L. P. et al. Estudo Das Áreas De Manguezais Do Nordeste Do Brasil. p. 62, 2005.
- MANDELBAUM, S. H.; PAMPADO DI SANTIS, É.; SANT'ANA
 MANDELBAUM, M. H. maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação. p. 95, 2011.
- PERILLO, G.M.E. et al. **Paradigm shifts in mangrove biology**. [s.l.: s.n.].
- MARGUERITE, R. Alginate fibers: an overview of the production processes and applications in wound management. **Polymer international**, v. 57, n. April, p. 171–180, 2008.
- MARTINS, N.L.P. et al. Healing process in cutaneous surgical wounds in rats under the influence of Orbignya phalerata aqueous extract. **Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v.21 Suppl3, n. Suplemento 3, p. 66–75, 2006.
- MELLO, G. M. R. Efeito de Elementos Betagênicos na Estabilidade de Fases e Propriedades de

MELO, T. DE O.; LIMA, A. F. C. Cost of nursing most frequent procedures performed on severely burned patients. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 70, n. 3, p. 481–488,2017.

MELO, T. DE O.; LIMA, A. F. C. Cost of nursing most frequent procedures performed on severely burned patients. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 70, n. 3, p. 481–488,2017.

METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. J. Tissue engineering of replacementskin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 4, n. 14, p. 413–437, 2007.

MININEL, F. J. Estudo Fitoquímico de extratos polares e infusão das folhas de Terminalia catappa L . (COMBRETACEAE) e avaliação das suas atividades antiulcerogênica e mutagênica Araraquara – SP. p. 1–179, 2015.

MORAIS, D. C. M. et al. Ação Cicatrizante De Substâncias Ativas : Fibroblastos. **Foco**, p. 83–98, 2013.

MOREIRA, M. E. C. et al. Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentaçãoaquosade grãosde quefir. **Quim.Nova**, v.31, n.7, p.1338–1742,2008.

MOTTA, A. A. et al. Dermatite de contato Contact dermatitis. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, v.34, n. 3, p. 73–82, 2011. **Multiciência**, v. 7, p. 16, 2006.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 2004.

NETO, R. L. S.; CORDEIRO, L. S.; LOIOLA, M. I. B. Flora do Ceará , Brasil: Combretaceae Resumo Este estudo consiste no levantamento florístico de CombretaceaeocorrentesnoestadodoCeará,comopartedoprojeto“FloradoCeará”.Oestudofibaseadona análisecomparativadoscaracteresmorfológicos.v.65,n. 3, p. 685–700,2014.

NITSCHKE, M. J. T. Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos Wistar Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos Wistar.2010.

NPUAP - The National Pressure Ulcer Advisory Panel. 2007.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.

OLIVEIRA, A. F. Estudo da viabilidade da produção de biofilmes de kefir e

suas interações com extratos de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) e de gérmen de soja (*Glycine max* (L .) Merrill). p. 1–180,2016.

OLIVEIRA, A. F. Estudo da viabilidade da produção de biofilmes de kefir e suas interações com extratos de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) e de gérmen de soja (*Glycine max* (L .) Merrill). p. 1–180,2016.

ONOFRE, N. A. Filmes Poliméricos a Partir De Ágar, Agarose E Filmes Poliméricos a Partir De Ágar , Agarose E. 2014.

PAOLILLO, F. R. et al. Inativação microbiana com terapia fotodinâmica e pele artificial em ratos. p. 806–808, 2014.

PASSARETTI, T. et al. Eficácia do uso do Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*) no processo de cicatrização em lesões: uma revisão de literatura. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 41, n. 1, p. 51–54, 2016.

PECK, M.; MOLNAR, J.; SWART, D. A global plan for burn prevention and care.

Bull World Health Organ, v. 87, p. 802–803, 2009.

PEREIRA, T. A. Obtenção e caracterização de nanoemulsões o/a a base de óleo de framboesa,

PETROIANU, A. et al. Comparação entre cola biológica e sutura em cicatrização da pele. **Rev. Col. Bras. Cir.**, p. 249–253, 2001.

PIERMARIA, J. et al. Kefiran films plasticized with sugars and polyols: watervapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1261–1269, 2011.

PINHO, R. P. P. Aplicações do quitosano como biomaterial. p. 1–53, 2016.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomaterials: Types, Applications, and Market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

PRADO, M. R. M. Produção de compostos bioativos a base de polissacarídeo e proteína com atividades angiogênica e anti-inflamatória utilizando cultura mista de bactérias e leveduras do kefir tibetano em soro de leite. p. 1–122, 2014.

PRAJAPATI, V. D. et al. Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications.

QUERINO, C. A. S.; MOURA, A. L. Impacto do desmatamento de uma área de mangue no albedo superficial. p. 401–408, 2013.

RATNER, B. D. et al. **An Introduction to Materials in Medicine**. [s.l.: s.n.]. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 15, n. 4, p. 613–620, 2014.

RIBEIRO, M. J. P. Development of new biomaterials to be applied as Skin Substitutes. 2014.

ROCHA, T. DE A. Perfil das lesões cutâneas encontradas em pacientes de UTI. p. 1– 93, 2014.

