



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM - MESTRADO

FABIANI TENÓRIO XAVIER PÓVOAS

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CICATRIZANTE DE FERIDAS EM
RATOS UTILIZANDO O EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE *Tabebuia aurea*
(IPÊ AMARELO)**

Maceió

2015

FABIANI TENÓRIO XAVIER PÓVOAS

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CICATRIZANTE DE FERIDAS EM RATOS UTILIZANDO O EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE *Tabebuia aurea* (IPÊ AMARELO)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem – Mestrado da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Enfermagem na área de concentração: Enfermagem na promoção da vida e no cuidado em saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliane Aparecida Campesatto.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Maria Lysete de Assis Bastos.

**Maceió
2015**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecário
Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale

P000e Póvoas, Fabiani Tenório Xavier.
Estudo da atividade antimicrobiana e cicatrizante de feridas em ratos utilizando o extrato etanólico de folhas de *Tabebuia aurea* (ipê-amarelo) / Fabiani Tenório Xavier Póvoas. – 2015.
100 f. : il.

Orientadora: Eliane Aparecida Campesatto.
Coorientadora: Maria Lysete de Assis Bastos.
Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Alagoas.
Escola de Enfermagem e Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Enfermagem.
Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 79-90.
Apêndices: f. 91-97.
Anexos: f. 98-100.

1. Plantas medicinais. 2. *Tabebuia aurea*. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Feridas – Cicatrização. Enfermagem. I. Título.

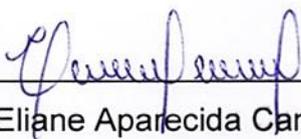
CDU: 616-083: 616-003.9

Folha de Aprovação

Autor: Fabiani Tenório Xavier Póvoas

“Estudo da atividade antimicrobiana e cicatrizante de feridas em ratos utilizando o extrato etanólico de folhas de *Tabebuia aurea* (ipê-amarelo)” / Dissertação de Mestrado em Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas.

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas na Área de concentração: Enfermagem no cuidado em saúde e promoção da vida e Linha de pesquisa: Enfermagem, Ciência, Tecnologia e Inovação para o cuidado, aprovada em 16 de dezembro de 2015.

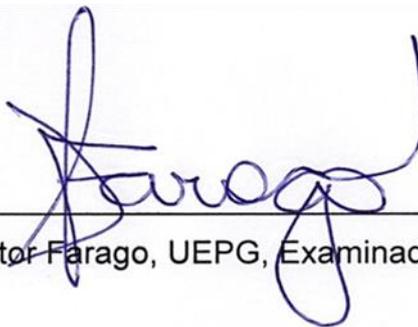


Profª Drª Eliane Aparecida Campesatto, UFAL, Orientadora



Profª Drª Maria Lysete de Assis Bastos, UFAL, Coorientadora

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, UEPG, Examinador Externo



Profª Drª Thaís Honório Lins Bernardo, UFAL, Examinador Interno

A Deus, luz dos meus caminhos e força para as conquistas.

À minha mãe Edneide, meus filhos Louise e Heitor e meu esposo Kléber. Vocês são a razão dos meus objetivos, energia para as realizações e conforto para meu coração. Amo vocês!

Dedico

AGRADECIMENTOS

A oportunidade de registrar a gratidão neste espaço é profundamente especial. Agradece-se porque se recebeu algo, porque fomos auxiliados, porque alguém se importou conosco, dedicou seu tempo, uma palavra, um gesto, um sentimento. Tudo isso e ainda mais eu recebi!

Sou profundamente grata a Deus, que permitiu que todos os meus esforços resultassem na conquista de mais um objetivo em minha vida. Nenhum esforço meu resultaria em vitória sem Sua permissão.

Agradeço à minha mãe Edneide, que com seu exemplo me ensinou a ser perseverante e determinada e que continuamente tenta me ensinar que sou capaz de muito, muito mais se eu aprender a confiar em mim.

Ao meu esposo Kléber e aos meus filhos Louise e Heitor, que se esforçaram para compreender a minha ausência (mesmo na presença física), que tiveram que lidar com meus momentos de ansiedade, inquietações e incertezas. Em especial à Louise que, além de filha, é companheira e amiga e esforçou-se para ser ainda mais responsável e dedicada à família, desenvolvendo a capacidade de doar-se em meu favor e para o bem de todos nós. Muito orgulho de você!

À minha orientadora Dr^a Eliane Campesatto, pela oportunidade de inserção na pesquisa experimental e pela confiança em mim depositada para realizar este trabalho.

À minha coorientadora Dr^a Lysete Bastos, pelo acolhimento em seu laboratório e por sua solicitude em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Paulo Vitor Farago e à Prof^a Dr^a Thais Honório por aceitarem o convite para compor a banca de defesa e pelas valiosas contribuições, trazendo sugestões imprescindíveis à melhoria do trabalho.

À querida amiga Dr^a Magnúcia Leite, pelo seu empenho em conseguir os animais de experimentação e concedê-los a mim, possibilitando a realização dos experimentos de cicatrização.

Aos amigos Max Denisson, Ana Carolina e Raíssa Pires. De vocês recebi estímulo, carinho, paciência, compreensão e todo o apoio necessário para iniciar minha trajetória na pesquisa experimental e desenvolvê-la.

À Talita Lucio, companheira de experimentos, mão amiga e dedicada pesquisadora. Sua ajuda foi fundamental!

Aos pós-graduandos e graduandos do LaFI, Aline Cavalcante, Anderson Leite, Giane Cavalcante, Flávio Monteiro, Edla Caroline e Layse Oliveira pela ajuda, conselhos e orientações nessa jornada.

Aos graduandos do Laboratório de pesquisa em Tratamento de Feridas (LpTF) que se disponibilizaram e se empenharam para que os experimentos de cicatrização pudessem ser desenvolvidos.

A Edeildo Ferreira e Paulo Fernando, pelo acolhimento e ajuda na obtenção do extrato vegetal e experimentos fitoquímicos além dos ensinamentos deste processo.

Às minhas amigas da (melhor) turma do mestrado, Silvana Barros, Keysse Suelen, Alba Bonfim, Lays Nogueira, Givânia Melo, Vivian Marcella, Bárbara Oliveira, Natália Palmoni, Marina Baptista e Talita Lucio. Deus faz tudo certo e me permitir fazer parte desta turma foi um presente maravilhoso. Alegria, companheirismo, aprendizado e tenacidade fizeram parte dos nossos momentos, e a saudade irá regar cada lembrança. Cada uma de vocês deixa em mim algo especial, pois são pessoas especiais.

A todos os amigos que torceram e torcem por mim; que vibram comigo nas conquistas, afligem-se nos desafios e que me amparam nos contratempos da existência. A vida é bem mais alegre e suave com a presença de vocês!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de estudos.

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre”.

Albert Einstein

“Basta-te minha graça, porque é na fraqueza que se revela totalmente a minha força”.

Paulo de Tarso
(II CORÍNTIOS, 12:9)

RESUMO

A pesquisa objetivou avaliar o potencial antimicrobiano e cicatrizante de feridas do extrato etanólico de folhas de *Tabebuia aurea*. O estímulo governamental às pesquisas científicas que busquem novas opções de tratamento à base de plantas medicinais, a necessidade de comprovação de eficácia e segurança terapêutica para a utilização do material vegetal pela população e que plantas do gênero *Tabebuia*, que possuem atividades biológicas cientificamente comprovadas e ademais, estão presentes em grande número em solo brasileiro justificam este estudo. Para a concretização dos objetivos propostos, foi realizado o preparo do extrato etanólico de folhas de *Tabebuia aurea* (EETA), em seguida, realizou-se seu fracionamento obtendo as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica. Foram realizados testes de prospecção fitoquímica, avaliação da viabilidade celular *in vitro* pelo método de Metiltetrazólio, determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para bactérias e fungos e avaliação da atividade cicatrizante de feridas cutâneas em ratos a partir da aplicação tópica do EETA a 5%. A prospecção fitoquímica foi positiva para alguns metabólitos secundários da classe dos compostos fenólicos e esteroides. O teste de citotoxicidade em células da linhagem J774.A1 demonstrou citotoxicidade nas concentrações de 500, 100 e 10 µg/mL e viabilidade celular na concentração de 1 µg/mL. Na avaliação da CIM, o EETA não inibiu o crescimento dos microrganismos testados, muito embora as frações hexânica e clorofórmica do EETA demonstraram atividade na concentração de 1000 µg/mL para a bactéria *Escherichia coli*. Nenhuma das frações inibiu o fungo *Candida albicans*. No estudo da atividade cicatrizante de feridas na avaliação macroscópica das feridas, o grupo EETA apresentou menor rubor perilesional e inflamação no processo inicial da cicatrização e formação de crosta espessa aderida à ferida, o que interferiu na retração das bordas apresentando percentual de contração negativo até o 11º dia de tratamento (-35,40%, -8,85% e -1,18%) e positivo no 14º (22,71%). Os grupos controles positivo e negativo demonstraram semelhança na evolução da cicatrização, apresentando percentual de contração de 85,54% e 80,23%, respectivamente, no 14º dia. A análise histopatológica das feridas não demonstrou significância estatística na cicatrização entre os grupos no 3º e 7º dias, e significância para o grupo EETA no 14º dia, mostrando reepitelização inferior aos grupos positivo e negativo relacionado à formação de crosta. A avaliação macroscópica e histopatológica do fígado e dos rins não apresentou sinais de toxicidade assim como não houve alteração na avaliação bioquímica, indicando que o EETA utilizado topicamente por 14 dias não promove danos no modelo animal utilizado. Conclui-se que o EETA não possui atividade antimicrobiana e as frações hexânica e clorofórmica possuem fraca atividade para a bactéria *E. coli*; demonstrou citotoxicidade *in vitro* em concentração a partir de 10 µg/mL e ausência de toxicidade *in vivo*; sua atividade cicatrizante não foi superior aos controles avaliados neste estudo. Sugere-se investir em estudos que avaliem a atividade anti-inflamatória do EETA.

Palavras-chave: Plantas medicinais; *Tabebuia aurea*; Antimicrobianos; Cicatrização de feridas; Enfermagem

ABSTRACT

The research aimed to evaluate the antimicrobial potential and healing of wounds of the ethanol extract of leaves of *Tabebuia aurea*. The government stimulus to scientific research to seek new treatment options based on medicinal plants; the need for proof of efficacy and safety for the use of plant material by the population; and *Tabebuia* genus plants have scientifically proven biological activities and in addition, are present in large numbers on Brazilian soil justify this study. To achieve the proposed objectives was carried out the preparation of the ethanol extract of leaves of *Tabebuia aurea* (EETA), and then held its fractionation, obtaining the fractions hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. Phytochemical tests were conducted assessing cell viability *in vitro* by Methyl tetrazolium method of determining the minimum inhibitory concentration (MIC) for bacteria and fungi and evaluation of the healing activity of skin wounds in rats from topical application of EETA 5%. The phytochemical screening was positive for some secondary metabolites of the class of phenolic compounds and steroids. The cytotoxicity test J774.A1 lineage cells showed cytotoxicity at concentrations of 500, 100 and 10 µg/mL and cell viability at the concentration of 1 µg/mL. In assessing the MIC, the EETA did not inhibit the growth of microorganisms tested, although the hexane fractions and chloroform the EETA showed activity at 1000 µg/mL for *Escherichia coli* bacteria. None of the fractions inhibited the fungus *Candida albicans*. In the study of healing activity healing, the macroscopic assessment of wounds, the EETA group had lower redness close to the lesion and inflammation in the initial process of wound healing and formation of a thick crust adhering to the wound, which interfere with the retraction of the edges, with the percentage of negative contraction until the 11th day of treatment (-35.40%, -8.85% and -1.18%) and positive in 14th (22.71%). The positive and negative control groups showed similarity in the evolution of healing, with the percentage of contraction of 85.54% and 80.23%, respectively, on the 14th day. The histopathology of the wounds showed no statistical significance in healing between groups at 3 and 7 days, and significance to the EETA group on the 14th day, showing reepitelization below the positive and negative groups, related to the formation of crust. Macroscopic and histopathological evaluation of liver and kidney, showed no signs of toxicity and no change in biochemical evaluation, indicating that the EETA used topically for 14 days does not promote damage to the animal model used. Concludes that the EETA not have antimicrobial activity and hexane fractions and chloroform have weak activity to the bacterium *E. coli*; demonstrated cytotoxicity *in vitro* at concentrations from 10 µg/mL and no *in vivo* toxicity; his healing activity was not superior to controls in this study. It is suggested invest in studies evaluating the anti-inflammatory activity EETA.

Keywords: Medicinal plants; *Tabebuia aurea*; Antimicrobials; Wound healing; Nursing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvores, folhas e flores da espécie <i>Tabebuia aurea</i> (Silva Manso) Benth. & Hook. F. ex. S. Moore	20
Figura 2 - Esquema dos eventos envolvidos na resposta inflamatória	31
Figura 3 - Processo de preparo do EETA pelo método de maceração a frio com álcool etílico até a obtenção do extrato	40
Figura 4 - Procedimento cirúrgico para a confecção de ferida. Rato epilado (A), antissepsia de sítio cirúrgico (B), confecção de ferida com <i>punch</i> (C), resultado da excisão sem retirada da pele (D), resultado final da excisão cirúrgica e retirada da pele (E)	49
Figura 5 - Realização do curativo pós-cirúrgico. Irrigação da ferida com SF a 0,9% (A); cobertura da ferida com gaze estéril (B); curativo finalizado, coberto com atadura e fixado com esparadrapo (C)	49
Figura 6 - Evolução macroscópica do tratamento das feridas por grupo e dias de avaliação	63
Figura 7 - Fotomicrografia de feridas cutâneas relacionando dias de avaliação e tratamento utilizado	69
Figura 8 - Fotomicrografia de tecido hepático mostrado de acordo com grupo de tratamento	74
Figura 9 - Fotomicrografia de tecido renal mostrado de acordo com grupo de tratamento	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Levantamento bibliográfico de pesquisas experimentais sobre atividades biológicas comprovadas do gênero <i>Tabebuia</i>	22
Tabela 2 - Sistema de avaliação de feridas proposta por Keast et al. (2004)	36
Tabela 3 - Avaliação fitoquímica para a presença de metabólitos secundários presentes no EETA	53
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima obtida do extrato e suas frações	57
Tabela 5 - Variação das áreas das feridas (cm ²) dos grupos EETA, controle positivo (CP) e controle negativo (CN) nos dias de avaliação macroscópica expresso como média (M) e erro padrão da média (E.P)	65
Tabela 6 - Percentual de contração da ferida (%) em relação ao tamanho original mostrado por grupo: EETA, controle positivo (CP) e controle negativo (CN) e por dias de avaliação macroscópica	67
Tabela 7 - Escores da avaliação histopatológica das feridas dos grupos EETA, controle positivo e controle negativo	67
Tabela 8 - Peso dos órgãos (rins e fígado) dos grupos EETA, controle positivo (CP) e controle negativo (CN) expresso como média (M) e erro padrão da média (E.P)	70
Tabela 9 - Resultados dos valores bioquímicos dos grupos EETA, controle positivo (CP) e controle negativo (CN) expresso como média (M) e erro padrão da média (E.P)	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resultado do EETA sobre a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774.A1 nas concentrações de 500, 100, 10 e 1 µg/mL obtido pelo método colorimétrico de MTT em 48 horas	55
Gráfico 2 - Média da avaliação do peso dos animais por grupo experimental desde a fase de adaptação ao término do experimento	59
Gráfico 3 - Média das temperaturas obtidas por grupo experimental avaliadas desde a fase de adaptação ao término do experimento	60
Gráfico 4 - Variação média da área das feridas (cm ²) de acordo com grupo de tratamento e segundo os dias de avaliação	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas obtida em cada fração	23
Quadro 2 - Colorações indicativas das reações para a presença dos metabólitos: antocianinas e antocianidinas; flavonas, flavonóis e xantonas; chalconas e auronas e flavanonóis	42
Quadro 3 - Colorações indicativas das reações para a presença dos metabólitos: leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	43
Quadro 4 - Resultado dos achados da evolução macroscópica das feridas delineada por grupo e dias de avaliação	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área
Af	Área final
Ai	Área inicial
ANOVA	Análise de variância
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CIM	Concentração inibitória mínima
CN	Controle negativo
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CP	Controle positivo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPO	Dia pós-operatório
EETA	Extrato etanólico de <i>Tabebuia aurea</i>
EGF	Fator de crescimento endotelial
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
IL-1	Interleucina1
i.p.	Intraperitoneal
MAC	Medicina Alternativa e Complementar
MEC	Matriz extracelular
MH	<i>Müller-Hinton</i>
MMPs	Metaloproteinases
MS	Ministério da Saúde
MT	Medicina Tradicional
MTT	Metiltetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE₂	Prostaglandina 2
pH	Potencial de hidrogênio
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde
PNPMF	Programa Nacional Plantas Medicinais e Fitoterápicos

R	Raio maior
r	Raio menor
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SF	Soro fisiológico
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF-β	Fator de Crescimento Tumoral – β
TIMPs	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TTC	Cloreto de Trifenil Tetrazólio
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UNCISAL	Universidade Estadual de Ciências da Saúde
%C	Percentual de contração

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	<i>Tabebuia aurea</i>	20
2.2	Metabólitos secundários em plantas	23
2.3	Uso de plantas medicinais na obtenção de antimicrobianos	25
2.4	Pele: da anatomia à cicatrização de feridas	27
2.4.1	Anatomia e fisiologia da pele	27
2.4.2	Fisiologia do processo cicatricial.....	30
2.4.2.1	Fase inflamatória.....	31
2.4.2.2	Fase proliferativa.....	33
2.4.2.3	Fase de remodelamento.....	34
2.4.3	Classificação e avaliação das feridas	34
2.4.4	Enfermagem, cicatrização de feridas e plantas medicinais.....	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo Geral	38
3.2	Objetivos Específicos	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Tipo de estudo e local de experimento	39
4.2	Aspectos éticos	39
4.3	Coleta e identificação da amostra vegetal	39
4.4	Preparo do extrato vegetal	40
4.5	Fracionamento do EETA	41
4.6	Prospecção fitoquímica	42
4.7	Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	44
4.7.1	Ensaio de viabilidade celular	44
4.7.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	45
4.8	Ensaio biológicos <i>in vivo</i>	47
4.8.1	Crems para uso tópico.....	48
4.8.2	Confecção da ferida e tratamento.....	48
4.8.3	Análise morfométrica da ferida	50

4.8.4	Análise bioquímica e histopatológica das feridas e dos órgãos	50
4.8.5	Testes estatísticos	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	Prospecção fitoquímica	53
5.2	Ensaio biológico <i>in vitro</i>	54
5.2.1	Teste de avaliação da viabilidade celular	54
5.2.2	Avaliação da concentração inibitória mínima	56
5.3	Bioensaio de cicatrização <i>in vivo</i>	59
5.3.1	Observação clínica	59
5.3.2	Avaliação macroscópica da cicatrização das feridas	61
5.3.3	Avaliação morfométrica da ferida	65
5.3.4	Avaliação histopatológica da ferida	67
5.3.5	Peso e avaliação de aspectos macroscópicos/morfológicos dos órgãos	69
5.3.6	Análise bioquímica	71
5.3.7	Análise histopatológica dos órgãos	73
6	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICES	91
	ANEXOS	98

1 INTRODUÇÃO

Imperativos de alimentação, moradia ou abrigo, construção, assim como garantia da manutenção ou melhoria da saúde permitiram vincular o homem ao seu único recurso disponível nos primórdios da humanidade: as plantas (ZUCCHI et al., 2013). Destarte, o emprego de extratos vegetais com objetivos medicinais é uma das mais antigas formas de cuidado em saúde utilizado pela humanidade (GONÇALVES; ALVES-FILHO; MENEZES, 2005).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde – OMS, em países em desenvolvimento, para o combate primário às doenças, cerca de 80% da população utilizam práticas tradicionais e 85% utilizam as plantas medicinais (BRASIL, 2006b), estando ambas inseridas no contexto da Medicina Tradicional (MT). Denomina-se MT a realização de práticas de saúde que consideram um conjunto de crenças e valores culturais utilizados nos cuidados em saúde, sejam cuidados com a saúde física ou mental, que variam de acordo com a região ou país e também recebem o nome de Medicina Alternativa e Complementar – MAC (OMS, 2013).

Essa ampla utilização de plantas medicinais pela população no tratamento de saúde sugere que deve haver uma preocupação da segurança terapêutica destas, não sendo possível confiar integralmente nas tradições populares. São necessárias, portanto, pesquisas científicas que comprovem a eficácia e a segurança terapêutica para benefício dos consumidores.

Nessa perspectiva, a OMS, ao final da década de 70, expressou seu compromisso com a formulação e implementação de políticas públicas para consumo racional e integrado da MT/MAC nos sistemas nacionais de atenção à saúde, criando o Programa de Medicina Tradicional, que também recomenda aos Estados-membros o desenvolvimento de estudos científicos para melhor conhecimento da segurança, eficácia e qualidade das práticas da MT/MAC. (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b)

No Brasil, a partir das recomendações da OMS e apoio do Ministério da Saúde (MS), foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) no ano de 2006. Entre as Práticas Integrativas inclusas nesta política estão: acupuntura, homeopatia, crenoterapia e medicina antroposófica e plantas medicinais e fitoterapia, tendo a inserção deste último item alavancado as pesquisas nessa área, sendo essencial dentro das políticas

públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social (BRASIL, 2006a).

Em seguida da criação da PNPIC, foi criada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) ainda no ano de 2006 com o objetivo de “*garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos [...]*” (BRASIL, 2006b). Essa política teve um propósito de sustentabilidade, geração de emprego e renda através da agricultura familiar, inclusão social e desenvolvimento industrial e tecnológico (BRASIL, 2006b).

Apesar da implementação das políticas públicas no contexto da MT e no uso de plantas medicinais, há a predominância do tratamento de saúde alopático, principalmente relacionado ao tratamento de infecções e de cicatrização de feridas. O consumo indiscriminado de antimicrobianos favoreceu o desenvolvimento da multirresistência microbiana, sendo atualmente um grave problema de saúde pública, necessitando que pesquisas sejam desenvolvidas no intuito de descobrir medicamentos adequados a esse contexto, sendo o estudo de plantas evidencia dessa possibilidade. No que concerne ao tratamento de feridas, as plantas medicinais se apresentam como um recurso terapêutico alternativo ao alopático, buscando, também, ser menos oneroso para a população.

O Brasil é um país de grande potencialidade para as pesquisas com plantas medicinais, possui um bioma vasto (o maior do planeta) e sua flora detém uma rica constituição, entre 15 a 20% da biodiversidade mundial (BRASIL, 2006b), sendo conhecidas, até o momento, um total de 44.097 espécies (REFLORA, 2014).

Considerando a imensa vegetação e biodiversidade ofertadas pelo solo brasileiro, tem-se a *Tabebuia aurea*, árvore comum na Caatinga, um bioma exclusivamente brasileiro. Sua flor é símbolo do Brasil e a árvore, símbolo do Estado de Alagoas. Pesquisas experimentais básicas evidenciaram atividades biológicas para o gênero como anti-inflamatória (LEE et al., 2012), antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2007; HÖFLING et al., 2010), antioxidante (HEMAMALINI; BHARGAVA, 2013; OSPINA et al., 2013) e cicatrizante de feridas (COELHO et al., 2010; LIPINSKI et al., 2012), contudo essa espécie tem sido pouco estudada.

Portanto, o estímulo governamental a pesquisas científicas que buscam novas opções de tratamento a base de plantas medicinais associado à necessidade de comprovação de eficácia e segurança terapêutica para a utilização pela população do material vegetal, livre de danos à saúde, oriundo do gênero *Tabebuia*, que possuem

algumas atividades biológicas já descritas na literatura (apesar do fato de que alguns ainda carecem de comprovação científica), foram fatores determinantes que justificaram a realização deste estudo, buscando assim avaliar o potencial terapêutico da *Tabebuia aurea* como antimicrobiana e cicatrizante de feridas a partir do extrato etanólico de suas folhas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Tabebuia aurea*

Tabebuia aurea (Silva Manso) Benth & Hook. F. ex S. Moore (Figura 1) é uma árvore pertencente à família Bignoniaceae. A família Bignoniaceae apresenta 120 gêneros e cerca de 800 espécies sendo que, no Brasil, ocorrem 32 gêneros e cerca de 350 espécies, considerado, por este motivo, o centro de diversificação da família (CHAGAS JÚNIOR; CARVALHO; MANSANARES, 2010).

Figura 1 - Árvores, folhas e flores da espécie *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. F. ex. S. Moore



Fonte: FLORA italiana. Disponível em:
<<http://luirig.altervista.org/schedenam/fnam.php?taxon=Tabebuia+aurea>>

Terpenoides, quinonas, derivados nitrogenados de cadeia longa da via do ácido acético, alcaloides, derivados nitrogenados especiais e flavonoides são os principais metabólitos encontrados nessa família, sendo a naftoquinona lapachol, atualmente, a mais importante estrutura química delas provenientes, visto seu potencial anticancerígeno comprovado (CIPRIANI et al., 2012).

A *Tabebuia aurea* é conhecida popularmente por 'ipê-amarelo', outros nomes populares a ela atribuídos são caraíba, cinco folhas do campo, pau d'arco e paratudo

(LOHMANN, 2014). Possui alguns sinônimos científicos, sendo relevantes *Bignonia aurea*, *Handroanthus caraiba*, *Tabebuia caraiba*, *Tecoma aurea* e *Tecoma caraiba* (REFLORA, 2014).

A *T. aurea* está presente em todas as regiões do Brasil, contudo, sua maior prevalência se encontra na região Nordeste nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe (REFLORA, 2014). Tem por domínio de distribuição fitogeográfica a Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (REFLORA, 2014). No estado de Alagoas foi considerada árvore símbolo (Decreto nº 6.239/85) e um de seus municípios recebeu seu nome – Craíbas – em homenagem (ALAGOAS, 1985).

Em uso como planta medicinal, pesquisas etnobotânicas verificaram que o gênero *Tabebuia* é empregado principalmente para o tratamento de dores e inflamações, contudo, é também utilizado para tratamento de diversas outras afecções como câncer, tuberculose, malária, problemas de estômago, influenza, congestão nasal, antimicrobiano, antisséptico, tratamento de feridas e picada de cobra (AGRA et al., 2007, ALBUQUERQUE et al., 2007a; ALBUQUERQUE et al., 2007b; CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010; FERREIRA JÚNIOR, LADIO, ALBUQUERQUE, 2011; HAJDU; HOHMANN, 2012; RIBEIRO et al., 2014; SARAIVA et al., 2015).

Pesquisas experimentais básicas comprovam algumas atividades biológicas do gênero demonstrando potenciais bioativos para o desenvolvimento de mais pesquisas que envolvam isolamento de metabólitos e estudos clínicos. Os dados da bibliometria (Tabela 1) demonstraram que são escassas as publicações que avaliaram os potenciais antimicrobiano, anti-inflamatório, cicatrizante e antioxidante de plantas do gênero *Tabebuia*, contemplando 17 artigos, enquanto que a *T. avellanae* (ipê-roxo) é a mais estudada dentre todas as espécies pertencentes ao gênero e as demais espécies possuem estudos incipientes para todas as bioatividades avaliadas na busca.

O potencial cicatrizante de feridas foi abordado em apenas duas pesquisas e a espécie *T. avellanae*, a única avaliada nesse contexto (COELHO et al., 2010; LIPINSKI et al., 2012). A ação antimicrobiana foi a atividade mais avaliada, contudo, para a espécie *T. aurea*, apenas um estudo da atividade antifúngica e uma anti-inflamatória foi encontrada, mostrando a necessidade de mais estudos relacionados à espécie.

Tabela 1 - Levantamento bibliográfico de pesquisas experimentais sobre atividades biológicas comprovadas do gênero *Tabebuia*

Espécie	Atividade biológica comprovada	Parte da planta
<i>Tabebuia aurea</i>	-Atividade antifúngica (SILVA; PAULA; ESPINDOLA, 2009). -Atividades anti-inflamatórias, anti-miotóxicas e anti-hemorrágicas (REIS et al., 2014).	Entrecasca e caule Casca do caule
<i>Tabebuia avellanedae</i>	-Ação bacteriostática e bactericida (OLIVEIRA et al., 2007). -Ação anti-inflamatória <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (BYEON et al, 2008). -Cicatrizante de feridas (COELHO et al., 2010). -Atividade antifúngica (HÖFLING et al., 2010). -Efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos (<i>in vivo</i>) (LEE et al., 2012). -Cicatrizante de feridas (LIPINSKI et al., 2012).	Casca do caule Entrecasca Casca do caule Casca do caule Entrecasca Caule (serragem)
<i>Tabebuia chrysanta</i>	-Atividade antioxidante (<i>in vitro</i>) e anti-inflamatória (<i>in vivo</i>) (OSPINA et al., 2011).	Folhas
<i>Tabebuia heptaphylla</i>	-Atividade antioxidante (<i>in vitro</i>) (BUDNI et al., 2007).	Folhas
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	-Atividade antioxidante e antibacteriana (VASCONCELOS et al., 2014).	Folhas, ramos e casca do caule
<i>Tabebuia ochracea</i>	-Atividade antioxidante (OSPINA et al., 2013).	Entrecasca
<i>Tabebuia phentaphylla</i>	- Atividade antibacteriana (ROCHA et al., 2013).	Casca do caule e folhas
<i>Tabebuia rosea</i>	-Atividade anti-inflamatória (<i>in vivo</i>) (HEMAMALINI; BHARGAVA, 2013; OSPINA et al., 2013). -Atividade antioxidante (BHUVANESWARI et al., 2014).	Folhas / entrecasca Flores Casca do caule
<i>Tabebuia serratifolia</i>	-Atividade antiprotozoária (GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2012).	Flores Casca do caule

Fonte: Base de dados Pubmed, ScienceDirect, Scopus, SciELO e Lilacs, 2015.

2.2 Metabólitos secundários em plantas

Os metabólitos secundários, inicialmente, foram considerados como produtos de excreção das plantas, contudo, estudos posteriores permitiram gradualmente abarcar suas atividades biológicas (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Tais atividades compreendem não apenas a adaptação ou proteção da planta aos estímulos de seu ambiente, aumentando sua probabilidade de sobrevivência, mas também demonstraram importância comercial na área farmacêutica (devido a imensa atividade farmacológica), alimentar, perfumaria, entre outras (FUMAGALI, 2008; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Para a investigação de suas atividades medicinais correlacionam-se os estudos químicos e farmacológicos à etnobotânica (ROSSATO et al., 2012). Com o intuito de investigar a presença de constituintes químicos presente em material vegetal, realiza-se o preparo de extrato vegetal para posterior investigação através de prospecção fitoquímica.

Recomenda-se que o extrato vegetal seja submetido a um processo chamado partição ou fracionamento utilizando solventes de polaridades crescentes com o objetivo de semi-purificação das substâncias para, posteriormente, testar os potenciais bioativos das frações (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Cada solvente orgânico utilizado transporta consigo metabólitos relacionados à sua polaridade. Caso apresente resultado para algum potencial biológico testado, a fração é candidata ao isolamento e purificação de seus compostos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Finalizado o processo de fracionamento obtêm-se, em cada fração, possíveis substâncias carregadas como mostra o quadro 1.

Quadro 1 - Separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas obtida em cada fração

Fração hexânica	Fração clorofórmica	Fração de acetato de etila	Fração metanólica
Esteroides Terpenos Acetofenonas	Flavonóides Metoxilados Terpenos Cumarinas	Flavonóides Taninos Xantonas Saponinas Compostos fenólicos	Flavonóides glicosilados Taninos Saponinas Carboidratos

Fonte: Adaptado de Cechinel Filho e Yunes, 1998.

Compostos fenólicos, alcaloide, terpenos e esteroides são considerados a principal família de metabólitos secundários (FUMAGALI et al., 2008). Os taninos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais e atuam como antioxidante, antisséptico, cicatrizante e vasoconstritor (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Como cicatrizante de feridas e queimaduras, os taninos produzem uma camada protetora devido sua capacidade de precipitar proteínas (complexo tanino-proteína) sobre tecidos epiteliais lesionados sem impedir que abaixo dessa camada o processo de cicatrização evolua normalmente (SIMÕES et al., 2000).

Já os flavonóides possuem múltiplos efeitos biológicos como atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, poder de redução da fragilidade e permeabilidade capilares, inibição da destruição do colágeno a agregação plaquetária (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Outra característica é sua atividade antibiótica provavelmente relacionada à capacidade de formar complexos com proteínas solúveis e extracelulares e com a parede de células bacterianas (DESOTI et al., 2011).

Araújo et al. (2008) refere que os compostos fenólicos (incluindo taninos e flavonóides) estão presentes em praticamente 100% das plantas medicinais utilizadas na Caatinga como anti-inflamatória, cicatrizante e antioxidante. De acordo com Talhouk et al. (2007), é possível presumir que a presença de compostos flavonóides e taninos está correlacionada positivamente com propriedade cicatrizante e anti-inflamatória, no entanto, compostos como saponinas, alcaloides, sesquiterpenos glucosídeos e sesquiterpenos lactonas podem demonstrar propriedades semelhantes.

As antraquinonas, que pertencem à classe das quinonas, são substâncias cristalinas de cor amarela a vermelha e constituem o maior grupo de quinonas naturais bastante utilizadas como corantes (SANTOS; SILVA; BRAZ FILHO, 2008) e, também, o de maior interesse terapêutico (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). Farmacologicamente, estimula a musculatura lisa possuindo propriedade laxante. A família Bignoniaceae, principalmente a espécie *T. avellanedae*, tem sido estudada quanto à uma quinona isolada de sua casca: o β -Lapachol. Essa substância está sendo avaliada quanto ao seu mecanismo de ação indicando forte propriedade farmacológica antitumoral (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

Os esteroides destacam-se pela capacidade em reduzir a absorção do colesterol da dieta reduzindo os níveis sanguíneos de colesterol circulante e o risco de doenças cardiovasculares como também inibe o crescimento de certos tipos de tumores malignos (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Com grande diversidade estrutural, aos alcaloides é atribuída uma variedade de atividades biológicas dentre elas cita-se principalmente: ação anticolinérgica, anti-hipertensiva, antimalárica, antitumoral, antitussígena, antiviral (DUARTE; MOTA; ALMEIDA, 2014).

Como mostrado, cada classe de metabólitos está relacionada a algumas propriedades biológicas, contudo, isso não permite inferir qual bioatividade surgirá da interação entre essas diversas classes presentes em um extrato vegetal. Nesse contexto, tudo dependerá da concentração da classe de metabólito, da interação e do possível sinergismo ou antagonismo existente entre eles.

2.3 Uso de plantas medicinais na obtenção de antimicrobianos

Apesar de todos os recursos farmacológicos existentes, doenças infecciosas ocasionam mais de 10 milhões de mortes por ano nos países em desenvolvimento (MITCHELL et al., 2012). Os agentes infecciosos são classificados em príons, vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos e ectoparasitas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). O organismo humano possui mecanismos de defesa natos, que estão prontos para combater infecções, sendo a primeira linha de defesa contra patógenos, denominada imunidade inata (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Muito embora haja a resposta imune inata, esta não é eficaz em todos os momentos, visto não conseguir distinguir diferenças discretas entre os microrganismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Há também a resposta adaptativa do organismo (imunidade adaptativa, específica ou adquirida), que ocasiona a produção de anticorpos, sendo eficiente por sua especificidade na neutralização de antígenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Contudo, essa sensibilização, ou produção de anticorpos, só é possível após infecção primária, tornando-se mais eficiente apenas após um segundo contato.

A indústria farmacêutica investe em pesquisas objetivando descobrir métodos para o combate desses agentes infecciosos, seja auxiliando o indivíduo na produção de anticorpos através das vacinas, seja produzindo medicamentos antimicrobianos capazes de eliminá-los do organismo.

São consideradas antimicrobianas “substâncias naturais (antibióticos) ou sintéticas (quimioterápicos) que agem sobre microrganismos inibindo o seu crescimento ou causando a sua destruição” (MOTA et al., 2010). A produção de

medicamentos antimicrobianos permitiu que a morbimortalidade por infecções diminuísse gradativamente no decorrer dos anos muito embora as infecções ainda sejam grave problema de saúde pública.

Em 2014, a OMS lança o primeiro relatório sobre resistência antimicrobiana considerando o caso como ameaça global (OMS, 2014). Ainda em 2014, pesquisa realizada pelo Instituto Latino Americano de Sepse em 229 Unidades de Terapia Intensiva brasileiras concluiu que a sepse provocou uma mortalidade de 55% dos pacientes internados, sendo que, no país, a mortalidade por sepse é de 65% dos casos enquanto a média mundial está em torno de 30 a 40% (ILAS, 2015).

As infecções fúngicas aumentam progressivamente, sendo as dermatomicoses as principais infecções relacionadas a esse crescimento e o fungo *Candida albicans*, o principal relacionado a essas infecções (RAMOS et al., 2012). A capacidade adaptativa destes faz com que os fármacos antifúngicos disponíveis não consigam a eficácia esperada desencadeando a recorrência e também ocasionando resistência (RAMOS et al., 2012).

A indústria farmacêutica investiu na produção de novos fármacos e na modificação daqueles existentes (SANTOS et al., 2007; DUARTE, 2006), contudo, não foi possível coibir a resistência microbiana. Apesar do arsenal científico, tecnológico e farmacológico disponível, a multirresistência microbiana é fato hodierno e leva à busca de novas terapias medicamentosas capazes de contornar essa habilidade adaptativa natural, especialmente, de bactérias e fungos.

Por esse motivo, extratos vegetais e outros produtos naturais têm sido objeto de estudo para produção de medicamentos que sejam utilizados como tratamentos alternativos eficazes de baixa toxicidade que não permitam a adaptabilidade desses patógenos, além de menor impacto ambiental (BONA et al., 2014).

Michelin et al. (2005) afirmam que os antibióticos vegetais possuem diferenças químicas que – pela ação sinérgica de seus compostos (MACIEL et al., 2002) – “podem regular o metabolismo intermediário de patógenos ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas”. Taninos, flavonóides e terpenos são referidos como metabólitos secundários capazes de alterar a permeabilidade da membrana celular, facilitando a penetração de antibióticos (MATIAS et al., 2013).

O uso de extratos apresenta um baixo risco para desenvolver resistência devido à sua combinação complexa de metabólitos, induzindo dificuldades adaptativas para

esses patógenos (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003). É importante que a exploração da bioatividade de materiais vegetais ocorra a partir de suas fontes renováveis, como folhas e frutos (MELO et al., 2008), com o objetivo de sustentabilidade e preservação ambiental.

A avaliação do potencial antimicrobiano para bactérias e fungos a partir das folhas de *T. aurea* se enquadra nesta necessidade urgente em buscar novos medicamentos à base de plantas que forneçam perspectivas para tratamento alternativo adequado à necessidade de resolução do problema da resistência microbiana.

2.4 Pele: da anatomia à cicatrização de feridas

2.4.1 Anatomia e fisiologia da pele

A pele é um manto, um revestimento corporal, que tem por função encarcerar órgãos, promovendo a proteção destes do meio externo (MENDONÇA; RODRIGUES, 2011). Representa 12% do peso seco total do corpo, pesa 4,5 quilos e é o maior órgão do corpo humano (MENDONÇA; RODRIGUES, 2011). Possui uma complexidade estrutural que permite ao tegumento exercer diferentes funções como de proteção, além dessa desempenha papel termorregulador, perceptor de estímulos, de excreção, absorção, imunidade e metabolismo do cálcio que se dá através da ativação da vitamina D pela absorção de raios ultravioleta B (IRION, 2012).

É composta por duas camadas primárias separadas por uma membrana basal: epiderme e derme (COLWELL, 2009; IRION, 2012). A primeira é a mais externa e possui várias camadas ou estratos, a segunda, mais interna, é formada por tecido conjuntivo e poucas células (COLWELL, 2009; MENDONÇA; RODRIGUES, 2011). Cada uma delas possui suas peculiaridades histológicas e fisiológicas.

Epiderme

O tecido epitelial caracteriza-se por várias camadas celulares, unidas firmemente umas às outras por junções intercelulares entre as quais há pouca matriz extracelular (DEALEY, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A aderência que existe entre as células epidérmicas permite a principal função correspondente a esse tecido: de revestimento de superfícies, seja esse revestimento externo ou interno

(JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Distinguem-se por serem avasculares, estando separadas e aderidas ao mesmo tempo ao seu tecido subjacente, o conjuntivo, pela lâmina basal, que é formada basicamente por colágeno tipo IV, laminina e proteoglicanas produzidos em parte pelas próprias células epiteliais e em parte pelas células do tecido conjuntivo, especificamente as fibras reticulares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A epiderme é um epitélio estratificado pavimentoso, sendo assim denominada visto à diferenciação celular dos queratinócitos, as principais células epidérmicas, formando cinco camadas celulares distintas: a *camada germinativa ou basal* – mais profunda composta por células basais e melanócitos; a *camada espinhosa ou malpighiana* – constituída por células de formato poliédrico, que se achatam progressivamente ao se direcionar à superfície; a *camada granulosa* – formada por células que possuem grande quantidade de grânulos de queratoialina, responsáveis pelo espessamento da epiderme por queratinização; o *estrato lúcido* – encontrado em tecidos onde a pele é mais grossa; e, por fim, a *camada córnea* – formada por células anucleadas constituídas de queratina, que objetivam prevenir a desidratação e a entrada de certos agentes químicos (MEIRELES; SILVA, 2008; COLWELL, 2009).

A partir da camada germinativa, as células se proliferam e migram para a camada externa, a camada córnea, na qual se achatam e morrem, sendo eliminadas no processo de descamação (COLWELL, 2009). Esse movimento contínuo promove a substituição das células superficiais normalmente eliminadas (COLWELL, 2009).

Os queratinócitos, assim chamados por produzir filamentos de queratina, conforme migram da camada basal à superfície (camada córnea), formam a barreira física da pele (IRION, 2012).

Outras células constituintes da pele, contudo menos numerosas, são os melanócitos, as células de Langerhans e os receptores de Merkel. Os melanócitos são células que possuem prolongamentos citoplasmáticos e se ligam aos queratinócitos circunvizinhos, aproximadamente 30, liberando melanossomos os quais possuem melanina (pigmento responsável por dar cor à pele) e são captados pelos queratinócitos (IRION, 2012). As células de Langerhan, também denominadas células dendríticas, são responsáveis pela imunovigilância da pele, atuando tanto na resposta imunitária inata quanto adaptativa. Quando imaturas fagocitam antígenos e quando maduras apresentam o antígeno aos linfócitos T (CURVINEL et al., 2010).

As células de Merkel são encontradas na camada basal da epiderme presas ao queratinócitos pelos desmossomos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), sua terminação nervosa possui forma discoide achatada, o disco de Merkel, responsável por captar estímulos de pressão, estando presentes nas mãos e pés, muito embora, em maior abundância nos dedos das mãos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Derme

A derme é formada por tecido conjuntivo e é nele que a epiderme se apoia. É responsável pela nutrição do tecido epitelial e possui alta capacidade regenerativa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Possui função estrutural, de manutenção da forma corporal além de papéis biológicos como: reserva de fatores de crescimento que controlam a proliferação e a diferenciação celular, meio de trocas de nutrientes entre células e suprimento sanguíneo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Nela, encontramos os anexos da pele (glândulas sebáceas, pelos, glândulas sudoríparas e unhas), as terminações nervosas livres, vasos linfáticos e capilares sanguíneos (MENDONÇA; RODRIGUES, 2011).

A derme possui duas camadas: a papilar e a reticular. A camada papilar consiste em fibras de colágeno dos tipos III e IV e possui uma rede de vasos sanguíneos e linfáticos (IRION, 2012). A camada reticular é mais profunda e de espessura maior que a papilar sendo composta de fibras colágenas do tipo I e fibras reticulares (IRION, 2012). As fibras reticulares configuram as linhas de Langer, importantes para delinear a contração da pele que advém da lesão da qual devem ser seguidas em incisões cirúrgicas visando minimizar a espessura da cicatriz (IRION, 2012).

Na derme, além de fibras colágenas e reticulares, têm-se as fibras elásticas. As fibras colágenas têm a função de conferir resistência; as fibras elásticas, compostas por proteínas de elastina, conferem elasticidade à pele e as fibras reticulares ligam o tecido conjuntivo ao tecido circunvizinho (MENDONÇA; RODRIGUES, 2011).

Os fibroblastos são as células fundamentais da derme, sendo os responsáveis pela síntese de proteínas, colágeno e elastina e estão também envolvidos na produção de fatores de crescimento, que têm a função de regular proliferação e diferenciação celular (COLWELL, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

2.4.2 Fisiologia do processo cicatricial

Após a lesão tecidual, como implicação natural, o organismo tende a promover o processo de reparo tecidual, o reparo pode ocorrer por dois mecanismos: regeneração ou cicatrização.

A regeneração ocorre dependente do tipo celular comprometido e da extensão da lesão tecidual. Há tecidos que detêm a capacidade de se regenerar, são os chamados tecidos lábeis e tecidos estáveis. Os tecidos estáveis não se replicam continuamente como o tecido lábil, mas podem proliferar-se caso ocorra dano ou lesão (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). São exemplos de tecidos lábeis o hematopoiético e os epitélios (pele, cavidade oral, colo uterino, entre outros) e de tecidos estáveis o fígado, rim e pâncreas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Apesar da capacidade de regeneração de alguns tecidos, esse fato ocorre dependente de alguns fatores como: extensão inicial da lesão e a continuidade do processo inflamatório (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Caso a lesão inicial seja extensa ou o processo inflamatório se cronifique, o reparo dar-se-á pelo processo de cicatrização.

Ferida é a perda da continuidade da pele e, por consequência, de sua função. Compreender as fases de cicatrização ou o estágio relacionado a esse reparo tecidual, a classificação, as feridas e como avaliá-las faz-se importantíssimo para tratamento apropriado e para que se tenha, por consequência, cuidados que promovam uma evolução adequada do processo cicatricial da ferida.

Nas feridas em que a perda tecidual é pequena, em que ocorre união das bordas, a regeneração é o principal mecanismo de reparo, sendo denominado fechamento por primeira intenção. Quando a perda tecidual é significativa, o fechamento dá-se pelo processo de cicatrização, ou seja, ao final forma-se tecido cicatricial fibroso e denomina-se fechamento por segunda intenção.

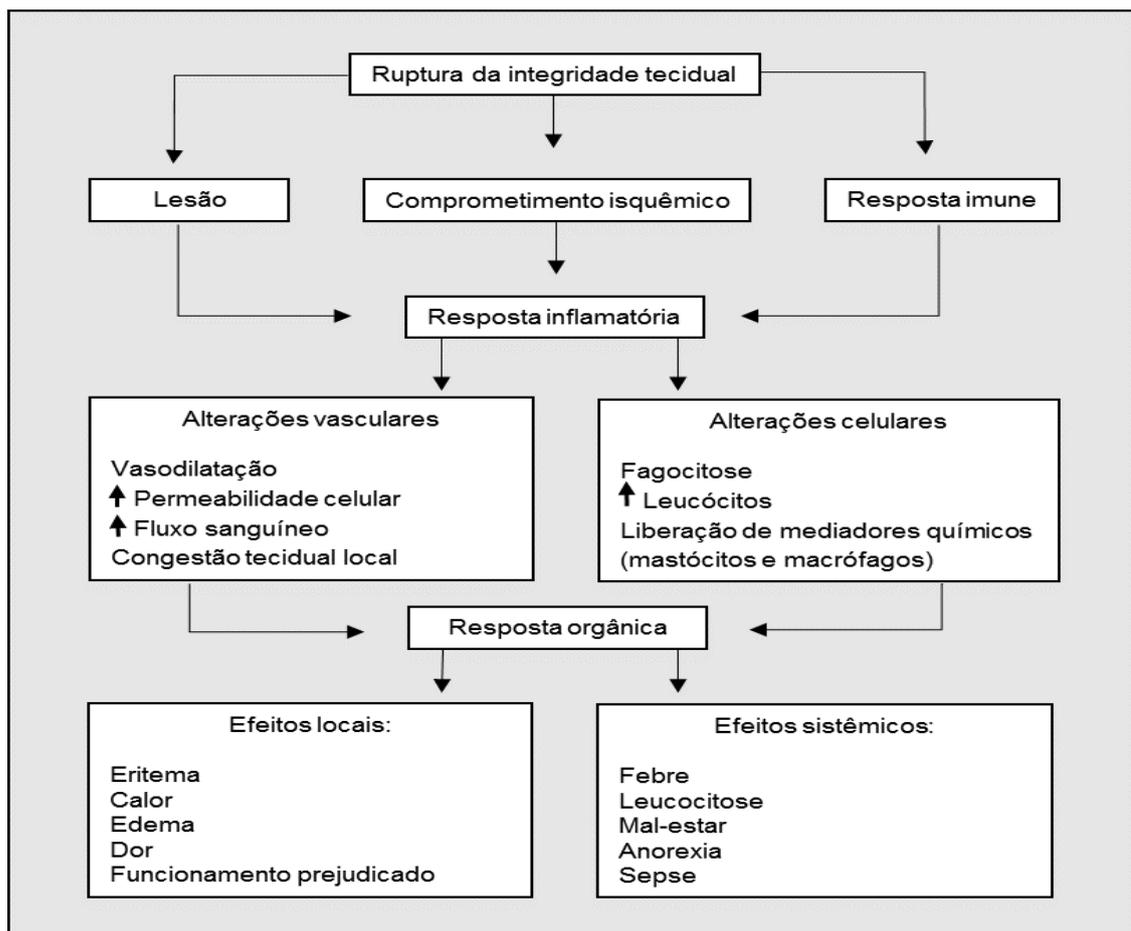
No fechamento por segunda intenção, o reparo desencadeia eventos inflamatórios de maior intensidade, visto que há maior perda tecidual e o imperativo de ser removido maior volume de restos necróticos, exsudato e fibrina; há a necessidade de maior volume de tecido de granulação para preencher o leito da ferida de modo a fornecer suporte para a reepitelização como também há a contração das bordas da ferida pelos miofibroblastos, promovendo o fechamento da lesão (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

O processo de cicatrização ocorre em três fases concatenadas e sucessivas para seu fechamento e formação de tecido cicatricial, são elas: inflamatória, proliferativa e de remodelamento. Consistem em um encadeamento de eventos complexos com o objetivo final de reconstituir o tecido comprometido (MEIRELES; SILVA, 2008), envolvendo fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam harmoniosamente para alcançar o objetivo de restauração tissular (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

2.4.2.1 Fase inflamatória

A fase inflamatória é a fase que sucede o trauma ou lesão e está relacionada a dois eventos principais: vasculares e celulares (Figura 2). O objetivo da inflamação consiste em proteger o local lesado controlando ou eliminando o agente agressor para a subsequente reparação (SMELTZER et al., 2009).

Figura 2 - Esquema dos eventos envolvidos na resposta inflamatória



Fonte: Adaptado de Smeltzer et al., 2009.

É a primeira fase do processo de cicatrização, induzida por mediadores químicos em resposta a um estímulo nocivo (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013), sendo primordial para ativar as fases seguintes: de proliferação e remodelagem.

Esta fase dura entre 4 a 5 dias, muito embora possa se prolongar a depender de processos irritativos locais: infecção, corpos estranhos e, no caso do tratamento de feridas, o tipo de cobertura ou curativo utilizados (DEALEY, 2008). Nela, encontram-se eventos fisiológicos que se iniciam por reações vasculares, com vasoconstrição transitória - entre 5 a 10 minutos - (HOSGOOD, 2006) mediada pela serotonina liberada por plaquetas durante a agregação plaquetária (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013), formação de trombo – visando inibir a perda sanguínea –, ativação da resposta imune local e migração celular. Seguido desses eventos, têm-se a vasodilatação mediada pela histamina liberada por mastócitos, basófilos e plaquetas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). A vasodilatação permite o extravasamento de fluidos para o interstício (formação de edema), conseqüente aumento da pressão hidrostática e lentidão do fluxo vascular (congestão vascular) permitindo que haja a marginação, quimiotaxia e transmigração leucocitária, que promove defesa contra infecções através da fagocitose pelas células de defesa (MEIRELES; SILVA, 2008; CURVINEL et al, 2010). Os neutrófilos predominam no infiltrado inflamatório entre 6 e 24 horas da lesão, sendo substituídos por macrófagos em 24 a 48 horas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Ainda no processo de vasodilatação, tem-se a ação das bradicininas e das prostaglandinas, que são mediadores químicos com potente ação vasodilatadora e que também são responsáveis pelo processo de estimulação algica dos nociceptores (MITCHELL et al., 2012). Percebe-se que os eventos referidos são os responsáveis pelos sinais flogísticos da inflamação: rubor, calor, edema, dor e perda da função.

As plaquetas têm papel basilar na cicatrização, uma vez que liberam grânulos de fatores de crescimento que sinalizam vários eventos da cicatrização. Nesta fase o destaque é para o fator de crescimento de transformação beta – TGF- β (quimiotático para leucócitos e fibroblastos) – e fator de crescimento derivado das plaquetas – PDGF (quimiotático para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos) (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

2.4.2.2 Fase proliferativa

É a segunda fase da cicatrização e estende-se até a epitelização total da ferida, que se desenvolve em uma contínua migração de células endoteliais da borda para o leito. Nesse processo, dá-se origem o tecido de granulação (MEIRELES; SILVA, 2008), que é formado por uma matriz de fibrina, fibronectina, colágeno, ácido hialurônico, possuindo macrófagos e fibroblastos imersos nessa matriz, além de novos vasos sanguíneos (DEALEY, 2008). Esse processo evolui, em média, entre 4 e 24 dias (MAIA; MONTEIRO, 2008) e se considera finalizado após a formação do tecido cicatricial (MEIRELES; SILVA, 2008).

Os macrófagos são células fundamentais na transição da fase inflamatória para a proliferativa, migram entre 48 e 96 horas do início da lesão e antes dos fibroblastos (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Eles produzem o PDGF e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que são sinalizadores quimiotáticos e mitogênicos para fibroblastos. Estes últimos são células essenciais nesta fase, responsáveis pela produção do colágeno e da matriz extracelular, estimulação da angiogênese como também da contração da ferida que ocorre entre o quinto e sexto dia de reparo cutâneo (DEALEY, 2008). A sinalização pelo FGF desencadeia a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, que são os responsáveis pela contração, na qual, estes, por sua vez, aderem à margem da ferida retraindo suas bordas em direção ao centro (MEIRELES; SILVA, 2008).

Os macrófagos, além de sua atividade fagocitária e produção de PDGF e FGF, produzem outros mediadores químicos capazes de modular os eventos da cicatrização: o fator de crescimento epidérmico – EGF (mitogênico para queratinócitos e fibroblastos; migração de queratinócitos e formação do tecido de granulação), o TGF- β (estimula a síntese de proteínas da matriz extra celular – MEC; suprime a inflamação aguda nesta fase), o fator de necrose tumoral – TNF (aumento do recrutamento, aderência dos leucócitos e aumenta a produção de citocinas adicionais), interleucinas (estimulam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais), metaloproteinases de matriz – MMPs (degradam a matriz para permitir o remodelamento e a extensão dos tubos vasculares) e seus inibidores teciduais – TIMPs (HOSGOOD, 2006; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

2.4.2.3 Fase de remodelamento

Essa fase perdura entre 21 dias e 2 anos (MAIA; MONTEIRO, 2008), sendo também denominada fase de maturação (MEIRELES; SILVA, 2008). O resultado do processo de reparo é o equilíbrio entre síntese e degradação das proteínas da MEC (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

É chamada de fase de remodelamento visto ser nesta fase que ocorre a organização das fibras de colágenos e a substituição destas fibras do tipo III (mais finas) para fibras do tipo I (mais espessa), melhorando a qualidade do tecido cicatricial e sua força tênsil (MEIRELES; SILVA, 2008; DAELEY, 2009). Essa melhora se deve à orientação das fibras colágenas, pois o colágeno tipo III tem orientação paralela à pele e o colágeno tipo I é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão, refletindo o aumento da força tênsil da ferida ao final desta fase (CAMPOS; BORGES-BRANCO, GROTH, 2007).

Independentemente do tempo que advenha à fase remodelatória, a ferida apresentará uma força tênsil inferior à pele intacta, atingindo em torno de 80% de sua força em relação à força original em três meses, não evoluindo além desse percentual (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Sua coloração é modificada de rosada para uma coloração esbranquiçada (MEIRELES; SILVA, 2008; DAELEY, 2009), devido ao aumento da deposição de colágeno na cicatriz e regressão vascular (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

2.4.3 Classificação e avaliação das feridas

É possível classificar as feridas de acordo com as diversas condições que a ela se relacionam, desde sua causa até o tipo de cicatrização envolvido para o completo fechamento ou epitelização. Assim, classificam-nas *quanto à causa* como: cirúrgica ou não-cirúrgica (trauma mecânico, térmico ou químico) (BRASIL, 2002); *quanto ao rompimento da integridade* da pele como: aberta ou fechada (LIMA et al., 2008); *quanto ao comprometimento tecidual* em: espessura parcial ou espessura total; (DEALEY, 2008; MEIRELES; SILVA, 2008); *quanto ao tempo de reparação* como: aguda ou crônica (BRASIL, 2002; DEALEY, 2008); *quanto ao conteúdo microbiano* como: limpa, limpa-contaminada, contaminada e suja (LIMA et al., 2008, DEALEY,

2008) e quanto *ao tipo de cicatrização*: por primeira, segunda e terceira intenção (DEALEY, 2008).

Ao mencionar sobre tipos de cicatrização é importante distingui-los. Na cicatrização por primeira intenção, infere-se que há pouca perda tecidual, baixo risco para infecção, bordas aproximadas e suturadas, rápida cicatrização e formação mínima de tecido cicatricial (COLWELL, 2009; MEIRELES; SILVA, 2008). É também chamada de cicatrização por fechamento primário (MEIRELES; SILVA, 2008).

A cicatrização por segunda intenção se relaciona à maior perda tecidual, são mais extensas e demoram para cicatrizar, o que aumenta a probabilidade para infecções (COLWELL, 2009; MEIRELES; SILVA, 2008). Espera-se que o leito da ferida seja preenchido por tecido de granulação e que haja contração de suas bordas (MEIRELES; SILVA, 2008). Na cicatrização por terceira intenção há um comprometimento decorrente de um processo infeccioso. Em geral, a cicatrização iniciou-se por primeira intenção e houve rompimento da sutura (deiscência).

Quanto à avaliação das feridas, um julgamento criterioso dos fatores a serem avaliados permite entender riscos e implicações para o processo dos cuidados para a adequada evolução da cicatrização. Importante lembrar que a avaliação leva em consideração as fases de evolução da cicatrização, visto que os mecanismos fisiológicos decorrentes deste processo têm período delimitado e cada fase possui suas características singulares como anteriormente relatados.

De acordo com Colwell (2009), a avaliação da ferida deve pautar integridade da pele, etiologia, extensão da lesão, limpeza da ferida e qualidade tecidual da ferida. Silva et al. (2008) apontam que devem ser consideradas: a localização, o tempo de evolução, o tamanho (diâmetro e profundidade), vitalidade dos tecidos circunvizinhos, sensibilidade e comprometimento, presença de exsudato, o tipo e a quantidade. Keast et al. (2004) proporam um sistema avaliativo de feridas denominado *MEASURE* (Tabela 2) com o intuito de que a avaliação seja consistente e meticulosa.

Tabela 2 - Sistema de avaliação de feridas proposta por Keast et al. (2004)

	Parâmetro	Conteúdo
M	<i>Measure</i> (medida)	Comprimento, largura, profundidade e área
E	<i>Exudate</i> (exsudato)	Quantidade e qualidade
A	<i>Appereance</i> (aparência)	Leito da ferida, tipo e quantidade de tecido
S	<i>Suffering</i> (dor)	Tipo e intensidade de dor
U	<i>Undermining</i> (descolamento)	Presença ou ausência
R	<i>Re-evaluation</i> (reavaliação)	Monitoração periódica de todos os parâmetros
E	<i>Edge</i> (borda)	Condição das bordas da ferida e da pele adjacente

Fonte: DEALEY, 2008

Deve-se ponderar, todavia, que a evolução adequada do tratamento de feridas não estará subordinada apenas à devida avaliação local e tratamento adequados, mas também inter-relacionado aos fatores sistêmicos (idade, imobilidade, estado nutricional, doenças associadas e uso de medicamentos, principalmente imunossupressores), que influenciarão na evolução do processo cicatricial.

2.4.4 Enfermagem, cicatrização de feridas e plantas medicinais

Faz parte das atribuições da enfermagem o cuidar de feridas. Visto a relação da enfermagem com o tratamento de feridas e que estas constituem grave problema de saúde pública, é necessário a busca contínua de conhecimentos que permitam mudanças dessa realidade (SANTOS et al., 2014a).

No final da década de 50, surgiram os primeiros estudos sobre cicatrização de feridas em ambiente úmido e estudos com animais foram realizados de modo a comparar a diferença entre manter a ferida úmida ou permitir deixá-la exposta para formação de crosta, concluindo que feridas com cobertura que favoreçam um leito úmido epitelizam duas vezes mais rápido (LIEDKE; JOHANN; DANSKI, 2014).

A dificuldade de acesso da população brasileira a medicamentos de altos custos (66%) aliada ao hábito de utilizar práticas integrativas e complementares nos cuidados em saúde (62,9%) (BRASIL, 2006a), utilizando plantas como uma dessas alternativas de tratamento, denota a importância de pesquisas que avaliem eficácia e segurança no uso de material vegetal e permitam que seja uma alternativa ao uso de medicamentos alopáticos. Estudos experimentais pré-clínicos estão sendo desenvolvidos envolvendo plantas medicinais, o que evidencia a importância do enfermeiro estar inserido no desenvolvimento de novas tecnologias que contribuam

no tratamento de feridas (OLIVEIRA, SOARES, ROCHA, 2010), trazendo novas perspectivas terapêuticas.

Como estudos recentes envolvendo enfermeiros na investigação de plantas com potencial para tratamentos de feridas e cicatrização utilizando ratos como modelo animal, temos: a *Punica granatum* em associação com a *Eugenia uniflora* obtendo bons resultados quanto ao seu potencial anti-séptico contra bactérias Gram-positivas em microbiota da pele, representando alternativa na prevenção de infecções de sítio cirúrgico (BERNARDO et al, 2015); estudo de cicatrização empregando a planta *Zeyheria tuberculosa*, a qual apresentou potencial antimicrobiano e cicatrizante satisfatórios (SARMENTO et al., 2014) e a *Piper hayneanum*, resultando em melhor cicatrização das feridas infectadas em comparação com os controles (BASTOS et al., 2011) e a avaliação comparativa de extratos de própolis verde e vermelha, na qual os resultados não mostraram diferenças significativas sobre o processo cicatricial, muito embora o grupo tratado com pomada de própolis verde mostrou evolução ligeiramente melhor (BATISTA et al., 2012).

De tal modo, o profissional enfermeiro tem muito a contribuir no desenvolvimento de pesquisas experimentais que permitam novas perspectivas terapêuticas e insumos no cuidado de feridas, contribuindo para alavancar pesquisas nessa área e firmando ainda mais sua atuação como profissional habilitado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar potenciais biológicos do extrato etanólico de folhas de *Tabebuia aurea* (EETA) *in vitro* e *in vivo*

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar qualitativamente os componentes fitoquímicos do EETA;
- Verificar toxicidade do EETA *in vitro* pelo método de MTT e *in vivo* por meio da avaliação clínica, bioquímica e histopatológica de órgãos alvo;
- Identificar a atividade antimicrobiana *in vitro* do EETA e suas frações contra as bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; Gram-Negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; e o fungo *Candida albicans*;
- Avaliar o potencial cicatrizante *in vivo* do EETA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo e local de experimento

Estudos experimentais pré-clínicos foram delineados nos moldes de pesquisa quantitativa, realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade/LaFI do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/ICBS/UFAL sob orientação da Prof.^a Dr.^a Eliane Aparecida Campesatto; no Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas/LpTF/UFAL sob orientação da Prof.^a Dr.^a Maria Lysete de Assis Bastos; no Laboratório de Química Medicinal sob orientação do Prof. Dr. João Xavier de Araújo Junior e no Laboratório de Biociências Farmacêuticas sob supervisão do Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo pertencentes à Escola de Enfermagem e Farmácia – ESENFAR/UFAL.

4.2 Aspectos éticos

Para realização da experimentação *in vivo*, um projeto foi encaminhado para Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL) e aprovado sob o nº do processo 011/2014 (Anexo A). Os protocolos foram conduzidos respeitando os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

4.3 Coleta e identificação da amostra vegetal

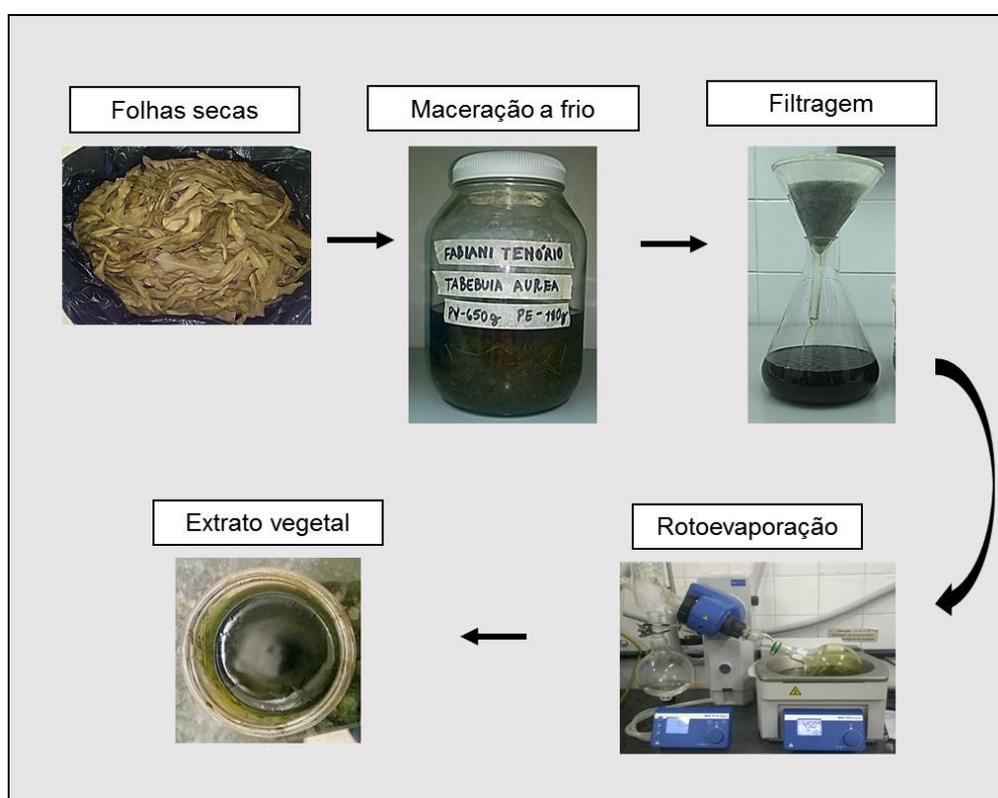
A amostra vegetal de folhas de *T. aurea* foi coletada na região de Zona da Mata na cidade de Maceió-AL, a qual apresenta vegetação de Floresta Atlântica. A coleta foi realizada no mês de janeiro de 2015 ao final da tarde na Universidade Federal de Alagoas (Coordenadas geográficas: S9° 33' 23,6" W35° 46' 39,6").

A identificação da amostra vegetal foi realizada pela Bióloga do Herbário MAC – Herbário do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas – Rosângela Pereira de Lyra Lemos, sob Registro MAC nº 21433 (Anexo B).

4.4 Preparo do extrato vegetal

O extrato etanólico foi obtido através do processo de maceração a frio a partir de 180 g de folhas secas de *T. aurea* (Figura 3). Foram retirados os pecíolos das folhas, pesadas, lavadas e congeladas, as quais permaneceram até o preparo do extrato. Cechinel Filho e Yunes (1998) recomendam que o material vegetal seja levado ao freezer caso o preparo do extrato não ocorra imediatamente, evitando a proliferação de fungos. A secagem do material botânico foi realizada em estufa a 38 °C por 3 dias.

Figura 3 - Processo de preparo do EETA pelo método de maceração a frio com álcool etílico até a obtenção do extrato



Fonte: Autora, 2015.

Após dessecada, a amostra vegetal foi triturada e submetida ao processo de maceração a frio com o solvente orgânico álcool etílico a 97%, mantendo-o em recipiente fechado e deixando-o em contato com o líquido extrator por um período de dias ou horas para a liberação de metabólitos vegetais na solução (SIMÕES et al., 2000). Após o período de contato solvente–material vegetal, ocorreu a filtração do

líquido e readição do solvente extrator, dando continuidade a este processo (adição de solvente e filtração) até que a coloração do líquido passasse a estar mais clara que a da partida do processo (SIMÕES et al., 2000).

O tempo de contato em que permaneceu a amostra vegetal com o solvente foi de 72 horas, realizando a filtração neste período em papel celulose, obtendo um líquido de coloração mais clara que a da partida na terceira filtração. A cada filtração a solução obtida foi concentrada em rotoevaporador a 45 °C.

Após finalizado o processo de evaporação rotativa, o extrato foi mantido em dessecador com sílica, pesado diariamente e retirado do dessecador após a obtenção de três pesagens idênticas consecutivas, o que ocorreu em 9 dias, confirmando a retirada do excesso de água ou álcool residual, resultando em 13 g de extrato com rendimento de 7,22%.

A escolha do álcool etílico como líquido extrator do material vegetal deu-se devido ao seu baixo impacto ambiental, menor custo em relação a outros solventes (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012) e baixa toxicidade.

4.5 Fracionamento do EETA

A partir da obtenção do extrato etanólico de folhas de *T. aurea*, realizou-se o fracionamento deste pelo método de filtração em sílica, objetivando uma semi-purificação dos metabólitos vegetais por meio da adição de solventes em polaridade crescente (CECHINEL FILHO; YUNES, 1988), para que, deste modo, direcionem-se as análises que poderão ser empregadas para avaliar as atividades biológicas das frações obtidas.

Uma alíquota de 4 g do EETA foi particionada em coluna filtrante sob vácuo, utilizando como fase estacionária 12 g de sílica gel e como fase móvel 200 mL de solventes orgânicos puros: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.

As soluções obtidas em cada filtração para cada solvente foram concentradas em evaporador rotativo em aproximadamente 50 °C, resultando em 4 frações do extrato: fração hexânica (0,6 g), fração clorofórmica (0,6 g), fração acetato de etila (0,3 g), e fração metanólica (2,4 g).

4.6 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica é um método qualitativo utilizado para identificar os compostos bioativos nas espécies vegetais. A identificação de classes de constituintes químicos presentes no EETA foi realizada segundo a metodologia descrita por Matos (1997).

Buscou-se avaliar a presença de *antocianinas, antocianidinas e flavonoides; leucocianidinas, catequinas, flavononas; flavonóis, flavanonóis e xantonas; esteroides e triterpenos; saponinas; fenóis e taninos; alcaloides; antronas e cumarinas; chalconas e auronas*. Para a realização dos testes, foi pesado em balança analítica 40 mg do EETA e solubilizado em 40 mL de etanol, sendo parte da solução distribuída em tubos de ensaio enumerados de 1 a 7.

Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Para avaliar a presença de antocianinas, antocianidinas e flavonóides, preparou-se três tubos de ensaio para cada amostra. O tubo 1 foi ajustado de modo a acidificá-lo para pH=3 com ácido clorídrico (HCl) 3 M. Os tubos 2 e 3 foram alcalinizados a pH=8,5 e 11, respectivamente, com hidróxido de sódio (NaOH) 1 M. As mudanças na coloração (Quadro 1) indicam a presença ou ausência dos compostos (MATOS, 1997).

Quadro 2 - Colorações indicativas das reações para a presença dos metabólitos: antocianinas e antocianidinas; flavonas, flavonóis e xantonas; chalconas e auronas; e flavanonóis

Constituintes	Coloração Observada		
	pH = 3	pH = 8,5	pH = 11
Antocianinas e antocianidinas	Vermelho	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-----	-----	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelho	-----	Vermelho púrpura
Flavanonóis	-----	-----	Vermelho laranja

Fonte: Matos, 1997.

Teste para Leucocianidinas, catequinas, flavononas

Dois tubos foram numerados como 4 e 5, o pH do primeiro foi ajustado para 2 pela adição de HCl 1 M e o segundo tubo alcalinizado com a adição de NaOH 1 M até

pH=11, os tubos foram aquecidos por 3 minutos e as mudanças de coloração observadas foram interpretadas segundo o quadro 2.

Quadro 3 - Colorações indicativas das reações para a presença dos metabólitos: leucoantocianidinas, catequinas, e flavanonas

Constituintes	Coloração observada	
	pH 2	pH 11
Leucoantocianidinas	Vermelha	-----
Catequinas	Pardo-amarelada	-----
Flavanonas	-----	Vermelho alaranjado

Fonte: Matos, 1997.

Teste para flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas

Adicionou-se magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado a um tubo contendo a amostra, aguardou-se o fim da reação que é indicada pelo fim da efervescência e observou-se a mudança de coloração da mistura reacional. O aparecimento ou a intensificação de cor vermelha indica a presença de flavonóis, flavanonas, flavononóis e/ou xantonas, livres ou na forma de heterosídeos (MATOS, 1997).

Teste para esteroides e triterpenos (Lieberman-Burchard)

Uma alíquota do extrato foi diluída em 2 mL de clorofórmio e filtrada em funil coberto com sulfato de sódio anidro para a retirada da água residual. Ao tubo de ensaio contendo esta solução foi adicionado 1 mL de anidrido acético e, depois de agitação branda, adicionou-se ácido sulfúrico concentrado, depois de uma nova agitação notou-se a mudança de coloração. Caso a coloração apresentada fosse azul evanescente seguida de verde permanente indicaria a presença de esteroides livres, caso a coloração se apresentasse entre parda até vermelha indicaria triterpenos pentacíclicos livres (MATOS, 1997).

Teste para saponinas

O resíduo insolúvel em clorofórmio do teste anterior foi separado, dissolvido em 10 mL de água destilada e filtrado para um tubo de ensaio. O tubo foi vigorosamente agitado e foi observado se ocorreu a formação de espuma. Aparecimento de espuma persistente e abundante é indicativo da presença de saponinas (MATOS, 1997).

Teste para fenóis e taninos

Em um tubo de ensaio contendo 3 mL da solução extrativa adicionou-se três gotas de solução alcoólica de cloreto de ferro, após agitação, foi observado se houve variação de cor ou formação de precipitado. Coloração variável entre azul e vermelho indica a presença de fenóis, a formação de precipitado azul escuro indica a presença de taninos hidrolisáveis e de precipitado verde, a presença de taninos condensados (MATOS, 1997).

Teste para alcaloides

Para avaliação da presença de alcaloides, o extrato foi submetido a dois testes. O primeiro, em placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), usando 2 mL de Clorofórmio como eluente, e, após eluição, o cromatograma foi revelado com reagente de Dragendorff. O surgimento de manchas de cor alaranjada sugere a presença de alcaloides. O segundo teste, para confirmação, consistiu em uma pequena alíquota da amostra solubilizada em 3 gotas de uma solução de Ácido Clorídrico 0,1 M e, após a solubilização, foram adicionadas 3 gotas do reagente de Dragendorff. A formação de precipitado na cor alaranjada é indicativo de alcaloides (MATOS, 1997).

Teste para antraquinona, antrona e cumarina

Os testes para antraquinonas e cumarinas foram realizados em placas de CCD. Os extratos foram solubilizados em metanol, aplicados na placa e eluídos com mistura de clorofórmio:metanol (9:1). Após eluição, borrifou-se hidróxido de potássio 10%, esperou-se secar e observou-se a presença das cores indicativas em luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm. O surgimento de coloração azul é indicativo de cumarina, vermelho de antraquinona e amarelo de antrona (MATOS, 1997).

4.7 Ensaios biológicos *in vitro*

4.7.1 Ensaio de viabilidade celular

O método colorimétrico, para avaliar a citotoxicidade do extrato em células utilizando o metiltetrazólio (MTT), seguiu a metodologia descrita por Mosmann (1983) com adaptações. O teste avaliou a viabilidade celular a partir de células de macrófagos

peritoneais da linhagem J774.A1 na densidade de 2×10^5 células por poço cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10% de soro fetal bovino, no qual ficaram “overnight” para melhor aderência das células à placa (MOSMANN,1983).

Essas células foram expostas a diferentes concentrações do EETA (1, 10, 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$) por um período de 48 h. Os poços controles continham células cultivadas somente com meio de cultura e células cultivadas na presença do solvente DMSO a 0,1%, 0,5% e 1% e para o controle de lise celular, foi utilizado o Triton™ X-100, potente agente citotóxico (MOSMANN,1983).

Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, foi adicionado 100 μL da solução de MTT (10% em RPMI) em cada poço, sendo então reincubadas durante 2 horas em estufa a 37 °C e a 5% de CO_2 (MOSMANN,1983). A quantificação do sal de formazan reduzido (coloração azul escuro/púrpura) foi obtida a partir da leitura das placas com o auxílio de um espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm, sendo este comprimento de onda capaz de absorver a coloração púrpura da solução (MOSMANN,1983).

O metiltetrazólio – MTT ou sal de tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5- difenil brometo de tetrazólio], composto hidrossolúvel de tonalidade amarelo-pálido em solução, é facilmente incorporado por células viáveis as quais reduzem o MTT a partir das desidrogenases em suas mitocôndrias, sendo convertido em um composto insolúvel em água e que passa de sua coloração amarelo-pálido inicial para a coloração azul-escuro/púrpura, os cristais de formazan, sendo este armazenado no citoplasma celular (DENIZOT; LANG, 1986). A habilidade das células em reduzirem o MTT indica a atividade e a integridade mitocondrial, que são interpretadas como medidas da viabilidade celular (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

4.7.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana do EETA e frações foi determinada por meio da CIM, esta foi realizada conforme método descrito por Karaman et al. (2003), Dall’Agnol et al. (2003), Ayres et al. (2008) e Silva Junior et al. (2009) com adaptações.

As cepas avaliadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 31488), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e o fungo *Candida albicans* (ATCC 24433).

A CIM foi realizada em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços com 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Todos os orifícios a partir da linha A foram preenchidos com 100 µL de caldo de cultivo *Müller-Hinton* (MH). Uma alíquota do EETA foi dissolvida em DMSO a 2% obtendo uma concentração estoque de 2000 µg/mL (10 mg do extrato / 4,9 mL de Soro Fisiológico a 0,9% + 100 µL de DMSO). Um volume de 100 µL da solução estoque na concentração de 2000 µg/mL foi adicionado em triplicata nas colunas de 1 a 9 da linha A alcançando uma concentração final nesse poço de 1000 µg/mL (CLSI, 2012).

Em seguida, uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício da linha A foi transferida para os orifícios da linha B e, após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para a linha C, repetindo-se este procedimento até a linha H, desprezando-se, após homogeneização, o excesso da diluição obtendo-se concentrações decrescentes do extrato (metade da concentração para cada linha a partir da linha B) em µg/mL (1000 µg/mL - linha A; 500 µg/mL - linha B; 250 µg/mL - linha D e assim sucessivamente até a concentração final de 7,81 µg/mL na linha H) (CLSI, 2012).

Posteriormente, em cada orifício foram adicionados 5 µL de inóculo microbiano, os inóculos foram preparados em solução salina estéril e a suspensão bacteriana foi determinada pela turvação do tubo 0,5 da escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), diluída numa proporção de 1:10 para se conseguir uma diluição 10^7 UFC/mL, sendo a concentração final de bactérias entre 5×10^5 UFC/mL e 5×10^4 UFC/poço ao inocular 5 µL dessa suspensão no caldo (CLSI, 2012).

A suspensão fúngica, também determinada pela turvação do tubo 0,5 da escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL), foi diluída 1:50 para se conseguir uma diluição 2×10^4 UFC/mL, sendo a concentração final desejada de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL ao inocular 50 µL dessa suspensão em cada poço (NCCLS, 2002).

Os orifícios das colunas 10, 11 e 12 foram destinados para os testes de controle do experimento. O orifício 10 foi utilizado para controle negativo, avaliado por meio da atividade inibitória do diluente DMSO a 2%. O orifício 11, utilizado para avaliar a viabilidade microbiana, foi plaqueado com caldo de cultivo MH e o inóculo microbiano (5 µL). Para o controle de esterilidade, orifício 12, utilizou-se apenas o caldo de cultivo MH.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 18 h para as bactérias e por 28 °C por 48 h para o fungo. Após este período, foram adicionados 20 µL de Cloreto de Trifenil Tetrazólio (TTC) a 5% em cada poço, corante que promove

a coloração das colônias sem comprometer sua viabilidade, e as placas foram reincubadas por mais 3h. A mudança de incolor para coloração vermelha significa a presença de microrganismos e a ausência da coloração vermelha significa prova positiva da ação inibitória do extrato sobre os microrganismos testados (DALL'AGNOL et al., 2003; AYRES et al., 2008; CLSI, 2012).

O grau de atividade antimicrobiana é determinado conforme os seguintes critérios: CIM de até 100 µg/mL é considerada ativa, CIM entre 100-500 µg/mL apresenta atividade moderada, CIM ente 500-1000 µg/mL apresenta fraca atividade e CIM maiores que 1000 µg/mL são inativas (DALL'AGNOL et al., 2003; AYRES et al., 2008). A validade deste teste é verificada na constatação do crescimento microbiano no controle positivo e a CIM foi considerada como a menor concentração do extrato em µg/mL capaz de inibir completamente o crescimento microbiano (CLSI, 2012).

4.8 Ensaios biológicos *in vivo*

Foram utilizados 27 *Ratus norvegicus albinus* da linhagem Wistar, fêmeas, com aproximadamente 4 meses de idade, pesando entre 170 g a 220 g, fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual de Ciências da Saúde (UNCISAL) e transferidos para o Laboratório para Tratamento de Feridas - LpTF respeitando os Princípios Éticos em Experimentação Animal. Foram mantidos em gaiolas de polietileno com identificação numérica do animal e grupo a que pertencia forradas com maravalha estéril, ruídos mínimos, ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 21 ± 2 °C, sistemas de ventilação adequados, ração própria para a espécie (Nuvilab®) e livre acesso à água.

Os modelos murinos foram separados de seu grupo de convivência, sendo acondicionado um animal por gaiola e mantidos em observação por 21 dias antes do bioensaio. O isolamento dos animais é necessário para que no decorrer da experimentação não haja a retirada dos curativos pelos outros animais do grupo. O período pré-experimentação de 21 dias tem intuito de permitir a ambientação (adaptação) dos animais à separação do grupo de convivência além de verificar condições clínicas, realizar a avaliação do peso e temperatura e identificação de variáveis que possam influenciar no experimento.

Os ratos foram pesados e separados pelo método probabilístico de escolhas aleatórias em 3 grupos com 9 animais cada (Apêndice A), identificados a partir da

terapêutica: grupo controle positivo (CP) – dexpanthenol, grupo controle negativo (CN) – creme base e grupo Extrato Etanólico de folhas de *T. aurea* (EETA) – EETA incorporado ao creme-base.

4.8.1 Cremes para uso tópico

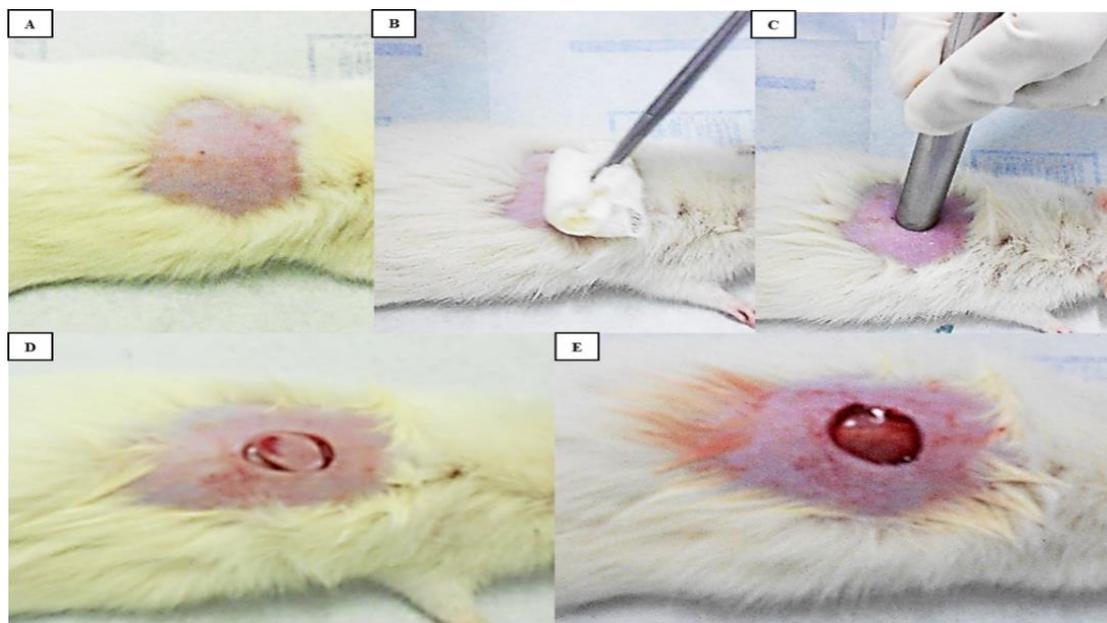
Os cremes utilizados neste experimento foram manipulados pela farmacêutica Círia Vieira Barbosa. Um creme de base inerte, não iônico, foi incorporado ao dexpanthenol utilizado no grupo CP e ao EETA do grupo EETA. Apenas o creme-base foi utilizado para tratamento do grupo CN. O dexpanthenol e o EETA foram manipulados na concentração de 5%.

4.8.2 Confeção da ferida e tratamento

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram previamente pesados e o peso, utilizado para o cálculo da anestesia. A anestesia foi realizada por via intraperitoneal (i.p) em concentração 50 mg/kg de ketamina a 10% e 10 mg/kg de xilazina a 2%, administrando-se 0,1 mL para cada 100 g do peso corpóreo (DAMY et al., 2010). Alcançada a profundidade anestésica necessária, realizou-se epilação do dorso seguida de antissepsia da pele com clorexidina degermante a 2%. Com um *punch* metálico de 12 mm foi confeccionada uma lesão excisiva dorsal única até o nível do tecido aponeurótico (Figura 4) e, em seguida, as lesões foram limpas com soro fisiológico (SF) a 0,9% e cobertas com gaze e ataduras, com técnica asséptica, e esperado 24 horas para o início da terapêutica (Figura 5) (SARMENTO et al., 2014).

Durante o tratamento foi dispensado, em cada ferida, 0,3 mL de cada creme nos diferentes grupos, garantindo que a quantidade de creme utilizada fosse igual para todos os animais. Uma seringa estéril de 1 mL – sendo utilizada uma para cada animal garantindo a esterilidade do processo. Entres os dias D1 e D14 de pós-operatório (DPO), seguiu-se verificação de temperatura corporal por via retal.

Figura 4 - Procedimento cirúrgico para a confecção de ferida. Rato epilado (A); antissepsia de sítio cirúrgico (B); confecção de ferida com *punch* (C); resultado da excisão sem retirada da pele (D); resultado final da excisão cirúrgica e retirada da pele (E)



Fonte: Autora, 2015

Os curativos foram feitos com cobertura de acordo com a divisão dos grupos de tratamento e realizada fotografia de todas as lesões para acompanhamento da evolução. Nos dias D3, D7, D11 e D14, as avaliações macroscópicas da ferida foram inseridas em protocolo pré-estabelecido (Apêndice B) para a análise clínica das lesões quanto: ao tamanho, ao rubor perilesional, à presença de tecido de granulação, à extensão da crosta, presença de sinais flogísticos, exsudato e fibrina (SARMENTO et al., 2014).

Figura 5 - Realização do curativo pós-cirúrgico. Irrigação da ferida com SF a 0,9% (A); Cobertura da ferida com gaze estéril (B); Curativo finalizado, coberto com atadura e fixado com esparadrapo (C)



Fonte: Autora, 2015.

4.8.3 Análise morfométrica da ferida

Todas as mensurações de morfometria foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 11 e 14 de pós-operatório (D0, D3, D7, D11, D14). Realizou-se a medição do maior e menor diâmetro das feridas com paquímetro manual, os resultados foram calculados utilizando a seguinte equação matemática: $A = R \times r \times \pi$, com **A** representando a área da ferida, **R** representando o raio maior, **r** representando o raio menor e π uma constante equivalente à 3,14.

Após a obtenção dos resultados da área para todos os animais, o Percentual de Contração (%C) das feridas foi calculado através da fórmula: $\%C = [(A_i - A_f) \div A_i] \times 100$, onde **A_i** é a área inicial (pós-operatório imediato) e **A_f** é a área final no DPO correspondente (COELHO; REZENDE; TENÓRIO, 1999).

4.8.4 Análise bioquímica e histopatológica das feridas e dos órgãos

Nos dias D3, D7 e D14, ocorreu a eutanásia dos animais. A cada eutanásia, foram sacrificados 3 animais por grupo (Apêndice A) para retirada da ferida, de órgãos (rins e fígado) e coleta de sangue.

Os animais foram anestesiados com 3 vezes a dose utilizada para o procedimento cirúrgico de confecção das feridas. Foi realizada a medição da temperatura corporal e medição da área da lesão com paquímetro manual. Alcançada a profundidade anestésica, retirou-se entre 2 e 5 mL de sangue por punção cardíaca. Sendo confirmada a parada cardiorrespiratória dos animais, a ferida foi retirada (obtendo-se um fragmento de formato elipsoide abrangendo também a área perilesional), seguida dos órgãos, que foram pesados para avaliar alteração de peso entre os grupos e acondicionados em recipiente contendo formol a 10%.

O sangue foi acondicionado em tubos de *Falcons* devidamente identificados, posteriormente, centrifugados para a separação do plasma dos elementos figurados do sangue. O objetivo foi realizar avaliação bioquímica para avaliar os seguintes testes séricos: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina.

O fragmento de tecido obtido (ferida) foi enviado a um laboratório de patologia no dia imediato à eutanásia para preparo das lâminas histológicas, sendo todo o processo do preparo das lâminas realizado neste laboratório. Seguidamente à

obtenção das lâminas, estas foram encaminhadas ao patologista Dr. Ricardo Luiz Simões Houly para realização da leitura. As lâminas foram numeradas (conforme Apêndice A) sem indicação de grupo ou da terapêutica aplicada para avaliação na forma de análise cega.

A análise histopatológica para a avaliação das feridas adotou como referência as fases da cicatrização: inflamatória, proliferativa e de remodelação (Apêndice C e D). Para análise dos resultados, foram eleitos escores (Apêndice E), nos quais, a intensidade das variáveis, com pontuação determinada entre +1 e +5, foi multiplicada por fatores – positivos ou negativos – baseados na sua importância para a cicatrização (MEDEIROS et al., 1999; SARMENTO et al., 2014). Efetuado o cálculo, o produto corresponde ao escore total para cada animal, o qual, posteriormente, foi somado aos escores dos demais animais do grupo e obtida a média (MEDEIROS et al., 1999; SARMENTO et al., 2014).

Os rins e fígados retirados dos animais durante a eutanásia foram encaminhados ao patologista Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior do Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental – LMPE pertencente ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa da Universidade Tiradentes (Aracajú – SE) para preparo das lâminas histológicas e posterior leitura. Os órgãos foram numerados (conforme Apêndice A) sem indicação de grupo ou da terapêutica aplicada para avaliação na forma de análise cega.

Os tecidos hepáticos, renais e feridas foram fixados em formalina a 10%, embebidas em cera de parafina e em seguida seccionadas em 5 μ de espessura, todas coradas com hematoxilina-eosina. Dos cortes histológicos, cinco lâminas foram obtidas para cada tecido renal (direito e esquerdo) e hepático e três lâminas para cada ferida, ou seja, dispondo-se de quintuplicatas e triplicatas, respectivamente, para a avaliação histológica e utilizando microscópio óptico (CX31, Olympus).

4.8.5 Testes estatísticos

Os resultados estatísticos foram obtidos pelo programa *GraphPad Prism 5*®. O teste *t-Student* foi utilizado para o ensaio de viabilidade celular e para os demais ensaios utilizou-se *One-way ANOVA* (análise de variância). Para o peso dos órgãos e testes bioquímicos, o pós-teste realizado foi o de teste de *Dunnett*, que compara todas as colunas a um controle. Para os resultados do teste de cicatrização, o pós-teste

utilizado foi o de comparação múltipla de *Tukey*. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ($M \pm E.P.$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Prospecção fitoquímica

Os testes de prospecção fitoquímica evidenciaram a presença de compostos fenólicos, antraquinonas, esteroides e alcaloides como mostra a tabela 3. A literatura correlaciona compostos fenólicos, como taninos e flavonóides, à bioatividade antimicrobiana e atividade cicatrizante (CASTRO et al., 2012; TALHOUK et al., 2007), corroborando para prosseguimento do estudo de avaliação destas atividades.

Tabela 3 - Avaliação fitoquímica para a presença de metabólitos secundários presentes no EETA

Metabólitos secundários avaliados	Resultados do EETA
Taninos	+
Fenóis	-
Flavononóis	+
Antocianinas	-
Chalconas e Aurona	-
Flavononas	+
Flavonóis, Flavonas e Xantonas	+
Antraquinonas	+
Cumarinas	-
Antrona	-
Terpenos	-
Esteroides	+
Saponinas	-
Alcaloides	+

Fonte: Dados da pesquisa, 2015. Legenda: (-) ausente; (+) presente

Segundo Castro et al. (2012), os metabólitos secundários da classe de polifenóis, ou também denominados de compostos fenólicos, têm relação com atividade antimicrobiana, tendo a prospecção fitoquímica do EETA revelado compostos fenólicos como flavonóis e taninos. Talhouk et al. (2007) também correlacionam a presença de flavonóides e taninos com propriedade cicatrizante e anti-inflamatória, no entanto, compostos como saponinas, alcaloides, sesquiterpenos glucosídeos e sesquiterpenos lactonas podem demonstrar propriedades semelhantes.

O estudo fitoquímico de Araújo, Costa e Chaves (2013) obteve resultado semelhante para o extrato etanólico de folhas de *T. aurea*, estando presentes os metabólitos esteroides, flavononas, flavonóis, flavonas, flavononóis e taninos, mostrando similaridade aos resultados aqui apresentados.

Santos (2014), também avaliando o extrato etanólico de folhas de *T. aurea*, identificou a presença de antraquinonas, contudo, avaliou naftoquinonas e ácidos orgânicos, revelando também a presença destes metabólitos. Violante et al. (2008) avaliaram o extrato etanólico da entrecasca do caule da *T. aurea* e o resultado foi positivo para alcaloides e taninos.

Outras prospecções fitoquímicas envolvendo o gênero *Tabebuia* apresentaram reações semelhantes como a presença de flavonóides e antraquinonas no extrato hidroetanólico de folhas de *T. heptaphylla* (BUDNI et al., 2007), e alcaloides, fenóis e taninos no extrato etanólico de folhas de *T. serratifolia* além de ácidos orgânicos, saponinas e açúcares redutores (DUARTE; MOTA; ALMEIDA, 2014).

Apesar da família Bignoniaceae se destacar pela presença de antraquinonas e naftoquinonas (GARCEZ et al., 2007), os escassos estudos encontrados realizando prospecção fitoquímica do gênero *Tabebuia* revelaram a presença, principalmente, dos compostos fenólicos como os flavonóis e taninos.

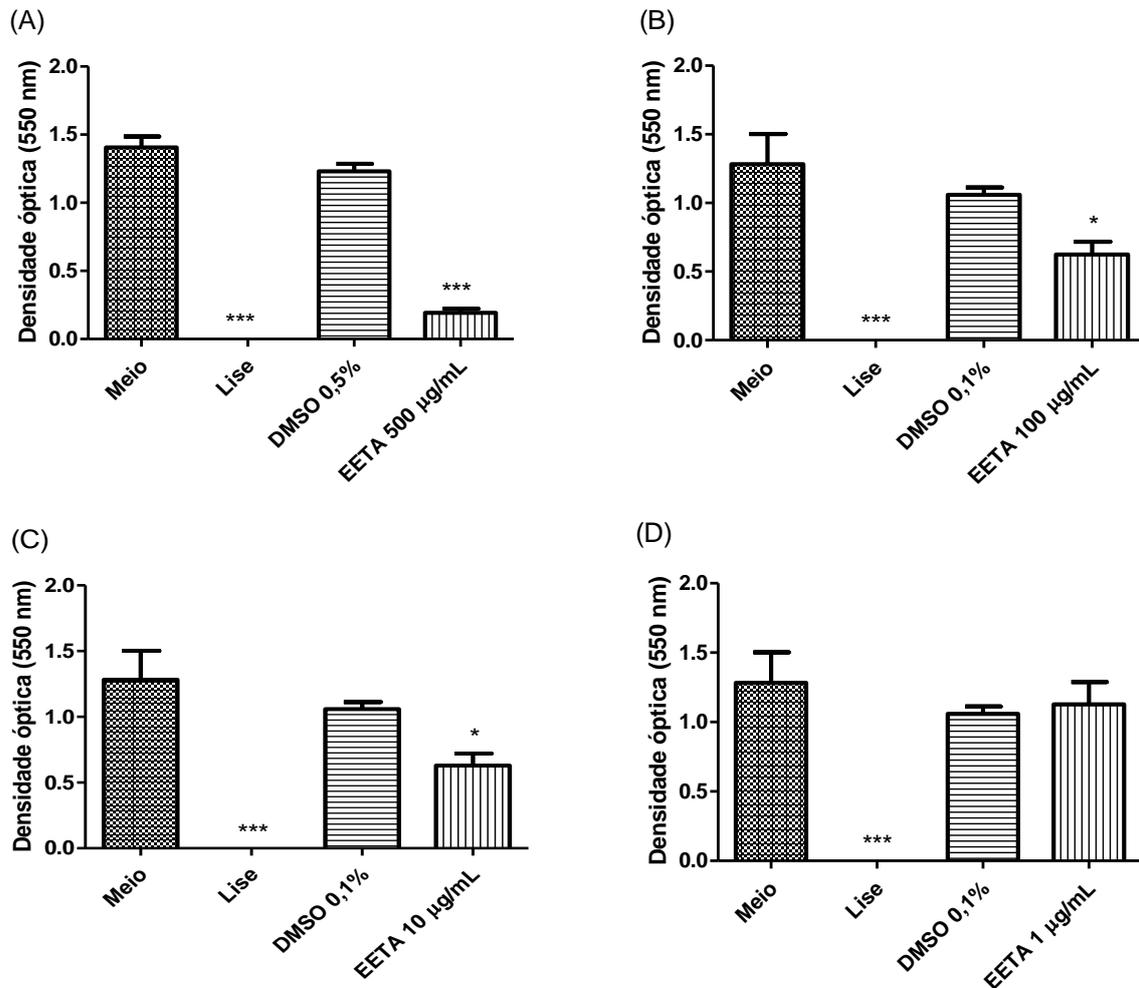
5.2 Ensaios biológicos *in vitro*

5.2.1 Teste de avaliação da viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular do EETA em células de macrófagos da linhagem J774.A1 resultou em viabilidade na concentração de 1 µg/mL, citotoxicidade com pouca significância estatística nas concentrações de 100 e 10 µg/mL e forte citotoxicidade em concentração de 500 µg/mL (Gráfico 1).

Metabólitos secundários presentes no EETA, como antraquinonas e alcaloides, podem estar relacionados com a citotoxicidade encontrada no teste de viabilidade celular. As antraquinonas estão relacionadas, principalmente, à sua propriedade laxante. O β-Lapachol, uma quinona isolada, está sendo avaliado quanto sua forte propriedade farmacológica antitumoral (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). A citotoxicidade das antraquinonas é proporcional à sua afinidade de ligação às proteínas plasmáticas (PANIGRAHI et al., 2015), já os alcaloides têm grande diversidade estrutural que permite lhes atribuir diversas atividades biológicas, inclusive citotoxicidade (NOGUEIRA et al., 2014).

Gráfico 1 - Resultados do EETA sobre a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774.A1 nas concentrações de 500, 100, 10 e 1 µg/mL obtidos pelo método colorimétrico de MTT em 48 horas



Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

No estudo de Sarmiento et al. (2014), avaliando a citotoxicidade do extrato etanólico do caule de *Zeyheria tuberculosa* (família Bignoniaceae) em microcrustáceos pelo método de *Artemia salina* nas concentrações entre 10 a 100 µg/mL obteve-se resultado de não toxicidade em nenhuma das concentrações testadas.

Relacionado ao gênero *Tabebuia*, frações hexânica e clorofórmica do extrato de *T. serratifolia* apresentaram citotoxicidade quando avaliadas nas concentrações de 800 µg/mL e apenas 1,8% de viabilidade para a fração hexânica na concentração de 400 µg/mL em células ovarianas de hamster chinês pelo método MTT (GONZÁLES-COLOMA et al., 2012). A análise do extrato aquoso da entrecasca de *T. avellanadae* (BYEON et al., 2008) nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 µg/mL pelo método de MTT sobre macrófagos (linhagem RAW264.7) não demonstrou toxicidade.

Na avaliação dos extratos etanólicos de folhas e do caule da casca de *T. impetiginosa* pelo método de MTT em células de macrófagos da linhagem J774 nas concentrações de 0,1 a 1000 µg/mL, os resultados não mostraram citotoxicidade, porém os extratos hexânico de folhas e etanólico de galhos foram citotóxicos (VASCONCELOS et al., 2014),

A análise do extrato alcaloide de *T. rosea* em monócitos séricos de humanos também pelo método de MTT em concentração logarítmica crescente do extrato de até 1000 µg/mL resultou na viabilidade celular decrescente nas maiores concentrações, muito embora não tenha sido citotóxico para estas células (SATHIYA; MUTHUCHELIAN, 2010).

Quanto à espécie *T. aurea*, Santos (2014), ao avaliar o extrato etanólico de folhas utilizando o método de MTT em células de macrófagos da linhagem J774, não obteve resultados de citotoxicidade em nenhuma concentração (100, 200, 500 e 1000 µg/mL), muito embora, ao avaliar o extrato etanólico de flores da mesma espécie, obteve resultado de citotoxicidade na concentração de 1000 µg/mL.

O resultado díspar do teste de citotoxicidade com os demais aqui apresentados é compreensível, visto que o tipo de solo em que o vegetal foi cultivado, a mudança de clima, o período em que foi realizada a coleta do material entre outros condicionantes permitem essa diferença, pois os metabólitos secundários presentes no vegetal sofrerão variações dependentes das circunstâncias mencionadas.

Ainda que citotoxicidade tenha sido encontrada em algumas concentrações *in vitro* aqui testadas isto não implica que a aplicação tópica do extrato, quando utilizada *in vivo*, tenha absorção sistêmica por essa via, sendo necessário outros estudos que busquem avaliar esta possibilidade.

5.2.2 Avaliação da concentração inibitória mínima

Na avaliação da CIM, o EETA mostrou-se incapaz de inibir as bactérias testadas em todas as concentrações. Na análise das frações do extrato, as frações hexânica e clorofórmica apresentaram fraca inibição para a bactéria *E. coli*, para as demais bactérias, nenhuma das frações apresentaram atividade inibitória. Quanto à avaliação do fungo *Candida albicans*, extrato e frações não foram capazes de inibi-lo. Os resultados estão expressos na tabela 4.

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima obtida do extrato e suas frações

	Micro-organismos avaliados					CIM
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	
EETA	-	-	-	-	-	-
Fração hexânica	-	-	+	-	-	1000 µg/mL
Fração clorofórmica	-	-	+	-	-	1000 µg/mL
Fração acetato de etila	-	-	-	-	-	-
Fração metanólica	-	-	-	-	-	-

Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

Alguns extratos não demonstram atividade antimicrobiana, entretanto frações e compostos isolados podem apresentar tais propriedades (BENFATTI et al., 2010). Isto pode ser justificado devido à interação entre os diversos fitocomponentes presentes no extrato interferindo ou mascarando alguma classe de metabólitos que é, provavelmente, ativo como antimicrobiano.

Compostos fenólicos, como os encontrados no EETA, “podem combinar-se com as adesinas bacterianas de forma a comprometer a adesão do microrganismo sobre a superfície celular” (CASTRO et al., 2012), assim, taninos podem afetar a síntese da parede celular formando complexos irreversíveis com proteínas (CHUSRI; VORAVUTHIKUNCHAI, 2009) e os flavonóides podem atuar como inibidores da topoisomerase tipo-II bacteriana, sendo, também, substâncias potencialmente ativas (CUSHNIE; LAMB, 2011).

Dois estudos que avaliaram o potencial antimicrobiano da *T. aurea* foram encontrados. Um estudo foi o de Albenaz (2006), que avaliou o extrato hexânico da madeira do caule de *T. caráiba* (*T. aurea*) contra doze cepas bacterianas encontrando atividade apenas para duas cepas: atividade forte para *E. faecalis* (CIM - 31,25 µg/mL) e atividade moderada para *S. aureus* (CIM - 500 µg/mL). O outro estudo foi o de Santos (2014), que encontrou atividade moderada para o extrato etanólico de folhas de *T. aurea* – provenientes da vegetação da Caatinga alagoana – para *S. epidermidis* (CIM - 250 µg/mL) e *S. aureus* (CIM - 500 µg/mL). O extrato etanólico das flores também foi avaliado e mostrou-se ativo frente à linhagem *S. epidermidis* apresentando CIM de 62,5 µg/mL (SANTOS, 2014).

Avaliando o gênero, o estudo de Vasconcelos et al. (2014) que, ao avaliar a CIM a partir do extrato hexânico de folhas de *T. impetiginosa* contra nove cepas bacterianas, obteve atividade moderada apenas para a bactéria *Acinetobacter baumannii* (CIM - 500 µg/mL), mas quando avaliado o extrato etanólico de folhas, duas linhagens bacterianas foram inativadas apresentando forte atividade: CIM de 62,5 µg/mL para *S. epidermidis* e CIM de 31,25 µg/mL para *S. aureus*. Rocha et al. (2013) avaliaram seis plantas do Cerrado e obtiveram melhores resultados frente ao extrato etanólico de folhas *T. pentaphylla* com CIM de 7,81 µg/mL para *S. aureus* e CIM de 15,62 µg/mL para *E. faecalis* e *E. coli*.

Em relação à família (Bignoniaceae), no estudo de Ramos et al. (2012), avaliando os extratos etanólico e hexânico de folhas de *Zeyheria tuberculosa*, obteve-se inibição da bactéria *S. aureus* em 1000 e 500 µg/mL para o extrato etanólico e inibição em 1000 µg/mL para o extrato hexânico para a mesma bactéria. No estudo de Sarmento et al. (2014), o extrato etanólico de folhas de *Z. tuberculosa* foi capaz de inibir *S. aureus* na concentração de 62,5 µg/mL. Avaliando bactérias Gram-negativas utilizando extrato metanólico de folhas e casca do caule *Newbouldia laevis*, o estudo de Tankeo, Tane e Kuete (2015) foi considerado promissor com resultados entre 128 e 256 µg/mL para cada extrato contra a bactéria *E. coli*.

Em relação ao fungo *Candida albicans*, Höfling et al. (2010), analisando os extratos diclorometano e metanólico da casca de *T. avellanae*, encontraram resistência e inibição (3 µg/mL) respectivamente, Mardegan (2007) não obteve resultado de inibição na CIM ao analisar o extrato diclorometano-metanólico da entrecasca de *T. avellanae* e o extrato etanólico da casca de *T. caraiba* resultou em fraca atividade (8 mm), comparada ao controle Itraconazol (17 mm), pelo método de microdiluição em caldo (SILVA; PAULA; ESPINDOLA, 2009).

O tipo de solo e seu pH, estação do ano, clima e diferentes tipos de estressores ambientais interferem na quantidade de fitocomponentes que estarão presentes em uma planta, apesar de, geralmente, estarem presentes metabólitos idênticos para uma mesma espécie diferindo, apenas, a porcentagem desses (SILVA et al., 2005; SILVA et al., 2006). Assim, a genética e fatores ambientais influenciariam a síntese dos metabólitos desencadeando variações qualitativas e quantitativas de complexos químicos (SILVA et al., 2005; SILVA et al., 2006), o que pode ser percebido pelos diferentes resultados encontrados, seja avaliando espécie, gênero ou família.

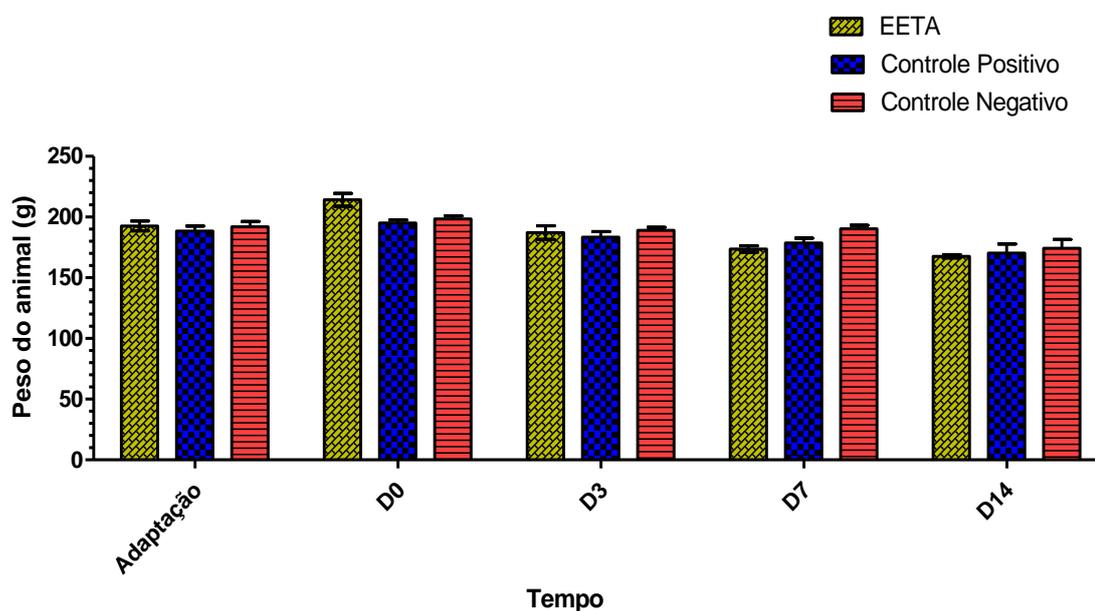
5.3 Bioensaio de cicatrização *in vivo*

5.3.1 Observação clínica

Peso

Os animais durante o pós-operatório não apresentaram complicações e permaneceram vivos até o final do experimento. No que concerne à avaliação ponderal, os animais apresentaram perda de peso no período pós-operatório, muito embora esta perda não tenha sido significativa estatisticamente como pode ser visto no gráfico 2. Quando comparado os pesos do período de adaptação até o dia do ato operatório, em (D0) os animais apresentam média de $196,8 \pm 3,44$ g, e ao final do tratamento (D14), apresentaram peso médio de $179,4 \pm 2,58$ g.

Gráfico 2 - Média da avaliação do peso dos animais por grupo experimental desde a fase de adaptação ao término do experimento



Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

A perda de peso pode ocorrer como resposta do organismo à mediadores químicos liberados durante o processo inflamatório. As citocinas pró-inflamatória produzidas pelos leucócitos e outros tipos celulares, principalmente o TNF, são responsáveis por inúmeros eventos sistêmicos, inclusive supressão do apetite (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Iatsyn (1978) refere ser importante acompanhar

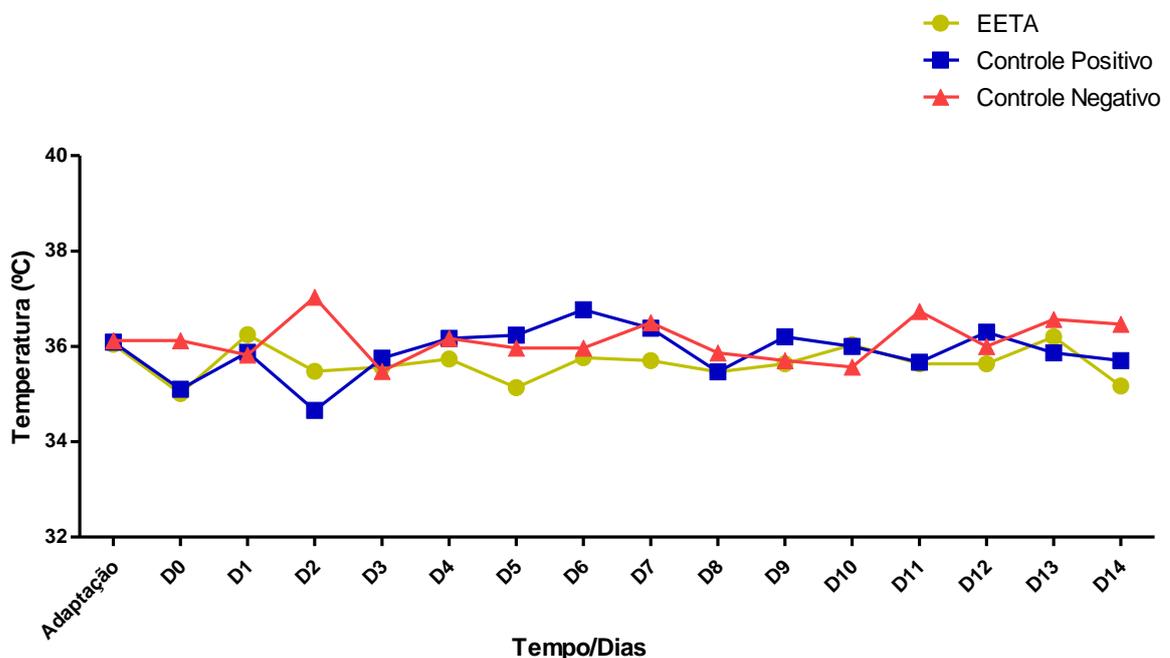
variação do peso do animal, visto ser um importante indicador para avaliar possível indicativo de toxicidade de uma substância.

Temperatura

Os dados expressam que houve alteração significativa da temperatura do grupo CN quando comparado aos grupos CP e EETA ($p = 0,0003$). A significância ocorreu apenas no segundo dia de pós-operatório como mostra o gráfico 3. O segundo dia correlaciona-se à fase inflamatória da cicatrização, justificando esse aumento para o grupo sem tratamento. Possivelmente, os grupos tratados com o dexpanthenol e EETA possuem alguma atividade anti-inflamatória, diminuindo o recrutamento de citocinas que induzem a alteração da temperatura corporal.

Lesão celular, infecção e inflamação induzem macrófagos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais ativadas a produzirem IL-1 (interleucina 1), que produz inflamação sistêmica através da ativação da ciclooxigenase-2 com a formação de PGE₂ (prostaglandina 2) no hipotálamo anterior, estimulando a produção de neurotransmissores que reajustam a temperatura em nível mais alto (OLIVEIRA et al., 2011; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Gráfico 3 - Média das temperaturas obtidas por grupo experimental avaliadas desde a fase de adaptação ao término do experimento



Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

5.3.2 Avaliação macroscópica da cicatrização das feridas

A avaliação macroscópica das lesões propiciou acompanhar os eventos cicatriciais em suas fases, de modo a permitir a avaliação das terapêuticas empregadas para o tratamento das lesões. O quadro 4 mostra o resultado dos achados da evolução dos grupos quanto aos parâmetros avaliados.

Quadro 4 - Resultado dos achados da evolução macroscópica das feridas delineadas por grupo e dias de avaliação

Crítérios Avaliados	Grupos	Achados D3 (%)	Achados D7 (%)	Achados D11 (%)	Achados D14 (%)
Rubor perilesional	EETA	(+) 77,7 %	-	-	-
	CP	(+) 44,4%	(+) 16,7%	-	-
	CN	(+) 100%	(+) 50%	-	-
Inflamação	EETA	(+) 77,7 %	-	-	-
	CP	(+) 55,5%	(+) 16,7%	-	-
	CN	(+) 100%	-	-	-
Exsudato	EETA	(+) 22,3 %	-	-	-
	CP	(+) 44,4%	(+) 16,7%	-	-
	CN	-	-	-	-
Fibrina	EETA	(+) 11,2%	(+) 16,7%	-	-
	CP	(+) 100%	(+) 83,3%	-	-
	CN	(+) 100%	(+) 83,3%	(+) 33,3%	(+) 33,3%
Tecido de granulação	EETA	(+) 11,2%	-	-	-
	CP	(+) 44,4%	(+) 100%	(+) 100%	(+) 100%
	CN	-	(+) 100%	(+) 100%	(+) 100%
Extensão da crosta	EETA	(PC) 100%	(PC) 50% (TT) 50%	(PC) 66% (TT) 22%	(TT) 100%
	CP	-	-	-	-
	CN	-	-	-	-

Fonte: Dados da Pesquisa, 2015. Legenda: (-) = ausente; (+) = presente. Em extensão da crosta: (-) = ausente; PC = parcial; TT = total. EETA = extrato etanólico de folhas de *Tabebuia aurea*; CP = controle positivo CN = controle negativo

Em todas as fases de cicatrização, o grupo CP, tratado com dexpanthenol, obteve melhor evolução que os demais. Durante as avaliações, apresentou moderadamente hiperemia das bordas da ferida, inflamação, exsudato e fibrina até o 7º dia. A fibrina foi abundante ao 3º dia, mas de fácil remoção durante o tratamento. Houve formação de tecido de granulação ao 3º dia em alguns animais. As feridas apresentaram aspecto úmido com ausência de formação de crosta e evolução progressiva da contração.

O grupo CN apresentou, em todos os animais, características inflamatórias, maior rubor perilesional além de fibrina ao 3º dia de tratamento e sem presença de

exsudato. As feridas possuíram características de ressecamento, permanecendo assim até o 4º dia. As bordas da ferida, até o 3º dia, apresentaram área maior que os demais grupos, ou seja, percentual de contração menor em todas fases. Não houve presença de crosta nos animais deste grupo em nenhum dia de avaliação sendo possível observar tecido de granulação a partir do 7º dia.

O grupo EETA foi o que evidenciou menor processo inflamatório, ausência de hiperemia e exsudato desde o 7º dia, quando comparado aos grupos controles. A crosta esteve presente parcialmente em todos os animais do grupo até o 3º dia evoluindo para crosta de extensão total em todos os animais ao fim dos 14 dias de tratamento. No 11º dia, parte dos animais passou a apresentar parte da crosta destacável nas bordas da ferida e, a partir deste período, a contração das lesões foi mais significativa.

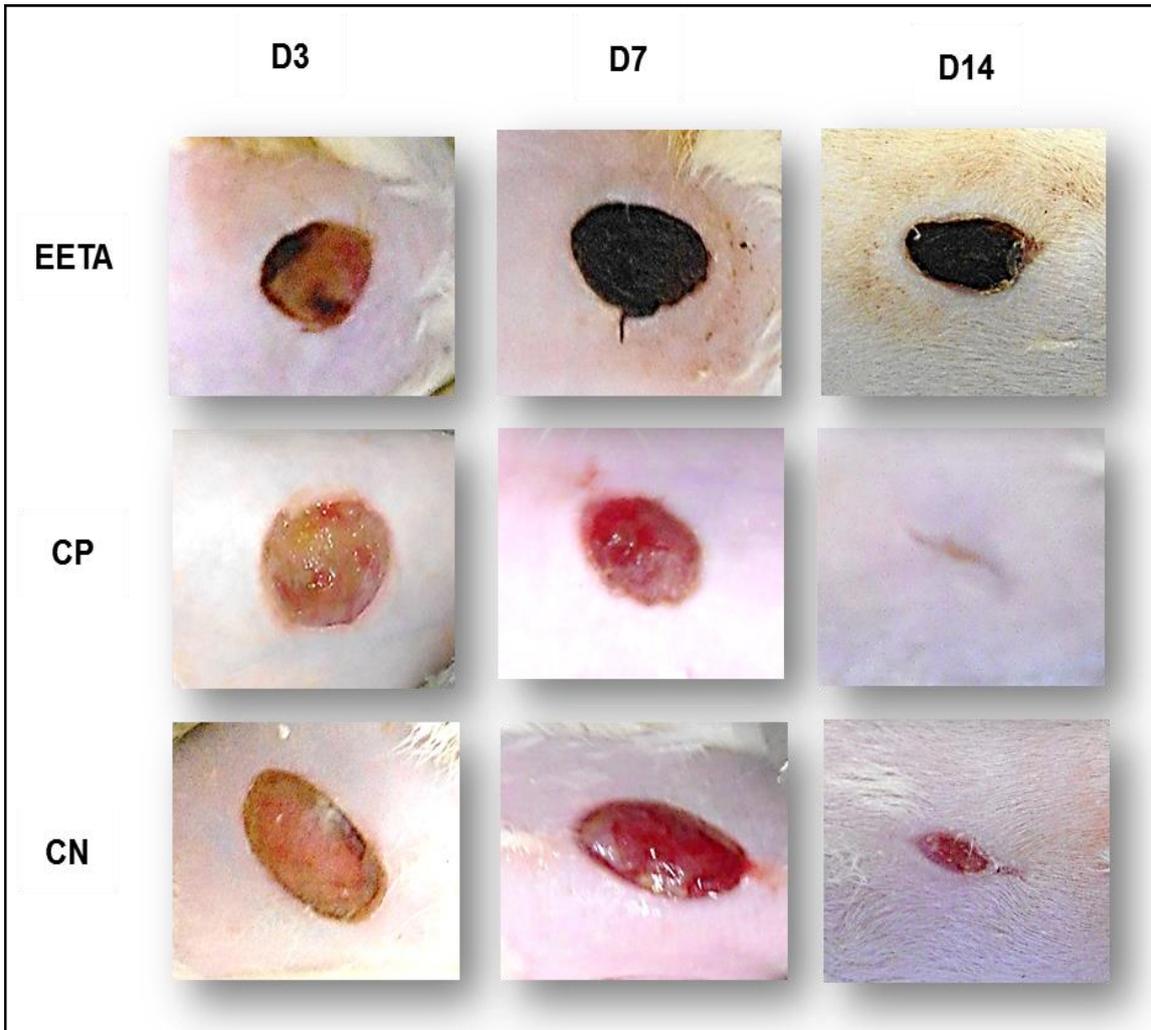
A presença de crostas é comumente encontrada na fase proliferativa (HOSGOOD, 2006), é um tecido desvitalizado ocasionado pelo ressecamento e desidratação celular, pode ser serosa, purulenta ou hemática a depender do exsudato apresentado na superfície da lesão. Inicialmente, essa formação é importante porque serve como barreira contra microrganismos.

O curativo oclusivo é aplicado com a intenção de manter a umidade da pele, porquanto a migração celular do epitélio ocorre duas vezes mais rápido nessas condições, prevenindo a formação de crosta por desidratação celular (PRENTICE, 2014). Muita embora tenham sido realizados os cuidados necessários para manter a umidade da ferida, a troca de curativo tenha sido realizada com técnica asséptica para prevenir contaminação, houve formação da crosta para o grupo EETA.

Importante referir que, ao realizar as trocas de curativo do grupo EETA, a cobertura apresentava uma coloração avermelhada que pigmentava inclusive a pele do animal (Figura 6). Esta coloração pode ser atribuída ao metabólito secundário antraquinona, fortemente presente no EETA, que apresenta uma coloração entre o amarelo e vermelho, sendo este metabólito geralmente empregado como corante (SANTOS; SILVA; BRAZ FILHO, 2008).

Não houve aproximação total das bordas das feridas em nenhum dos grupos ao final do experimento, muito embora o grupo CP mostrou-se quase que totalmente reepitelizado aos 14 dias. A sequência de eventos relacionada à evolução macroscópica das feridas foi fotografada durante todo o tratamento e está mostrada por dia de avaliação (D3, D7 e D14) na figura 6.

Figura 6 - Evolução macroscópica do tratamento das feridas por grupo e dias de avaliação



Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

Lima (2010), em seu experimento de cicatrização utilizando barbatimão a 5% (*Stryphnodendron adstringens*) em coelhos como modelo animal, obteve o resultado de crostas firmemente aderidas ao 3º dia em todos os grupos avaliados e sua remoção só foi possível, sem traumas ao epitélio, em média, aos 18 dias de tratamento, obtendo reepitelização completa aos 21 dias.

Araújo (2010), avaliando a cicatrização com óleo de *Ouratea* sp e óleo de *Helianthus annuus* (óleo de girassol), obteve evolução da ferida com presença de crosta aderida em todos os grupos com formação desta a partir do 4º dia e sem desprendimento para o grupo tratado com óleo de girassol e para o grupo controle negativo tratado com solução salina. O grupo tratado com *Ouratea* sp apresentou crosta regular e menos espessa que os outros grupos e seu desprendimento ocorreu

entre o 8º e o 12º dia. Até o fim do tratamento (D12), não houve reepitelização completa para todos os grupos.

Em grupo tratado com extrato aquoso de urucum (*Bixa orellana* L.) contendo norbixina a 2,5%, foi constatada a formação de crosta fibrino-leucocitária espessa que permaneceu aderida ao leito cirúrgico em cronologia idêntica ao observado no grupo controle (SANTOS et al., 2014b).

Avaliando a cicatrização induzida pelo extrato de *Jatropha gossypifolia*, exsudação plasmática com formação de crostas superficiais foi encontrada até o 7º dia de tratamento e após este período houve o espessamento da crosta, destacando-se aos 14 dias. Evoluiu para epitelização completa ao 21º dia (SANTOS et al., 2006).

Branco Neto (2006) obteve 60% de epitelização aos 21 dias de tratamento no grupo tratado com aroeira em comparação ao controle negativo (SF 0,9%), que obteve completa reepitelização, e durante todo o experimento observou-se evolução lenta quando comparado ao controle.

Em relação a experimentos envolvendo a família Bignoniaceae, a presença de crosta espessa castanho-escuro é normalmente encontrada. Tresvenzol et al. (2013), avaliando extrato de folhas e raízes de *Memora nodosa*, encontrou crosta em todos os grupos a partir do 7º dia com perda da crosta ao 12º dia.

Silva (2006), utilizando pomada com extrato de *T. avellanedae* a 10%, observou a presença de crosta intensa em 40% dos animais ao 3º dia e 60% ao 7º dia, diminuindo a intensidade a partir do 10º dia, estando ausentes ao 14º dia de tratamento. A reepitelização foi completa aos 14 dias.

Lipinski et al. (2012), avaliando o extrato de *T. avellanedae* nos primeiros 3 dias de experimentação, encontrou no grupo tratado com a planta crostas serosas, suaves e finas com bordas menos edemaciadas em comparação com os outros grupos.

Assim, outras pesquisas envolvendo modelo animal que avaliaram extratos ou preparações oleosas a partir de plantas obtiveram resultados semelhantes relacionados à formação de crosta na lesão e reepitelização entre 14 dias ou mais de tratamento (LIMA, 2010; ARAÚJO, 2010; SANTOS et al., 2014b, SANTOS et al., 2006) e quando se relaciona à família da espécie estudada, os resultados também se assemelharam (TRESVENZOL et al., 2013; SILVA, 2006; LIPINSKI et al., 2012).

Pode-se concluir que o EETA tem a característica de formação de crosta no processo de cicatrização e, muito embora esta formação seja compreendida como barreira protetora contra microrganismos, sua permanência impede a contração da

borda da ferida. Esse processo não impede que a cicatrização continue a ocorrer abaixo da crosta e que, com a reepitelização total, a crosta se destaque. A ação adstringente dos taninos presentes no extrato utilizado pode estar relacionada com a gênese da crosta.

A presença de esteroides no extrato, identificada na prospecção fitoquímica, pode estar relacionada, também, ao retardamento da cicatrização do grupo EETA. Apesar do benefício do uso de esteroides em algumas doenças (broncoespasmo, artrite reumatoide), na cicatrização, pode resultar em atraso da cura (STOJADINOVIC et al., 2007; FEESER et al., 2009).

Segundo Kaushal, Kutty e Rao (2006), a ação negativa dos esteroides sobre os resultados de cura de feridas está relacionada ao impedimento da contração da ferida devido à diminuição da força tênsil. O impacto de glicocorticoides na cicatrização de feridas incluem a inibição da proliferação fibroblástica e a diminuição da produção de colágeno (ANDERSON; HAMM, 2014).

5.3.3 Avaliação morfométrica da ferida

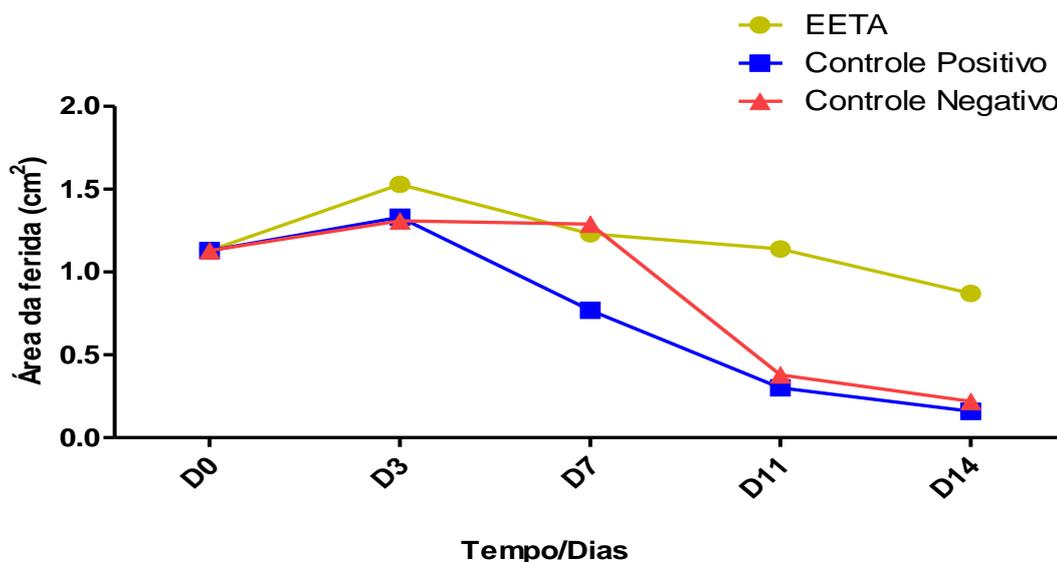
A avaliação morfométrica tem por finalidade permitir a obtenção do percentual de contração da ferida durante a evolução do processo cicatricial (CARDINAL et al., 2009). O gráfico 4 mostra perceptível aumento da área da ferida no período entre D0 e D3 e a diferença da evolução da contração da ferida do grupo EETA em relação aos demais grupos a partir de D7, contudo, apenas em D11 e D14 foi demonstrado significância estatística como demonstra a tabela 5.

Tabela 5 - Variação das áreas das feridas (cm²) dos grupos EETA, controle positivo (CP) e controle negativo (CN) nos dias de avaliação macroscópica expressa como média (M) e erro padrão da média (E.P)

Grupos	Média da área da ferida (cm ²) ± Erro Padrão			
	D3 M ± E.P	D7 M ± E.P	D11 M ± E.P	D14 M ± E.P
EETA	1,53 ± 0,12	1,23 ± 0,15	1,14 ± 0,17	0,87 ± 0,16
CP	1,33 ± 0,18	0,77 ± 0,11	0,30 ± 0,04	0,16 ± 0,00
CN	1,31 ± 0,12	1,25 ± 0,14	0,38 ± 0,05	0,22 ± 0,04
Valor de p	0,5174	0,8117	0,0026*	0,0040*

Fonte: Dados da pesquisa, 2015. Nota: *p <0,01, grupo EETA comparado aos grupos positivo e negativo.

Gráfico 4 - Variação média da área das feridas (cm²) de acordo com o grupo de tratamento e segundo os dias de avaliação



Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

Madison e Gronwal (1992) referem que, do mesmo modo que no processo de cicatrização há três fases encadeadas, o processo de contração das feridas também segue três fases. Uma *fase inicial de retração centrífuga* com aumento da área lesionada devido a perda da tensão elástica da pele adjacente, da formação de edema (BARBER, 1990), da perda da aderência à fáscia profunda e de uma característica inerente à pele do rato: sua mobilidade (CROSS; NAYLOR; COLEMAN, 1995; TEO; NAYLOR, 1995). Uma *fase de contração rápida com força centrípeta*, ou seja, em direção ao centro da lesão (MADISON; GRONWAL, 1992) e, por último, uma *fase de contração lenta*, quando a ferida está em fase final de cicatrização (MADISON; GRONWAL, 1992).

Tais fases podem ser observadas perfeitamente no gráfico 4, como também é possível observar uma menor contração do grupo EETA, pois, como anteriormente descrito, teve o processo de contração da ferida retardado em relação aos demais grupos devido à formação de crosta.

Não houve, até o 14º dia, destacamento total da crosta em nenhum animal do grupo EETA e só foi possível observar algum percentual de contração da ferida positivo ao final do experimento (Tabela 6) como consequência do destacamento de parte da crosta a partir das bordas da lesão ocorrido no 7º dia de avaliação. O grupo tratado com dexpanthenol obteve percentual de contração positivo desde o 7º dia e o CN a partir do 11º dia.

Tabela 6 - Percentual de contração da ferida (%) em relação ao tamanho original mostrado por grupos: grupo EETA, controle positivo (CP) e controle negativo (CN) e por dias de avaliação macroscópica

Grupos	Percentual de Contração (%)			
	D3	D7	D11	D14
EETA	-35,40	-8,85	-1,18	22,71
CP	-18,19	31,86	73,45	85,54
CN	-16,12	-14,16	66,66	80,23
Valor de p	0,5174	0,8117	0,0026*	0,0040*

Fonte: Dados da pesquisa, 2015. Nota: *p < 0,01, grupo EETA comparado aos grupos positivo e negativo.

5.3.4 Avaliação histopatológica da ferida

Como referido na metodologia, os dados histopatológicos foram coletados considerando as fases de cicatrização de feridas (D3, D7, D14) e os resultados foram dispostos na tabela 7 com a análise dos escores quantificados seguindo metodologia de Sarmiento et al. (2014).

Tabela 7 – Escores da avaliação histopatológica das feridas dos grupos EETA, controle positivo e controle negativo

Dia de eutanásia	Escores			Valor de p
	EETA	Controle positivo	Controle negativo	
3º	46,00	41,00	44,67	0,809
7º	76,33	91,33	90,00	0,681
14º	106,3	115,7	119,0	0,039*
Média	76,21	82,68	84,56	0,955

Fonte: Dados da pesquisa, 2015. Nota: *p < 0,05, grupo EETA comparado ao controle negativo.

Não houve significância estatística entre os grupos na avaliação histopatológica nos dias 3 e 7 de avaliação, entretanto foi significativa no 14º dia quando comparado o grupo EETA ao grupo controle negativo. Os resultados macroscópicos do grupo EETA demonstraram evolução em relação à área da ferida e ao percentual de contração desfavorável, visto a formação de crosta no leito da ferida. A análise histopatológica corrobora com o resultado macroscópico mostrando significância apenas na fase de remodelação, na qual sugere que a crosta, formada no grupo utilizando o extrato, interferiu na reepitelização total deste grupo no período de 14 dias, tendo os demais grupos alcançado a reepitelização total. No entanto, ao realizar a média geral da cicatrização por grupo, não houve significância estatística entre eles.

No 3º dia, os grupos CP e CN obtiveram maiores escores para proliferação fibroblásticas e o grupo EETA maiores escores para tecido de granulação. O grupo CN – um animal do grupo – foi o único que apresentou fibras de colágeno ao 3º dia de tratamento. No 7º dia os achados entre os grupos foram similares e no 14º dia, como citado, a principal diferença foi a reepitelização total dos grupos CP e CN e reepitelização parcial do grupo EETA. A presença de crosta foi encontrada em todos os grupos até o 7º dia de tratamento, permanecendo no grupo EETA até o 14º dia e ausência nos grupos controles neste período. Pode-se observar alguns achados nas fotomicrografias das feridas na figura 7.

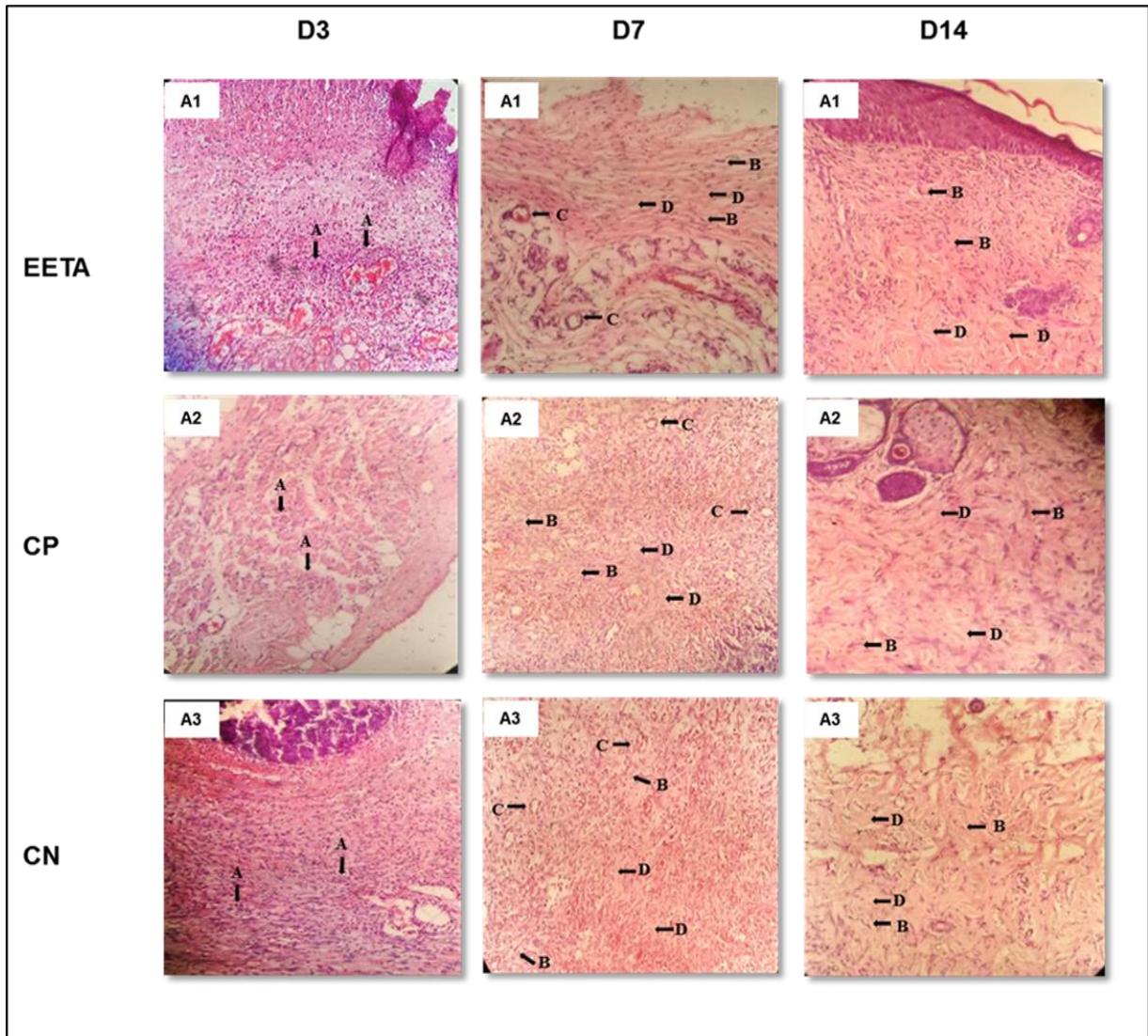
Silva (2006) evidenciou, em seu resultado histopatológico em estudo de cicatrização em feridas cutâneas em ratos com o extrato de *T. avellanae* a 10%, menor infiltrado inflamatório e presença de crosta moderada quando comparado ao controle no 3º dia de avaliação, no 7º dia evidenciou fibras colágenas mais abundantes que o controle e ao 14º dia total epitelização das feridas.

Coelho et al. (2010) avaliaram a pomada de *T. avellanae* a 10% - extrato aquoso da casca do caule - e os resultados da avaliação histológica mostraram maior presença de fibroblastos e vasos neoformados no 7º dia quando comparado ao controle e no 14º dia epitelização completa.

Lipinski et al. (2012), avaliando o extrato aquoso de serragem de *T. avellanae* em bovinos, quando comparado ao controle negativo, obteve no resultado histopatológico melhores resultados para fibroplastia e maior presença de tecido de granulação no 16º dia de tratamento.

Em relação à família Bignoniaceae, avaliando a solução aquosa a 2% de folhas e raízes da *Memora nodosa* (TRENDSVEZOL et al., 2013), apenas a solução aquosa a 2% do extrato bruto das raízes contribuiu no processo final de reepitelização, não havendo diferença significativa entre os extratos e o controle na avaliação histopatológica. O extrato etanólico do caule de *Zeyheria tuberculosa* utilizado oral e topicamente (SARMENTO et al., 2014) evidenciou escores melhores que os controles (positivo e negativo), demonstrando melhor processo de cicatrização permeando todas as fases. Ambos os estudos utilizaram ratos como modelo animal.

Figura 7 - Fotomicrografia de feridas cutâneas relacionando dias de avaliação e tratamento utilizado



Fonte: Dados da pesquisa, 2015. Legenda: A – infiltrado inflamatório; B – fibroblastos; C – vasos neoformados; D – fibras de colágeno; A1 – grupo EETA; A2 – grupo Controle positivo; A3 – grupo Controle negativo. Nota: aumento 40x, corado com hematoxilina e eosina.

Pode-se concluir que a evolução histopatológica das feridas cutâneas tratadas com o EETA a 5% possuem evolução semelhante em relação aos controles até o 7º dia e que a formação de crosta é o único item que diminui os escores do grupo tratado com extrato e que a formação de crosta sugere estar relacionada ao gênero.

5.3.5 Peso e avaliação de aspectos macroscópicos/morfológicos dos órgãos

A avaliação macroscópica dos órgãos após à eutanásia permite perceber possíveis alterações, como formações nodulares, fibroses, manchas ou

deformidades, sendo que nenhum dos órgãos apresentaram qualquer alteração. Não houve diferença estatística da média do peso dos órgãos entre os grupos quando comparados ao controle negativo como mostra a tabela 8.

Tabela 8 - Peso dos órgãos (rins e fígado) dos grupos EETA, controle positivo (CP) e controle negativo (CN) expresso como média (M) e erro padrão da média (E.P)

Órgãos	Pesos dos órgãos avaliados			Valor de p	
	Grupos	EETA M ± E.P	CP M ± E.P		CN M ± E.P
Rim Direito		0,62 ± 0,03	0,64 ± 0,04	0,66 ± 0,04	0,8246
Rim Esquerdo		0,59 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,57 ± 0,03	0,8661
Fígado		5,82 ± 0,32	5,89 ± 0,39	5,56 ± 0,24	0,7463
Peso animais (D14)		167,7 ± 1,33	170,3 ± 7,42	174,3 ± 7,33	0,7478

Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

Bautista et al. (2004), em seus experimentos com bixina em pó diluída em água filtrada – utilizada como corante pela indústria de massas, rações animais e produtos oleosos – quanto aos efeitos tóxicos decorrentes da exposição subcrônica do produto administrado por gavagem em ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar) com média de peso de 100 g, tiveram como resultado, para seus animais sem tratamento, peso dos rins com média de 0,6 g e fígado com média de 2,7 g.

Bellei et al. (2012), investigando a toxicidade da isoflavona sintética ipriflavona em ratas (*Rattus norvegicus*, Wistar), com peso médio desses animais de 180 g, apresentaram para seus controles o peso médio dos rins de 1,3 g e fígado 8,7 g.

Avaliando a toxicidade do extrato de folhas de *Apeiba tibourbou*, também utilizando *Rattus norvegicus* fêmeas da linhagem Wistar com peso médio de 200 g, sendo o extrato diluído em água e administrado por gavagem, Cunha et al. (2013) obtiveram resultados de peso (g/100 g de peso vivo) de 9,39 g para o fígado, rim direito com 1,30 g e rim esquerdo com 1,27 g.

Há carência na literatura sobre avaliação de órgãos em experimentos de cicatrização, contudo, apesar das pesquisas não envolverem cicatrização e a via de administração do medicamento diferir deste estudo, os animais utilizados como padrão para comparar os resultados desta pesquisa foram seus controles negativos.

Percebe-se, entre os estudos acima citados, que o peso dos órgãos varia de acordo com o peso dos animais e que este motivo refletiu nas variações entre os pesos dos órgãos dos estudos em que o peso dos rins variou entre 0,6 g a 1,3 g e o

fígado 2,7 g a 9,39 g, além do que, nos estudos referidos, as comparações de peso são realizadas considerando os valores encontrados nos grupos controles negativo.

Tais considerações permitem justificar a comparação dos grupos experimentais ao controle negativo do próprio experimento realizada nesta pesquisa, deste modo, pode-se inferir que o peso dos órgãos encontrados para este experimento não sofreu variação entre os grupos quando comparado ao grupo controle negativo.

5.3.6 Análise bioquímica

Os testes séricos indicadores de toxicidade realizados resultaram em parâmetros de avaliação similares para todos os grupos em estudo (Tabela 9). A análise bioquímica se fez necessária buscando avaliar alterações da função hepática e renal que possam ter sido provocadas pelo uso do EETA nos animais em experimento. Como parâmetro comparativo utilizou-se o grupo CN, visto este grupo não ter recebido tratamento medicamentoso conservando os valores padrões de referência para os testes em análise.

Tabela 9 - Resultados dos valores bioquímicos dos grupos EETA, controle positivo (CP) e controle negativo (CN), expresso como média (M) e erro padrão da média (E.P)

Bioquímico	Grupos	Resultados bioquímicos			Valor de p
		EETA M ± E.P	CP M ± E.P	CN M ± E.P	
AST (U/L)		82,88 ± 6,76	98,50 ± 8,56	102,0 ± 11,11	0,2981
ALT (U/L)		42,75 ± 4,53	53,50 ± 5,39	49,00 ± 3,61	0,2696
Ureia (mg/dL)		46,29 ± 3,12	40,53 ± 3,28	43,10 ± 3,25	0,4604
Creatinina (mg/dL)		0,23 ± 0,03	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,8264

Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

A análise sérica das aminotransferases AST e ALT permite inferir se houve lesão hepatocelular aguda caso haja o aumento destas transaminases hepáticas. Analisar ureia e creatinina permite inferir lesão renal, visto serem metabólitos usualmente eliminados através da urina após filtração pelos rins e valores aumentados desses metabólitos sugerem algum dano renal.

De acordo com os resultados mostrados na tabela 9 para AST, ALT e creatinina, os valores obtidos para o grupo tratado com EETA em relação ao CN (não tratado) tiveram valores menores dessas enzimas e metabólitos. Apenas a ureia

apresentou pequena elevação considerando a mesma comparação. Tais variações não foram significantes estatisticamente.

Apesar de se esperar que os valores bioquímicos de ratos de laboratório reflitam padrões análogos, pesquisas permitem deduzir não ser possível delimitar valores de referência universais para estes animais. Gênero, linhagem, genótipo, idade, dieta, manuseio e ambiente (PINHEIRO et al., 1997), fatores ecológicos característicos de cada latitude geográfica do planeta (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1994) além da dieta do animal, tempo de jejum e estresse durante a coleta (MELO et al., 2012) são fatores de influência para mudanças nos valores hematológicos e bioquímicos desses animais.

Em estudo experimental realizado por Castello Branco et al. (2011), no qual foram avaliados parâmetros hematológicos e bioquímicos entre ratos machos e fêmeas, em dois períodos diferentes (2006 e 2009), provenientes do Biotério Professor Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), comparando seus valores com o de outras literaturas, concluiu-se que os resultados encontrados em seu estudo divergiram de outros estudos encontrados na literatura e até mesmo na própria pesquisa quando comparou-se os valores bioquímicos entre 2006 e 2009 e entre os sexos.

Spinelli et al. (2014) avaliaram os parâmetros bioquímicos de ratos, camundongos e coelhos em relação à sazonalidade e evidenciaram que, apesar dos animais serem mantidos em alojamento com condições padronizadas, houve alterações dos valores bioquímicos dependentes da sazonalidade, sendo que no verão percebeu-se um aumento desses valores.

Estudos que avaliaram parâmetros hematológicos e bioquímicos também evidenciaram diferenças quando comparados a outros estudos que apresentaram tais parâmetros (DANTAS et al., 2006; LIMA et al., 2014; MELO et al., 2012). Castello Branco et al. (2011) salientam a importância da divulgação dos valores dos parâmetros fisiológicos dos animais em experimentação de diferentes biotérios, visto essas variações influenciarem parâmetros comparativos nas pesquisas experimentais, incitando que cada biotério estabeleça seus valores de referência.

Muito embora a literatura relate que há dificuldade de se estabelecer valores bioquímicos padronizados para animais de laboratório, o estudo de Lima et al. (2014), buscando determinar a faixa de valores de referência para os parâmetros hematológicos e bioquímicos de animais não tratados provenientes do Biotério da

Universidade Tiradentes, Sergipe, Brasil, encontrou resultados que se assemelham aos desta pesquisa, utilizando, assim como este estudo, ratos fêmeas da linhagem Wistar, obtendo os seguintes resultados: AST (U/L) $107,87 \pm 53,96$; ALT (U/L) $45,47 \pm 9,23$; uréia (mg/dL) $39,17 \pm 6,43$; creatinina (mg/dL) $0,57 \pm 0,19$; os quais se assemelham com os da presente pesquisa conforme tabela 9.

Os valores bioquímicos apresentados neste estudo, comparados tanto ao grupo CN (não tratado), como aos resultados de Lima et al. (2014), permitem inferir que não houveram alterações bioquímicas dos animais utilizados na experimentação, em nenhum dos grupos.

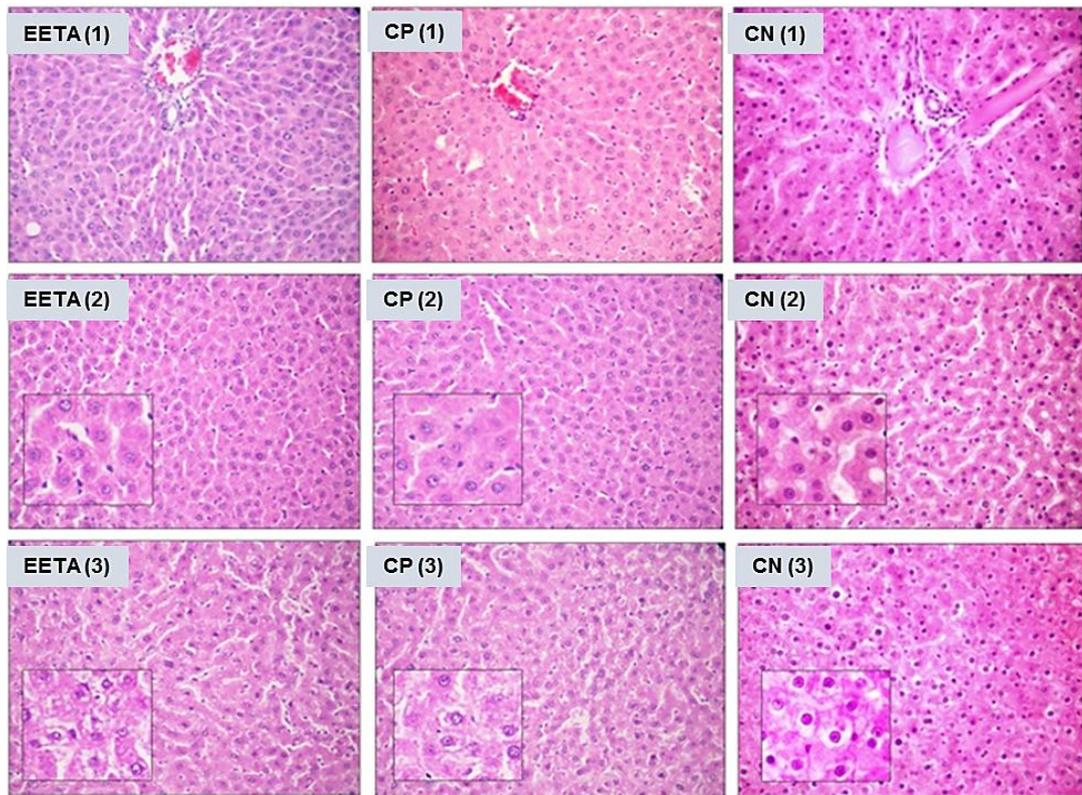
5.3.7 Análise histopatológica dos órgãos

A avaliação das amostras histológicas do fígado resultou em observação de lóbulos mal definidos com veia hiperêmica central e com pouco tecido conjuntivo. O parênquima se encontrou constituído de hepatócitos poligonais unidos uns aos outros em placas ou cordões anastomosantes com bordas que se apresentavam frente aos sinusóides ou as células do parênquima adjacente. Em algumas áreas, todos os espécimes estudados, independentemente do tratamento, demonstraram focos de hepatócitos exibindo degeneração hidrópica citoplasmáticas bem como ocasionais corpos apoptóticos (Figura 8).

Ductos biliares foram observados, mas nenhum sinal de acumulação de bilirrubina (colestase) foi presenciado. Além disso, escassos linfócitos foram observados na área da tríade portal, mas é pouco provável que eles estivessem relacionados a qualquer procedimento do tratamento, uma vez que os mesmos foram observados em todas as amostras.

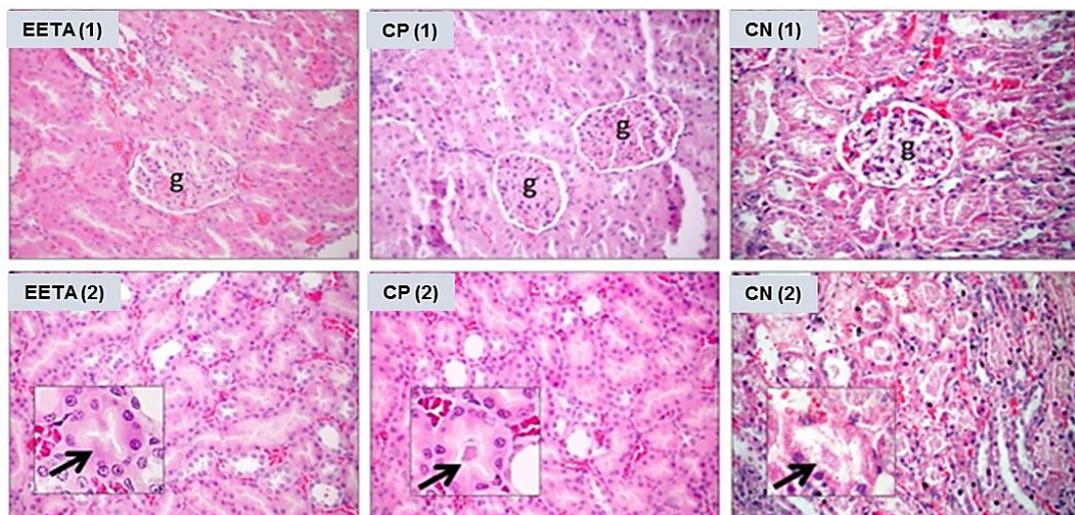
A análise do tecido renal revelou focos de alterações degenerativas dos túbulos contorcidos proximais, uma acumulação focal de material proteico, como amorfo eosinofílico nos túbulos distais (Figura 9) e discreto aumento da cápsula de Bowman também foi observado. Entretanto, com todas essas alterações histológicas observadas da mesma forma nas amostras do fígado e rim de todos os grupos, elas não foram consideradas como sinais morfológicos de toxicidade.

Figura 8 - Fotomicrografia de tecido hepático mostrado de acordo com grupo de tratamento



Fonte: Dados da pesquisa, 2015. Legenda: (1) Veia portal apresentando hiperemia e hepatócitos poligonais dispostos em placas típicas anastomosadas limitando os canais vasculares sinusoidais. (2) Cordões e placas de hepatócitos com morfologia típica. (3) Cordões de hepatócitos apresentando perda de eosinofilia citoplasmática e vacuolização com degeneração hidrópica. Nota: aumento de 400x; detalhe: aumento de 1000x; corado com hematoxilina e eosina.

Figura 9 - Fotomicrografia de tecido renal mostrado de acordo com grupo de tratamento



Fonte: Dados da pesquisa, 2015. Legenda: (1) Córtex renal apresentando glomérulos e túbulo contorcido proximal e distal sem nenhum sinal de dano histopatológico. (2) Túbulos distais apresentando acumulação focal de material proteico, como amorfo eosinofílico. Nota: aumento de 400x; detalhe: aumento de 1000x; corado com hematoxilina e eosina.

A análise histopatológica de órgãos como fígado e rim é importante para avaliar o comportamento de substâncias absorvidas pelo organismo. O fígado é o principal alvo responsável pelo metabolismo de substâncias químicas enquanto o rim é comumente considerado um indicador de toxicidade (KOH et al., 2015), sendo as alterações histológicas correlacionadas com os dados bioquímicos obtidos.

Estudos relatam diferenças obtidas em seus testes de avaliação *in vitro* e *in vivo*, por exemplo, Macaluso et al. (2012) analisaram, *in vitro* (células Leydig de ratos – linhagem R2C) e *in vivo* (em seres humanos, sendo dez indivíduos do sexo masculino fisicamente ativos), se a suplementação de ácido linoleico conjugado (CLA) pode mediar um aumento na secreção de testosterona. Os resultados *in vitro* mostraram aumento linear na concentração de testosterona secretada em um período de 48 horas ao receber suplementação de CLA e *in vivo* apenas ligeiro aumento na testosterona total em comparação com o placebo foi observada, não sendo significativa como no resultado *in vitro*.

A pesquisa de Garcia-Godoy et al. (2010), avaliando a qualidade de restaurações dentárias ao longo de seis anos em análise comparativa de testes *in vitro* (com dentes molares humanos extraídos e restaurados com resina) versus *in vivo* (trinta pacientes que receberam restaurações de resina), puderam concluir que microinfiltrações marginais em restaurações adesivas foram substancialmente mais severas no grupo *in vivo*, não sendo possível prever, com segurança, o comportamento clínico de restaurações adesivas em laboratório.

Possivelmente, por melhor que se tente reproduzir *in vitro* condições similares de temperatura, fluidos e tecidos corporais, há, obviamente, diferenças que não permitem inferir que estes testes produzam resultados similares em ambas situações.

Quando se fala em interpretação de avaliação envolvendo efeitos tóxicos de um determinado material, Yoon et al. (2012) inferem que “resultados obtidos a partir de estudos *in vitro* não são, muitas vezes, diretamente interpretáveis no contexto de potencial em exposições *in vivo*”, evidenciando que “a mais óbvia diferença entre a situação *in vitro* e *in vivo* é a ausência de processos relacionados com a absorção, distribuição, metabolismo e excreção que governam a exposição do tecido alvo no organismo intacto”.

Apesar do teste de citotoxicidade *in vitro* pelo método de MTT nesta pesquisa ter apresentado citotoxicidade para o extrato de EETA em concentração a partir de 10 µg/mL, na avaliação clínica, bioquímica, macroscópica e histopatológica de tecidos do

fígado e rim realizados a partir dos ensaios *in vivo*, sinais de toxicidade na utilização do creme do EETA por via tópica foram descartados.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir do estudo com o extrato etanólico de folhas da espécie *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore permitem concluir que:

- A análise fitoquímica qualitativa mostrou que o EETA possui os metabólitos secundários taninos, falvononóis, flavononas, flavonóis, flavonas e xantonas, antraquinonas, esteroide e alcaloides.
- A concentração inibitória mínima do EETA resultou em inatividade para todos os micro-organismos avaliados. As frações hexânica e clorofórmica resultaram em fraca inibição para a bactéria Gram-negativa *E. coli* na concentração de 1000 µg/mL e inatividade para fungo em todas as frações e concentrações.
- O EETA indicou citotoxicidade *in vitro* em concentrações a partir de 10 µg/mL.
- A avaliação macroscópica das feridas permite concluir que os animais tratados com o creme de EETA a 5% apresentaram menos rubor perilesional e inflamação no processo inicial da cicatrização em relação aos grupos controles.
- A formação de crosta no grupo tratado com EETA a 5% promoveu uma diminuição de contração da ferida em relação aos outros grupos, mas esse fato não pode ser correlacionado com menor qualidade da evolução das feridas.
- A avaliação histopatológica se mostrou estatisticamente sem significância até o 7º dia, entretanto, significância do grupo tratado em relação aos controles no 14º dia relacionado à presença de crosta.
- A avaliação de peso, aspecto e morfologia dos órgãos (fígado e rins) não apresentou alterações e, do mesmo modo, não houve alteração dos padrões bioquímicos avaliados.
- A análise histopatológica do fígado e rim revelou ausência de sinais de toxicidade nestes órgãos, corroborando com a avaliação macroscópica dos órgãos, avaliação clínica e bioquímica dos animais, sugerindo que a utilização do EETA na concentração testada e pelo período avaliado não é tóxico ou não há absorção sistêmica do extrato quando utilizado topicamente em ratos.

Deste modo, apesar dos metabólitos secundários encontrados no EETA serem descritos na literatura com potenciais antimicrobianos e cicatrizantes, os resultados encontrados na presente pesquisa evidenciaram nenhuma atividade antimicrobiana para o extrato, fraca atividade antimicrobiana para frações do extrato, evolução

cicatrizal inferior aos grupos controles analisados, citotoxicidade *in vitro* e sem sinais de toxicidade *in vivo*. Sugere-se, como perspectiva para novos estudos, realizar avaliação da atividade anti-inflamatória, visto os resultados encontrados na avaliação macroscópica da cicatrização no grupo tratado com o extrato.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383-395, 2007.
- ALAGOAS. Decreto estadual nº 6.239 de 29 de abril de 1985. Institui a Craibeira árvore símbolo do estado de Alagoas. Maceió, 1985.
- ALBERNAZ, L. C. **Substância antimicrobiana de amplo espectro de *Tabebuia caraíba***. 2006, 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2006.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 76-91, 2007a.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007b.
- ANDERSON, K.; HAMM, R. L. Factors that impair wound healing. **Journal of the American College of Clinical Wound Specialists**, v. 4, n. 4, p. 84-91, 2014.
- ARAÚJO, A. K. L. **Aspectos morfológicos do processo de cicatrização induzido por *Ouratea* sp.** 2010, 177 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.
- ARAÚJO, M. R. S.; COSTA, L. P. S.; CHAVES, M. H. Análise fitoquímica das folhas de espécies da família Bignoniaceae. In: **53º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA**, 2013, Rio de Janeiro/RJ.
- ARAÚJO, T. A. S. et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72-80, 2008.
- AYRES, M. C. C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 1, p. 90-97. jan./mar., 2008.
- BARBER, S. M. Second intention wound healing in the horse: The effect of bandages and topical corticosteroids. **Journal Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, v. 35, p. 107-116, 1990.
- BASTOS, M. L. A. et al. Antimicrobial and wound healing activities of *Piper hayneanum*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 213-222, 2011.

BATISTA, L. L. V. et al. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 6, p. 515-520, 2012.

BAUTISTA, A. R. P. L. et al. Avaliação da toxicidade oral subcrônica da bixina para ratos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, abr./jun., 2004.

BELLEI, P. M. et al. Efeito da ipriflavona sobre ratas Wistar e suas ninhadas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 34, n. 1, p. 22-27, jan. 2012.

BENFATTI, C. S. et al. Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de molícutes. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 33-39, 2010.

BERNARDO, T. H. L. et al. Antimicrobial Analysis of an Antiseptic Made from Ethanol Crude Extracts of *P. granatum* and *E. uniflora* in Wistar Rats against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

BHUVANESWARI, S. et al. Antioxidant activity and phytochemistry of various flowers from Tamil Nadu, India. **International Journal of Research in Pharmacy and Science**, vol. 5, n. 1, p. 40-45, 2014.

BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 218-225, set. 2014.

BRANCO NETO, M. L. C. et al. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p.17-22, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas**. Brasília, 2002. 52p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS**. Brasília, 2006a. 92 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília. 2006b. 60p.

BRUNING, M. C. R; MOSEGUI, G. B. G, VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2675-2685, 2012.

BUDNI, P. et al. Estudos Preliminares da Atividade Antioxidante do Extrato Hidroetanólico de Folhas Jovens e Adultas de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 394-398, 2007.

BYEON, S. E. et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 145-152, 2008.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD, arquivo brasileiro de cirurgia digestiva**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, mar., 2007.

CARDINAL, M.; EISENBUD, D. E.; ARMSTRONG, D. G. Wound shape geometry measurements correlate to eventual wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, Saint Louis, v. 17, p. 173-178, 2009.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326–342, 2010.

CASTELLO BRANCO, A. C. S. et al. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 209-214, 2011.

CASTRO, L. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato aquoso e etanólico de *Acanthospermum australe*. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v. 9, n. 2, p. 153-161, 2012.

CHAGAS JÚNIOR, J. M.; CARVALHO, D. A.; MANSANARES, M. E. A B. A família Bignoniaceae Juss. (Ipês) no município de Lavras, Minas Gerais. **Cerne, Lavras**, v. 16, n. 4, p. 517-529, out./dez. 2010.

CECHINEL FILHO, V. YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, 1998.

CHUSRI, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Detailed Studies on *Quercus infectoria* Olivier (Nutmalls) as an Alternative Treatment for Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 89-96, 2009.

CIPRIANI, F. A. et al. Implicações químicas na sistemática e filogenia de Bignoniaceae. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 11, p. 2125-2131, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: Approved standard. 3. ed. M07-A9. Wayne, PA, v. 32, n. 2, jan. 2012.

COELHO, J. et al. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 45-51, fev. 2010.

COELHO, M. C. O. C.; REZENDE, C. M. F.; TENÓRIO, A. P. M. Contração de feridas após cobertura com substitutos temporários de pele. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 297-303, 1999.

COLWELL, J. C. Integridade da pele e Cuidados de Feridas. In: POTTER, P. A.; PERRY, A. G. **Fundamentos de enfermagem**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

CROSS, S. E.; NAYLOR, I. L.; COLEMAN, R. A. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 48, n. 4, p. 189-197, 1995.

CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (Tiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 357-362, 2013.

CURVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent Advances in Understanding the Antibacterial Properties of Flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 2, p. 99- 107, 2011

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003.

DALL'AGNOL, R. et al. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 511-516, 2003.

DAMY, S. B. et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.

DANTAS, J. A. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**. Health Sciences, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas**. Um guia para as enfermeiras. 3ª ed. São Paulo: Atheneu. 2008. 248 p.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal Immunology Methods**, v. 89, p. 271–277, 1986.

DESOTI, V. C. et al. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 3-13, jan./abr. 2011.

DUARTE, J. L.; MOTA, L. J. T.; ALMEIDA, S. S. M. S. Análise fitoquímica das folhas de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (ipê-amarelo). **Estação Científica (UNIFAP)**. Macapá, v. 4, n. 1, p. 33-43, jan./jun. 2014.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, n. 7, 2006.

FEESER, V. R. et al. Androstenediol reverses steroid-inhibited wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 5, p. 758-761, set./out., 2009.

FERREIRA JÚNIOR, W. S.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 238-252, 2011.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 627-641, dez., 2008.

GARCEZ, F. R. et al. Novos constituintes químicos das cascas do caule de *Tabebuia Heptaphylla*. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1887-1891, set., 2007.

GARCIA-GODOY, F. et al. Long-term degradation of enamel and dentin bonds: 6-year results *in vitro* vs. *in vivo*. **Dental Materials**, v. 26, p. 1113-1118, 2010.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivo Instituto de Biologia**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GONZÁLEZ-COLOMA, A. et al. Antileishmanial, antitrypanosomal, and cytotoxic screening of ethnopharmacologically selected Peruvian plants. **Parasitology Research**, v. 110, n. 4, p. 1381-1392, abr., 2012.

HAJDU, Z.; HOHMANN, J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paragua Indian Reservation, Bolivia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 838-857, 2012.

HEMAMALINI, K.; BHARGAVA, A. Anti-ulcer activity of methanolic extracts of *Wattakaka volubilis* and *Tabebuia rosea* in rats. **Asian Journal Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 3, p. 242-246, jul., 2013.

HÖFLING, J. F. et al. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 4, p. 1065-1068, nov., 2010.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 36, n. 4, p. 667-685, 2006.

IATSYNO, A. I. et al. Pharmacology of Calenduloside B - A new terpene glycoside obtained from the roots of *Calendula officinalis*. **Farmakologija i toksikologija**, v. 41, p. 550-60, 1978.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DA SEPSE (ILAS). **SPREAD - Sepsis Prevalence Assessment Database**: pesquisa sobre sepse – Brasil Disponível em: <<http://www.ilas.org.br/pg.php?v=spread>> Acesso em: 25 jun. 2014

IRION, G. **Feridas**. Novas abordagens, manejos clínicos e atlas em cores. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**: Texto e atlas. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Concepts of Normality in Clinical Biochemistry. In: _____. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1994, cap.1.

KARAMAN, I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 1, p. 231–235, 2003.

KAUSHAL, M.; KUTTY, N. G.; RAO, C. M. Nitrooxyethylation reverses the healing-suppressant effect of Ibuprofen. **Mediators of Inflammation**, v. 2006, p. 1-7, 2006.

KEAST, D. H. et al. MEASURE: a proposed framework for developing best practice recommendations for wound assessment. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 3, p. 1-17, 2004.

KOH, E. et al.. **Laboratory Animal Research**, v. 31, n. 3, p. 125-133, set., 2015

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins, patologia básica** [tradução de Claudia Coana, et al.]. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LEE, M. H. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects in animal models of anethanolic extract of Taheebo, the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. **Molecular Medicine Reports**, v. 6, p. 791-796, 2012.

LIEDKE, D. C. F.; JOHANN, D. A.; DANSKI, M. T. R. Consultório de enfermagem para tratamento de feridas em hospital de ensino. **Cogitare Enfermagem**, v. 19, n. 3, p. 590-596, 2014.

LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, p. 1-9, 2014.

LIMA, C. R. O. **Reparação de feridas cutâneas incisionais em coelhos após tratamento com barbatimão e quitosana.**, 2010.104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

LIMA, I. C. et al. Integridade da pele comprometida em clientes ortopédicos. In: SILVA, R. C. L.; FIGUEIREDO, N. M. A.; MEIRELES, I. B. **Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem.** São Caetano do Sul – SP: Ed. Yendis, 2^a ed., 2008.

LIPINSKI, L. C. et al. Effects of 3 topical plant extracts on wound healing in beef cattle. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 9, n. 4, p. 542-547, jun., 2012.

LOHMANN, L. G. *Bignoniaceae*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB114257>>. Acesso em: 26 Jun. 2014

MACALUSO, F. et al. Effect of conjugated linoleic acid on testosterone levels *in vitro* and *in vivo* after an acute bout of resistance exercise. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 26, n. 6, p. 1667–1674, jun., 2012.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MADISON, J. B.; GRONWALL, R. R. Influence of wound contraction in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 1575-1578, 1992.

MAIA, L. C. M.; MONTEIRO, M. L. G. Úlceras por pressão: Prevenção e tratamento. In: SILVA, R. C. L.; FIGUEIREDO, N. M. A.; MEIRELES, I. B. **Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem.** São Caetano do Sul – SP, Ed. Yendis, 2^a ed, 2008.

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

MARDEGAN, R. C. **Atividade inibitória de extratos vegetais sobre *Candida spp* e sobre proteinases sintetizadas por *Candida albicans*.** 2007. 115 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba – SP, 2007).

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais.** Universidade Federal de Viçosa. Viçosa: UFV, 2000.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental.** 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, p. 36-39.

MATIAS, E. F. F. et al. Biological activities and chemical characterization of *Cordia verbenacea* DC. as tool to validate the ethnobiological usage. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2013, n. 1, p. 1-7, jun., 2013.

MEDEIROS, A. C. et al. Topic treatment of rat burns with hyaluronic acid. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 14, n. 4, 1999.

MELO, J. G. et al. Native medicinal plants commercialized in Brazil - priorities for conservation. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 156, n. 1-4, p. 567-580, 2008.

MELO, M. G. D. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, p. 1-6, 2012.

MEIRELES, I. B.; SILVA, R. C. L. Fundamentos biológicos para o atendimento ao portador de lesão de pele. In: SILVA, R. C. L.; FIGUEIREDO, N. M. A.; MEIRELES, I. B. **Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem**. São Caetano do Sul – SP: Ed. Yendis, 2ª ed., 2008.

MENDONÇA, R. S. C.; RODRIGUES, G. B. O. As principais alterações dermatológicas em pacientes obesos. ABCD, **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-73, mar., 2011.

MICHELIN, D. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

MITCHELL R. N. et al. Fundamentos de Robin & Cotran. In: **Inflamação aguda e crônica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 728. Cap 2

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dec., 1983.

MOTA, L. M. et al. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, n. 2, p. 164-172, 2010.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos**: Norma Aprovada. Documento M38-A. Estados Unidos, 2002.

NOGUEIRA, P. C. N. et al. Plumeran alkaloids and glycosides from the seeds of *aspidosperma pyriforme* Mart. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, p. 2108-2120, nov., 2014.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 260-265, abr., 2011.

OLIVEIRA, D. G. et al. Antimycobacterial activity of some Brazil in indigenous medicinal drinks. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 2, p.165-169, dez., 2007.

OLIVEIRA, S. H. S; SOARES, M. J. G. O; ROCHA, P. S. Uso de cobertura com colágeno e Aloe vera no tratamento de ferida isquêmica: estudo de caso. **Revista escola enfermagem – USP**, v. 44, n. 2, p. 346-351, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Genebra, 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf?ua=1> Acesso em: 26 de Junho de 2015.

_____. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva: World Health Organization; 2014. [Online] Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en>> Acesso em: 22 de Agosto de 2014

OSPINA, L. A. F. et al. Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia*. **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, Ciudad de la Habana, v. 18, n. 1, p. 34-46, mar., 2013.

OSPINA G. L. F. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Phenax rugosus* (POIR.) Wedd and *Tabebuia chrysantha* G. Nicholson. **Vitae**, Medellín, v. 18, n. 1, p. 49-55, jan./abr., 2011.

PANIGRAHI, G. K. et al. Investigation of the interaction of anthraquinones of *Cassia occidentalis* seeds with bovine serum albumin by molecular docking and spectroscopic analysis: Correlation to their *in vitro* cytotoxic potential. **Food Research International**, v, 77, n. 3, p. 368-377, nov., 2015.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Teor de flavonoides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 4, p. 586-591, 2012.

PRENTICE, W. E. **Modalidades Terapêuticas para Fisioterapeutas**. Artmed. 4ª ed., 2014.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n. 4, p. 146-152, nov., 2012.

PINHEIRO, D. C. S. N. et al. Parâmetros hematológicos de camundongos e ratos do biotério central da Universidade Federal do Ceará. **Boletim Informativo Cobeia**, São Paulo, v. 3, p. 6-9, 1997.

RAMOS, R. S. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Zeyheria tuberculosa*. **Revista Rene**, v. 13, n. 5, p. 1015-1024, 2012.

REFLORA - Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 25 jun. 2014.

REIS, F. R. et al. *Tabebuia aurea* decreases inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities induced by the venom of *Bothrops neuwiedi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, part. A, p. 352-357, 2014.

RIBEIRO, D. A. et al. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapadado Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1522-1533, 2014.

ROCHA, E. A. L. S. S; et al. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 3, p. 351-355, set., 2013.

ROSSATO, A. E. et al. **Fitoterapia racional**: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos. Florianópolis: DIOESC, 2012.

SANTOS, I. C. R. V. et al. Caracterização do atendimento de pacientes com feridas na Atenção Primária. **Revista Rene**, v. 15, n. 4, p. 613-620, 2014a.

SANTOS, J. A. A. et al. Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 3, supl. 1, p. 637-643, 2014b.

SANTOS, M. F. S. et al. Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 2-7, 2006.

SANTOS, R. F. E. P. **Avaliação do potencial biológico de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore**. 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

SANTOS, R. N. SILVA, M. G. V.; BRAZ FILHO, R. Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 1979-1981, 2008.

SANTOS, S. C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barnaby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 215-219, 2007.

SARAIVA, M. E. et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 141- 153, jun., 2015.

SARMENTO, P. A. et al. Avaliação do extrato da *Zeyheria tuberculosa* na perspectiva de um produto para cicatrização de feridas. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 22, n. 1, p. 165-72, 2014.

SATHIYA, M.; MUTHUCHELIAN, K. Antitumor potential of total alkaloid extract from *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. leaves on MOLT-4 cells *in vitro*. **Nature and Science**, v. 8, n. 9, p. 77-85, 2010.

SILVA, D. T. **Uso do Ipê-Roxo (*Tabebuia avellanedae*) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos**. 2006, 112f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) Universidade Federal da Bahia, Salvador – Bahia, 2006.

SILVA, F. M.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Mycoses**, v. 52, p. 511-517, nov., 2009.

SILVA JUNIOR, I. F. et al. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, jan./mar., 2009.

SILVA, M. B. et al. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: Epamig/CTZM/UFV, 2006.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

SILVA, R. C. L. et al. Sistematização da Assistência de Enfermagem. In: SILVA, R. C. L.; FIGUEIREDO, N. M. A.; MEIRELES, I. B. **Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem**. São Caetano do Sul – SP, Ed. Yendis, 2ª ed., 2008.

SILVA, W. W. et al. Ação do extrato alcoólico do capim santo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) sobre nematóides gastrintestinais de ovinos. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, Santa Cecília, v. 1, p. 46-49, 2005.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2. ed, Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, 2000.

SMELTZER, S. C. et al. **Brunner & Suddarth**, tratado de enfermagem médico-cirúrgica. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2009. 4v. : il.

SPINELLI, M. O. et al. Estudo da variação sazonal dos parâmetros bioquímicos de roedores e lagomorfos do Biotério da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 2, p. 219-225, 2014.

STOJADINOVIC, O. et al. Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 6, p. 4021-4034, 2007.

TALHOUK, R. S. et al. Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, n. 1, p. 1-10, mar., 2007.

TANKEO, S. B.; TANE, P.; KUETE, V. In vitro antibacterial and antibiotic potentiation activities of the methanol extracts from *Beilschmiedia acuta*, *Clausena anisata*, *Newbouldia laevis* and *Polyscias fulva* against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 412, 2015.

TEO, T. C.; NAYLOR, I. L. Modifications to the rate of wound contraction by allopurinol. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 48, n. 4, p. 198-202, 1995.

TRESVENZOL, L. M. F. et al. Avaliação da toxicidade aguda e da atividade cicatrizante dos extratos etanólicos das folhas e raízes da *Memora nodosa* (Silva Manso) Miers (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 423-430, 2013.

VASCONCELOS, C. M. et al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, Índia, v. 6, n. 7, p. 2673-2681, 2014.

VIOLANTE, I. M. P. et al. Estudo preliminar da atividade fotoprotetora in vitro de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 3, p. 175-179, 2008.

YOON, M. et al. Quantitative in vitro to in vivo extrapolation of cell-based toxicity assay results. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, n. 8, p. 633-652, jun., 2012.

ZUCCHI, M. R. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Ipameri - GO. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 2, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A**Grupo de animais separados pelo método probabilístico de escolha aleatória**

Dias de eutanásia	EETA	CP	CN
3º DPO	1, 5 e 9	3, 7 e 11	4, 8 e 12
7º DPO	13, 17 e 21	15, 19 e 23	16, 20 e 24
14º DPO	25, 29 e 33	27, 31 e 35	28, 32 e 36

Legenda: EETA – grupo experimental tratado com extrato etanólico de *Tabebuia aurea*; CP – Controle positivo (dexpantenol); CN – Controle negativo (creme base).

Nota: Os grupos foram separados por terapêutica e por dias de eutanásia.

APÊNDICE B



Protocolo de Avaliação Macroscópica / Clínica das Lesões



Número do animal: _____

GRUPO: _____

Critérios		Dias de Avaliação			
		D3 (21/05)	D7 (25/05)	D11 (29/05)	D14 (01/06)
1.Tamanho da Lesão					
2.Rubor perilesional	Sim (S)				
	Não (N)				
3.Tecido De Granulação	Sim (S)				
	Não (N)				
4.Extensão da crosta (Total, Parcial ou ausente)					
5.Inflamação	Sim (S)				
	Não (N)				
7.Exsudato	Sim (S)				
	Não (N)				
8.Fibrina	Sim (S)				
	Não (N)				

Observações

APÊNDICE C



Protocolo de Avaliação Microscópica / Histopatológica das Lesões



Número do animal: _____

Data: _____

Presença de crosta / necrose

() AUSENTE	() PRESENTE
-------------	--------------

Fase inflamatória

Proliferação Vascular	() AUSENTE	() DISCRETA	() MODERADA	() INTENSA
Células mononucleares (monócitos)	() AUSENTE	() DISCRETA	() MODERADA	() INTENSA
Células polimorfonucleares (neutrófilos)	() AUSENTE	() DISCRETA	() MODERADA	() INTENSA

Fase proliferativa

Tecido de Granulação	() AUSENTE		() PRESENTE	
Proliferação Fibroblástica	() AUSENTE	() DISCRETA	() MODERADA	() INTENSA
Neovascularização	() AUSENTE	() DISCRETA	() MODERADA	() INTENSA
Colagenização	() AUSENTE	() DISCRETA	() MODERADA	() INTENSA
Reepitelização	() DISCRETA	() MODERADA	() INTENSA	

Fase de remodelamento

Fibras de colágeno	() AUSENTE	() PRESENTE
--------------------	-------------	--------------

APÊNDICE D



Critérios para Avaliação Microscópica



FASE INFLAMATÓRIA

PROLIFERAÇÃO VASCULAR – será considerada ausente quando não se evidenciarem vasos no corte histológico, discreta quando forem visibilizados poucos vasos esparsamente situados de forma isolada no contexto, moderada quando aparecerem com maior frequência e dispersos no campo óptico e acentuada quando evidenciados com grande frequência dispostos em todo o contexto.

CÉLULAS MONONUCLEARES – serão classificadas em ausente quando estas células não forem visualizadas no campo óptico; discreta quando evidenciadas de forma isolada, possibilitando distinguir áreas livres de infiltrado; moderada quando aparecerem com maior frequência constituindo agregados densos, mas possibilitando visualizar áreas livres de infiltrado e acentuada quando as células foram evidenciadas com grande frequências constituindo agregados densos e justapostos sem áreas livres de infiltrados.

CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES – serão classificadas em ausentes quando ainda não forem visibilizadas no campo óptico; discretas quando forem visibilizadas esparsamente, de forma isolada, com muitas áreas livres de infiltrados; moderada quando já visibilizadas formando agregados, porém com áreas adjacentes livres de infiltrados; acentuada quando estas células aparecerem com grande frequência formando agregados densos sem áreas livres de infiltrados.

FASE PROLIFERATIVA

PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA – classificar-se-á em ausente quando não se evidenciar proliferação de fibroblastos, discreta quando houver esparsos fibroblastos proliferados em meio a tecido conjuntivo frouxo, moderada quando houver moderada quantidade de fibroblastos proliferados constituindo pequenos feixes celulares multi-direcionalmente e intensa quando houver grande quantidade de fibroblastos

proliferados constituindo agregados compactos de células arranjadas multidirecionalmente.

COLAGENIZAÇÃO – classificar-se-á como ausente quando não houver fibras colágenas depositadas; discreta quando a deposição de fibras colágenas for em pequena quantidade, caracterizadas por fibras depositadas em meio aos fibroblastos proliferados; moderada quando a deposição de colágeno formar feixes de fibras eosinofílicas, espessas, intercaladas com áreas de tecido conjuntivo frouxo e fibroblastos proliferados e intensa quando houver grande deposição de fibras colágenas constituindo feixes de fibras eosinofílicas espessas, compactamente arranjadas em meio a fibroblastos proliferados e sem áreas de tecido conjuntivo frouxo.

REEPITELIZAÇÃO

Classificar-se-á como ausente quando não houver epitélio visibilizado no campo óptico, discreto ou moderado quando aparecer de forma incompleta ou parcial e acentuada quando visibilizado de forma total ou completa sobre o tecido conjuntivo.

APÊNDICE E



Escores utilizados para análise dos resultados do exame histopatológico



Variáveis	Ausente	Presente	Discreto	Moderado	Intenso	Fator
Crosta/Necrose	+1	+2	-	-	-	-1
Inflamação aguda	-	-	+3	+4	+5	-4
Tecido de Granulação	+1	+2	-	-	-	+10
Proliferação fibroblástica	-	-	+3	+4	+5	+5
Neovascularização	-	-	+3	+4	+5	+5
Reepitelização	-	-	+3	+4	+5	+5
Fibras de colágeno	+1	+2	-	-	-	+10

Fonte: Adaptado de Medeiros et al. (1999) e Sarmiento et al. (2014).

ANEXOS

ANEXO A

Parecer Consubstanciado – CEUA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO Nº 011/2014

TÍTULO: Potencial biológico da *Tabebuia aurea*: perspectiva na obtenção de um fitoterápico cicatrizante

RESPONSÁVEL / PESQUISADOR: Maria Lysete de Assis Bastos

OBJETIVO: Investigar o potencial antimicrobiano, cicatrizante, anti-inflamatório, antioxidante e citotóxico de extratos brutos e frações das flores, folhas e talos da *Tabebuia aurea*.

JUSTIFICATIVA (APROVAÇÃO, PENDÊNCIA, NEGAÇÃO):

A pesquisa proposta é de relevada importância científica apresentando justificativas plausíveis para a utilização de animais. O projeto ressubmetido atendeu a todas as solicitações do parecer substanciado.

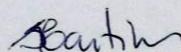
SITUAÇÃO: APROVADO

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 24-09-2014 a 24-09-2015

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Camundongo heterogênico	Swiss	12
Rato heterogênico	Wistar	18

Maceió, 26 de setembro de 2014.



Prof. Dr. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da CEUA/UFAL

Prof. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120858

ANEXO B

Declaração Herbário MAC – Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas



INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE ALAGOAS – IMA
HERBÁRIO MAC

Av. Major Cícero de Góes Monteiro, 2197, Mutange.

CEP 57017-320, Maceió – AL, Brasil

Site www.ima.al.gov.br email herbariomac.ima@gmail.com

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que a planta utilizada na pesquisa do Laboratório de Pesquisa de Tratamento de Feridas ESENFAR/UFAL é semelhante a uma mostra da mesma espécie coletada, por S.P.Gomes nº col. 47 em 15/12/2004 e depositada no Herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas.

Trata-se de:

Reg. MAC	Nº Col.	Família	Espécie	Det.
21433	47	Bignoniaceae	<i>Tabebuia aurea</i> (Silva Manso) Benth. & Hoo k.f. ex S. Moore	R.P. Lyra-Lemos

OBS: Recomenda-se a citação, no corpo do trabalho, que a identificação do material estudado foi efetuada pelos técnicos do Herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente.

Maceió, 26 de outubro de 2015.

Rosângela Pereira de Lyra Lemos
Curadora do Herbário MAC