RODRIGUES, B. F. F. S. Engenharia de tecidos para regeneração da pele: retrospectiva e perspectivas futuras. p. 1–69, 2012.

ROLIM, K. M. C. et al. Permanência Da Membrana Semipermeável Na Pele Do Recém-Nascido : Um Cuidado Diferenciado. **Rev. Rene. Fortaleza**, v. 11, n. 1, p. 144–151, 2010.

SANTANA, G. M. DE. Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos baseado em agarose com a incorporação de ciprofloxacina para utilização como novo substituto temporário de pele. p. 105, 2015.

SANTOS, A. L. DOS et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar.

SANTOS, E. J. F. DO; SILVA, M. A. N. C. G. M. M. DA. Tratamento de feridas colonizadas / infetadas com utilização de polihexanida. **Revista de Enfermagem Referência**, v. III Série, n. 4, p. 135–142, 2011.

SANTOS, I. C. R. V. et al. Characterization of care for patients with wounds in Primary Care.

SANTOS, J. . et al. **Avaliação e tratamento de feridas**. [s.l: s.n.]. MELLO, G. M. R. Efeito de Elementos Betagênicos na Estabilidade de Fases e Propriedades de Ligas de Titânio para Implantes Ortopédicos. p. 113, 2004.

SANTOS, P. N. Análise do perfil das proteinases envolvidas no processo de cicatrização de lesões cutâneas experimentais utilizando o polissacarídeo de agoma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). **Agroforestry database: a tree species reference and selection guide version 4.0**, v. 0, p. 1– 52, 2009.

SAÚDE, M. DA. Cartilha para tratamento de emergência das queimaduras. **Secretaria de Atenção à Saúde**, v. 1, p. 20, 2012.

SECRETARIA DE SAÚDE DE FLORIANÓPOLIS, M. **Protocolo de cuidados de feridas**. [s.l: s.n.].

SEPÚLVEDA, L. et al. Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 22, p. 4518–4523, 2011.

SHIRZAD, H.; TAJI, F.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Correlation Between Antioxidant Activity of Garlic Extracts and WEHI-164 Fibrosarcoma Tumor Growth in BALB/c mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 969–974, 2011.

SIGMA-ALDRICH. **Sigma-Aldrich is now Merck**, 2010.

SILVA, M. R. O. Detecção da atividade antifúngica de extratos de plantas do manguezal de Vila Velha, Itamaracá-PE. 2004.

SMANIOTTO, P. H. S.; CARVALHO, R. G. V. F.; FERREIRA, M. C. Tratamento clínico das

SOUTO, A. L. Augusto Lopes Souto Constituintes químicos de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz (Combretaceae). Augusto Lopes Souto Constituintes químicos de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz (Combretaceae). João Pessoa – PB. 2011.

SOUZA, T. Hidrogel de quitosana em diferentes graus de desacetilação na cicatrização de feridas cutâneas de ratas diabéticas. 2016.

SUPP, D. M.; BOYCE, S. T. Engineered skin substitutes: practices and potentials. v. 23, n. 4, p. 403–4012, 2005.

VASCONCELOS, A. G.; ARAÚJO, K. V.; SANTANA, L. DE A. B. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde**, p. 27–51, 2015.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic Acid: a review. **Journal of Food Biochemistry**, p. 234–266, 2005.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Pelotas: Embrapa Clima Temperado**, p. 16, 2010.

WILLIAMS, D. F. There is no such thing as a biocompatible material. **Biomaterials**, v. 35, n. 38, p. 10009–10014, 2014.

WOISKY, R. G.; PALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures of chemical quality control. **J. of Apicultural Research**, v. 1713–1726, 1998.

YADAV, P. et al. Biomedical Biopolymers, their Origin and Evolution in Biomedical Sciences: A Systematic Review. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, v. 9, 2015.

ZUCULA, C. V. **Avaliação in vitro da atividade antifúngica de extratos de Plantas Kigelia Africana, Combretum Molle e Trichilia Emetica para o controle de fitopatógenos**. n. ii, p. 1–5, 2013.

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE MATERIAL BOTANICO

CA DRFB N° 120/2014

24 de outubro de 2014.

Ao Senhor

JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

Prezado Senhor,

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

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

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

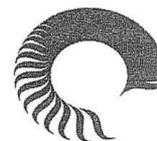
Atenciosamente,

**CINTHIA RENATA VIEIRA DE LIMA**

Diretoria de Recursos Florestais e Biodiversidade

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
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



Ofício nº 499/12

Recife, 29 de outubro de 2012

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira**
Departamento de Histologia e Embriologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.025194/2012-10

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, "*Atividades Biológicas de plantas do mangue Brasileiro*".

Concluímos 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 Depto. Fisiologia e Farmacologia da UFPE; Animais: Ratos; Sexo: macho e fêmea; Idade: 8 a 12 semanas; Peso: 225 a 275g; Número de animais previsto no protocolo: 60 animais.

RECEBIDO EM: 06/11/2012
NOME: JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA
ASSINATURA:

Atenciosamente,

Prof. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver