



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

LÍVIA COELHO DE ASSIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO ETANÓLICO E
DO TRITERPENO 3B, 6 B, 16 B TRIHYDROXYLUP-20 (29) -ENO PROVENIENTES
DE FOLHAS DE *Combretum leprosum* MART. NO TRATAMENTO DE LESÕES
CUTÂNEAS INDUZIDAS EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2015

LIVIA COELHO DE ASSIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO ETANÓLICO E
DO TRITERPENO 3B, 6 B, 16 B TRIHYDROXYLUP-20 (29) -ENO PROVENIENTES
DE FOLHAS DE *Combretum leprosum* MART. NO TRATAMENTO DE LESÕES
CUTÂNEAS INDUZIDAS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.
Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

A866a Assis, Livia Coelho de.
Avaliação da atividade cicatrizante do extrato etanólico e do triterpeno 3β , 6β , 16β trihydroxylup-20 (29) -eno provenientes de folhas de *combretum leprosum* mart. no tratamento de lesões cutâneas induzidas em camundongos./ Livia Coelho de Assis. – 2015.
63 f.: il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Patologia.

Orientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

1. Cicatrização. 2. Produtos Biológicos. 3. Triterpenos. 4. Combretum. I. Título.

CDD 617.107

LIVIA COELHO DE ASSIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO ETANÓLICO E
DO TRITERPENO 3B, 6 B, 16 B TRIHYDROXYLUP-20 (29) -ENO PROVENIENTES
DE FOLHAS DE *Combretum leprosum* MART. NO TRATAMENTO DE LESÕES
CUTÂNEAS INDUZIDAS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Maria Jania Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos
Universidade Estadual Vale do Acaraú do Ceará (UEVA)

À Deus, pelas oportunidades e dádiva da vida,
Ao meu marido, Robson Carlos pelo amor, apoio e paciência,
Aos meus pais pela orientação e confiança, dedico.

AGRADECIMENTO

À Deus, por ser minha força maior.

Ao meu marido por todo amor, carinho, compreensão e paciência dedicados a mim. Obrigada por reconhecer o momento certo de me pausar e impulsionar a concluir essa caminhada. Sem você talvez eu não teria conseguido chegar até aqui. Obrigada, também, por entender cada momento de ausência, aflição e sofrimento interno. Te amo

Aos meu pais, Eduardo e Ly pela confiança, amor dedicado e exemplo de vida. Obrigada, ainda, por priorizarem meus estudos em todos os momentos, pois este é o mais valioso presente que vocês me deram.

Aos meus familiares, em especial minha avó Fatima e minha irmã Lícia, por acreditarem no meu potencial e me fortalecerem nos momentos de tristeza.

À minha sogra Maria Lucilene e ao meu sogro Gleuber Rodrigues, por orarem por mim e darem o apoio emocional necessário para que eu concluísse esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, pela excelente orientação, paciência e amizade.

Ao Me. Luiz Gonzaga, por ter me ensinado a trabalhar com experimentação animal, paciência, conselhos, amizade e por todo tempo dedicado na conclusão deste trabalho.

À Profa. Diane Isabeli pela amizade e orientações no trabalho.

À Profa. Dra. Margarida Pompeu e ao técnico Junior do Departamento de Patologia e Medicina Legal e ao Técnico Alceu do Departamento de Morfologia por contribuírem para esse estudo realizando o processamento histológico.

A todos do Laboratório Integrado de Biomoléculas, por toda ajuda nos experimentos, trocas de conhecimento e pela amizade. Em especial aos amigos Kalline Barreto, Bruno Rocha, Mayara Alencar, Juliana, Camila Nottingham e Francisca Gleiciane.

Ao programa de mestrado em Patologia da UFC, em especial, aos professores e as secretárias Valéria e Paula por todo o suporte.

À minha amiga Kelvia Miranda, pela força desde a prova de seleção até a conclusão deste curso. Obrigada por sempre me incentivar e entusiasmar nesta caminhada.

À amiga Brunheld Maia, por me auxiliar na escrita deste trabalho e por todas as horas de reflexões, críticas e sugestões.

Aos colegas da turma de mestrado, em especial Naya Rodrigues pelos momentos de trocas de conhecimento e diversão.

Ao meu amigo Pedro Henrique Quintela, por toda ajuda para conclusão deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis."
José de Alencar

RESUMO

A cicatrização cutânea é um processo complexo e dinâmico que envolve uma ação integrada de vários tipos celulares, matriz extracelular e mediadores solúveis como citocinas, que tem por finalidade a recuperação da integridade da estrutura anatômica danificada. Produtos naturais são a base para diversos insumos biotecnológicos, pois são compostos biologicamente ativos com grande potencial terapêutico, e que podem formar bases moleculares para muitas drogas em uso clínico. *Combretum leprosum* Mart. é uma espécie nativa da Caatinga, bioma importante na região do semiárido brasileiro, sendo esta espécie popularmente utilizada no Brasil para o tratamento de diversas doenças, tais como doenças de pele. O presente estudo investigou o potencial pró-cicatrizante do extrato etanólico (EECL) e do triterpeno bioativo $3\beta, 6\beta, 16\beta$ -trihydroxylup-20 (29)-eno (CLF-1) isolado das folhas de *C. leprosum*. Para isto, o ensaio de migração de células foi realizado com fibroblastos, que foram pós tratados com CLF-1 (1,75 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e analisados em 0, 6 e 24 horas. Feridas cutâneas (1 cm^2) foram realizadas na zona dorsal de camundongos (n=30) e em seguida foram tratadas com uma aplicação tópica diária (100 μl) de acordo com o grupo: salina, EECL (100 $\mu\text{g/mL}$) e CLF-1 (100 $\mu\text{g/mL}$) durante 12 dias. Os resultados demonstraram que CLF-1 não apresentou toxicidade aos fibroblastos e, ainda, em 6 horas estimulou a proliferação e migração celular, de modo que observou-se um aumento significativo na porcentagem de fechamento em ambas concentrações (1,75 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao controle ($p < 0,05$). Em 24 horas, verificou-se também aumento significativo na taxa fechamento quando comparado CLF-1 2,5 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao controle ($p < 0,05$). Na avaliação *in vivo*, observou-se no 2º dia pós cirúrgico (P.C.), que as lesões tratadas com EECL e CLF-1 mostraram presença moderada de vasos no tecido de granulação, progredindo na derme, bem como apresentaram um leve infiltrado inflamatório. Observou-se, ainda, que no 7º dia P.C. os animais tratados com CLF-1 demonstraram moderada angiogênese, enquanto que os animais tratados com salina apresentaram proliferação e migração celular em direção ao leito da ferida. Ademais, no 12º dia P.C., os animais tratados com EECL e CLF-1 apresentaram o fechamento completo da lesão, enquanto os que receberam salina, apresentaram, ainda, feridas abertas. Desta forma, foi possível concluir que o EECL e o CLF-1 apresentaram efeitos pró-cicatrizante, bem como uma possível ação anti-inflamatória e investigações adicionais são necessárias para elucidar o mecanismo de ação no processo de cicatrização cutânea.

Palavras-chave: Cicatrização, produtos naturais, triterpenos, *Combretum leprosum*.

ABSTRACT

Wound healing is a complex and dynamic process involving an integrated action of several cell types, extracellular matrix and soluble mediators such as cytokines, which serve to recover the integrity of damaged anatomical structure. Natural products are the basis for many biotechnological inputs, as they are biologically active compounds with great potential for therapeutics and can provide molecular basis for many drugs in the clinics. *Combretum leprosum* Mart. is a native species of Caatinga, important biome in the Brazilian semiarid region, being popularly used in Brazil for the treatment of many diseases such as skin diseases. This study aimed to investigate the pro-healing potential of the ethanol extract (EECL) and the bioactive triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20 (29) ene (CLF-1) isolated from leaves of *C. leprosum*. Cell migration assay was performed using fibroblasts, which were treated with CLF-1 (1.75 μ g / ml and 2.5 μ g / ml) and analyzed after 0, 6 and 24 hours. Skin wounds (1 cm²) were induced in the dorsal region of mice (n = 30) and were treated with daily topical application (100 μ l) according to the group: saline, EECL (100 μ g / ml) and CLF-1 (100 μ g / ml) for 12 days. The results showed that CLF-1 did not show toxicity to fibroblasts and further increased cell proliferation and migration so that a significant increase on injury closing percentage was observed using both concentrations (1.75 mg / ml vs 2.5 mg / mL,) compared to control (p <0.05). Within 24 hours, there was also a significant increase in the rate of migration comparing CLF-1 at 2.5 μ g / ml and control group (p<0.05). For the *in vivo* analysis, on the 2nd post surgical day (PS), the lesions treated with EECL and CLF-1 showed moderate presence of vessels in granulation tissue progressing to the dermis, as well as a slight inflammatory infiltrate. It was also observed that, on the 7th PS day, the animals treated with CLF-1 showed moderate angiogenesis, whereas animals treated with saline showed cell proliferation and migration into the wound. Furthermore, on the 12th day PS, the animals treated with EECL and CLF-1 showed complete closing of the injury, while those receiving saline exhibited open wounds. Thus, it was concluded that EECL and CLF-1 showed pro-healing effects, as well as a possible anti-inflammatory action and additional research is needed to elucidate its mechanisms in the wound healing process.

Key-words: Wound healing, natural products, triterpenes, *Combretum leprosum*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática das fases do processo cicatricial.....	20
Figura 2 - Partes aéreas da <i>Combretum leprosum</i> MART.....	31
Figura 3 Desenho esquemático estrutural de CLF-1.....	32
Figura 4 – Representação do procedimento cirúrgico em camundongos.....	38
Figura 5 – Fotomicrografias do efeito do triterpeno (CLF-1) de <i>Combretum leprosum</i> no ensaio de migração de fibroblastos <i>in vitro</i>	41
Figura 6 – Evolução de feridas após tratamento com EECL e CLF-1 de <i>Combretum leprosum</i> em lesões induzidas em camundongos.....	44
Figura 7 - Fotomicrografias da pele de camundongos tratados com salina, EECL e CLF-1 no 2º, 7º e 12º dias pós cirúrgico.....	47
Gráfico 1 – Efeito do tratamento com CFL-1 em diferentes concentrações no ensaio de migração de células <i>in vitro</i>	42
Gráfico 2 – Efeito do tratamento com EECL e CLF-1 de <i>Combretum leprosum</i> Mart. na evolução das lesões induzidas em camundongos.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos fatores de crescimento atuantes nos processos hemostático e inflamatório.....	22
Quadro 1 – Camadas da epiderme.....	16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCAC	<i>Canadian Council Animal Care</i>
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CLF-1	Triterpeno 3 β , 6 β , 16 β trihydroxylup-20 (29) –eno do <i>Combretum leprosum</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EECL	Extrato etanólico do <i>Combretum leprosum</i>
FEG	Fator de Crescimento Epidérmico
HE	Hematoxilina- Eosina
IFG-1	Fator de Crescimento semelhante à Insulina I
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
MAF	Fator de Ativação de Macrófago
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIF	Fator de Inibição da Migração
MMPs	Metaloproteinases
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
P.C.	Pós- cirurgico
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PMN	Polimorfonuclear
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador- β
TIMPs	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases de Matriz
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral -alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultra-violeta
VEGF	Fator Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

mL	Mililitro
kg	Quilograma
%	Porcentagem
cm	Centímetro
mM	Mili molar
©	Copyright
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1	Características gerais da pele	15
1.1.1	<i>Epiderme</i>	15
1.1.2	<i>Derme</i>	16
1.2	Lesões	17
1.3	Cicatrização	18
1.3.1	<i>Aspectos gerais</i>	18
1.3.2	<i>Hemostasia e processo inflamatório</i>	20
1.3.3	<i>Proliferação e remodelação</i>	24
1.4	Plantas medicinais	27
1.5	Características da família <i>Combretaceae</i> e gênero <i>Combretum</i>	28
1.6	Características do <i>Combretum leprosum</i> Mart.	29
1.7	Triterpenos	31
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivo Específico	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	Aspectos éticos	35
4.2	Material vegetal	35
4.3	Extração do EECL e CLF-1	35
4.4	Avaliação do efeito do triterpeno bioativo 3β, 6 β, 16 β trihydroxylup-20 (29) -eno (CLF-1) na cicatrização <i>in vitro</i>	36
4.5	Avaliação do efeito do extrato etanólico EECL e do triterpeno bioativo 3β, 6 β, 16 βtrihydroxylup-20 (29) -eno (CLF-1) na cicatrização <i>in vivo</i>	36
4.5.1	<i>Grupos experimentais</i>	37
4.5.2	<i>Procedimento cirúrgico</i>	37
4.5.3	<i>Tratamento e avaliação macroscópica da atividade cicatrizante</i>	38

4.5.4	<i>Avaliação histopatológica</i>	39
4.6	<i>Avaliação estatística</i>	39
5	RESULTADOS	41
5.1	<i>Avaliação microscópica do experimento in vitro</i>	41
5.2	<i>Avaliação macroscópica do experimento in vivo</i>	42
5.3	<i>Avaliação histopatológica</i>	45
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Características gerais da pele

A pele compreende o maior órgão do corpo humano (BICKERS; ATHAR, 2006; CLARK; GHOSH; TONNESEN, 2007) e constitui uma barreira eficaz entre este e o ambiente exterior. Ela tem a função de proteção contra traumas mecânicos, agentes infecciosos, radiação, desidratação, e grandes variações de temperatura (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN *et al.*, 2008; MCKELVEY; JACKON; XUE, 2014). Além de sintetizar vitamina D a partir da exposição aos raios solares, a pele atua na termorregulação e age como órgão dos sentidos. (BRUNNER; SUDDARTH, 2005).

A pele é formada por duas camadas que estão firmemente unidas entre si, denominadas epiderme e derme (DRÉNO, 2008; THANGAPAZHAM; THOMAS; MEYERLE, 2014).

1.1.1 Epiderme

É a camada mais superficial e sua principal função consiste em ser uma barreira, devido estar em contato direto com fatores do ambiente externo tais como radiação ultravioleta (UV), agentes patogênicos e tóxicos, além de prevenir a perda de água e solutos (PARK, 2015). A epiderme é constituída basicamente por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, sendo dividida em quatro camadas distintas (Quadro 1) (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010), onde as células mais abundantes são os queratinócitos, podendo ser também encontrados outros três diferentes tipos celulares (melanócitos, células de Langherans e células de Merkel) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os queratinócitos sintetizam uma proteína denominada queratina, que contém cadeias polipeptídicas em espiral ligadas por pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína adjacentes, podendo ainda produzir citocinas em resposta a abrasões na epiderme (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010). Os melanócitos são responsáveis pela produção e secreção de melanina, fornecendo à pele coloração e proteção contra os raios UV. As células de Langherans desempenham funções no sistema imunológico, já as células de Merkel são mecanorreceptores que atuam na sensibilidade tátil. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Quadro 1- Camadas da epiderme.

Camada de células basais	Composta por apenas uma camada de células, sendo os queratinócitos o tipo principal e os melanócitos compreendendo em torno de 05 a 10% da população celular.
Camada de células espinhosas:	Formada por células poliédricas, que estão unidas entre si por desmossomos, que vistos sob o microscópio conferem este aspecto de "espinhos". Nesta camada podem ser identificadas também as células de Langherans.
Camada de células granulosas	Os queratinócitos desta camada possuem grânulos intracelulares de querato-hialina e grânulos lamelares. Estas células liberam seus conteúdos lipídicos no ambiente intercelular e atuam como barreira e na coesão intercelular no estrato córneo.
Camada córnea	Compreende a camada mais externa da epiderme e é composta por corneócitos, que são células que migraram do estrato granuloso e perderam seus núcleos e organelas. Estas têm o aspecto achatado e são alinhadas com os filamentos de queratina.

Fonte: adaptado de (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

1.1.2 Derme

A derme está localizada abaixo da epiderme e é formada por tecido conjuntivo, sendo constituída por duas camadas: papilar e reticular. A camada mais superficial, denominada papilar, é delgada e composta por tecido conjuntivo frouxo que originam as papilas dérmicas, fundamentais para aumentar a área de contato entre a derme e epiderme. A derme reticular (mais profunda) é espessa e formada por tecido conjuntivo denso. Ambas camadas contêm fibras de tecido elástico, responsáveis pela elasticidade da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Também são encontradas na derme nervos, vasos sanguíneos, folículos pilosos, e fibroblastos, que são importantes para manutenção da base estrutural da pele, mas também para fornecimento de funções biológicas importantes (THANGAPAZHAM; THOMAS; MEYERLE, 2014). Estruturalmente, a derme possui um componente celular, no qual predominam os fibroblastos e um acelular formado

principalmente pela matriz extracelular (MEC) (GURTNER *et al.* 2008; DELAVARY *et al.*, 2011).

Os fibroblastos são células fusiformes com núcleo elíptico e, em geral, constituem o maior número de células do tecido conjuntivo (ISAAC *et al.*, 2010). Estas células são responsáveis pela produção de proteínas estruturais tais como colágeno e enzimas denominadas de metaloproteinases de matriz (MMPs), que facilitam a movimentação dos fibroblastos dentro da MEC (SHAH *et al.*, 2012).

A MEC possui diferentes funções específicas como defesa contra patógenos invasores, manutenção da termorregulação e proteção relacionada com a perda de água. Funcionalmente, a matriz é dividida em duas frações, uma fibrilar, que consiste em feixes de colágeno, fibras elásticas e microfibrilas e uma porção não fibrilar, caracterizada pela presença de glicosaminoglicanos e proteoglicanos. (DELAVARY *et al.*, 2011). Os componentes da MEC desempenham um papel estrutural biomecânico no processo de cicatrização, visto que estes formam um suporte (uma matriz temporária, tecido de granulação e cicatriz) que proporciona integridade à matriz durante cada etapa do processo de cicatrização (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014). Além disso, estes componentes da matriz podem ainda atuar como um reservatório modulador de citocinas e fatores de crescimento, regulando as etapas do processo cicatricial (SCHULTZ, 2011).

1.2 Lesões

Lesões são definidas como um dano ou perturbação na estrutura anatômica normal e funcional do tecido, compreendendo desde a quebra superficial da integridade do epitélio, podendo estender-se ao tecido subcutâneo, com danos em diversas estruturas como tendões, músculos, vasos, nervos, órgãos parenquimatosos e ossos (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; ELNAR; AILEY; MRKOLJ, 2009).

Em relação à extensão, as feridas são classificadas como, superficiais quando restritas à epiderme, parciais quando envolvem epiderme e parte da derme, e de perda total quando há comprometimento da epiderme, derme completa e da tela subcutânea podendo atingir músculos, tendões e ossos (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Quanto à evolução, as lesões podem ser classificadas como agudas e crônicas. Em geral, as agudas são aquelas causadas por incisões cirúrgicas ou traumas em que o reparo ocorre em tempo adequado e sem complicações (MANDELBAUM; DI SANTIS;

MANDELBAUM, 2003). Já as crônicas são resultado de um processo de reparação inadequado que não é capaz de restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido em um período de tempo adequado e podem ser associadas a inúmeras alterações patológicas, tais como o aumento da atividade de protease e infecções (MENKE *et al.*, 2007; DREIFKE; JAYASURIYA; JAYASURIYA, 2015).

O processo de reparo tecidual depende de fatores locais como a vascularização das bordas da ferida e o grau de contaminação, além de fatores gerais que estão relacionados às condições clínicas do paciente, tais como idade, nutrição, estado imunológico, infecções, diabetes e uso de medicamentos (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008; GUO; DI PIETRO, 2010). Dessa forma, a quebra de continuidade e integridade da pele deve ser restaurada rapidamente com a finalidade de evitar possíveis complicações, tais como infecções e discrepâncias no equilíbrio dos fluídos corporais (KAHN; BEERS; LENTZ, 2011; GREAVES *et al.*, 2013).

1.3 Cicatrização

1.3.1 Aspectos gerais

A pele é um dos órgãos humanos mais suscetíveis a serem lesionados, necessitando mecanismos de reparo para o reestabelecimento da sua função (DELAVARY *et al.*, 2011). Nesse sentido, numerosos fatores podem causar lesões graves na pele, onde, dependendo do tipo de trauma, os epitélios têm a capacidade de promover um processo de auto regeneração (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004; CATALANO *et al.*, 2013).

Os organismos possuem a capacidade de reparação e regeneração tecidual, que ocorre de maneira diferente ao longo de diversas espécies visando o restabelecimento das funções dos órgãos e demonstrando, assim, além de uma vantagem seletiva, um fator de sobrevivência na natureza. (REINKE; SORG, 2012). Em organismos superiores, o reparo de tecidos pode ocorrer pela regeneração, que recompõe a atividade funcional do tecido ou através da cicatrização, mecanismo que permite o reestabelecimento da homeostasia, mas com perda da atividade funcional do tecido devido a formação de cicatriz fibrótica (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

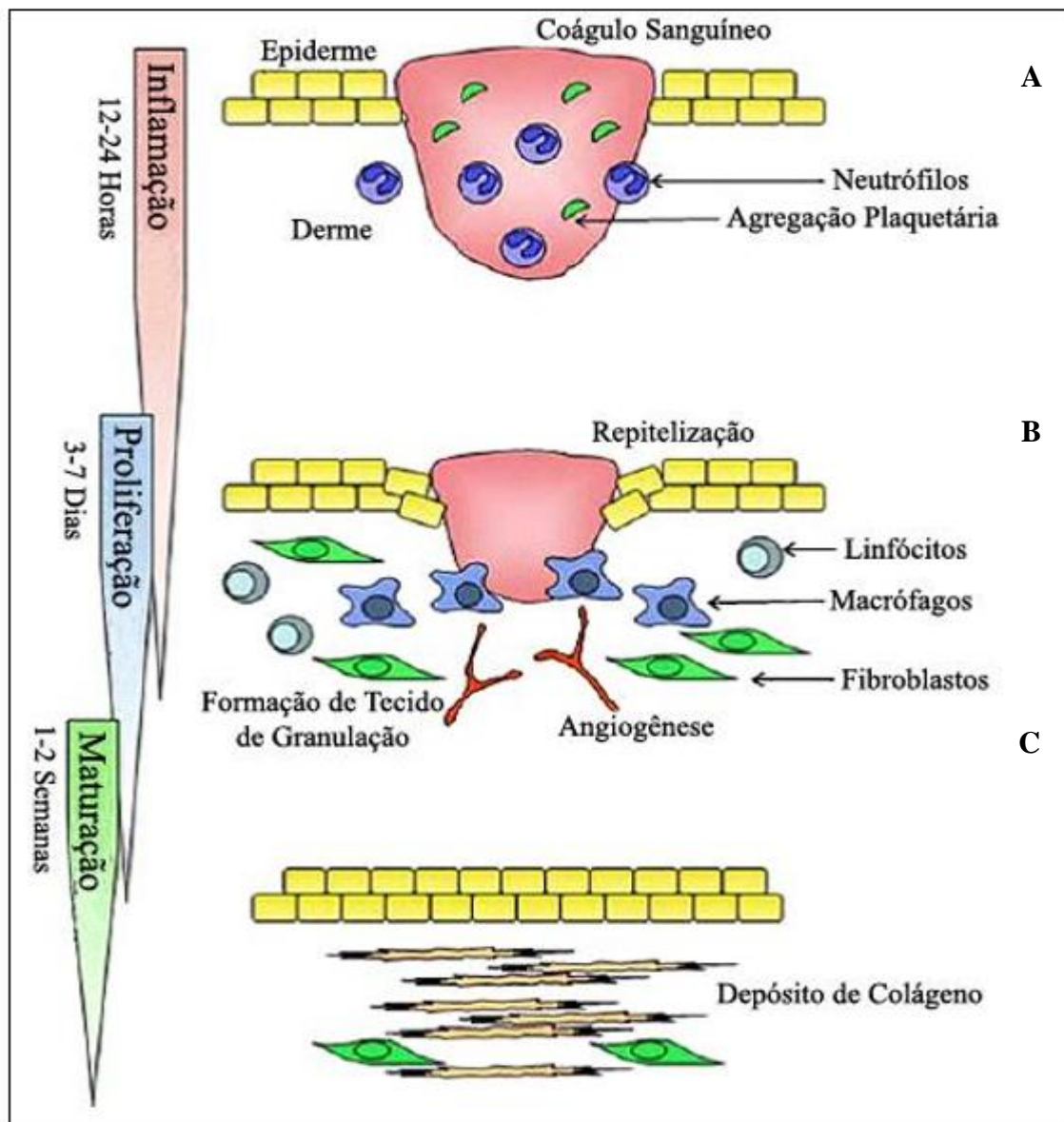
A regeneração consiste no processo em que novas células substituem células danificadas ou mortas, de modo que o tecido seja restaurado e possa desta forma retornar ao seu estado original. De modo que as condições necessárias para que a regeneração ocorra depende da capacidade de proliferação das células lesadas e da preservação da estrutura do estroma subjacente. No entanto, apesar de fundamental a ocorrência deste evento é rara em seres humanos, onde a principal forma de reparo é a cicatrização (KRAFTS, 2010).

A cicatrização de feridas envolve uma serie complexa de eventos bioquímicos e fisiológicos nas quais células especializadas interagem com a MEC, fornecendo condições necessárias ao crescimento e a formação do novo tecido de revestimento (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010; DARGAVILLE *et al.*, 2013). Dessa forma, o reestabelecimento da integridade do tecido é resultado da interação de plaquetas, neutrófilos, monócitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos, bem como os componentes da MEC, tais como fibronectina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, trombospondina, tenascina, vitronectina e colágeno (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004; OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014). Este processo é regulado pela produção de citocinas e fatores de crescimento secretados próximo a lesão (DREIFKE; JAYASURIYA; JAYASURIYA, 2015). As citocinas participam da resposta pró- e anti-inflamatória, enquanto que os fatores de crescimento estão associados ao controle da proliferação, diferenciação e o metabolismo das células envolvidas no processo cicatricial (DULMOVITS; HERMAN, 2012).

A cicatrização é caracterizada por fases distintas e sobrepostas denominadas: hemostasia e inflamação, proliferação e remodelação (maturação) (Figura 1). Além disso, os eventos da cicatrização iniciam-se imediatamente após a injúria (WILGUS, 2008; KONDO; ISHIDA, 2010; POWLEY, 2013; DELAVARY *et al.*, 2011) e a cinética de cada fase depende da gravidade da lesão, idade e estado de saúde do paciente (NOVAK; KOH, 2013).

De fato, a pré-disposição genética e as condições imunopatológicas, tais como em indivíduos imunodeprimidos ou mesmo diabéticos podem ser requisitos necessários a problemas no processo cicatricial como cicatriz hipertrófica, queloides, inflamação crônica devido a presença de micro-organismos, úlceras e necrose tecidual (VAN DER VEER *et al.*, 2009). Dessa forma, entender a composição e estrutura da pele, bem como as fases da cicatrização, podem auxiliar no entendimento dessas patologias e ainda na descoberta de novas drogas que acelerem o processo cicatricial (DELAVARY *et al.*, 2011).

Figura 1 - Representação esquemática das fases do processo cicatricial



FONTE: adaptado de KONDO; ISHIDA, 2010. Hemostasia e Inflamação (A); Proliferação (B); Remodelação (C).

1.3.2 Hemostasia e processo inflamatório.

Após a injúria tecidual, o tamponamento dos vasos é o evento inicial para o processo de reparo e a vasoconstrição é a primeira resposta gerada devido à influência nervosa (descargas adrenérgicas) e ação de mediadores vasoconstritores tais como bradicinina, fibrinopeptídeos, serotonina e tromboxano A₂ (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; TELLER; WHITE, 2009).

Em seguida, as diferentes vias da cascata de coagulação são iniciadas tanto por fatores da pele lesada (via extrínseca), quanto pela exposição do colágeno (via intrínseca) (REINKE; SORG, 2012). Estabelecida a lesão, o colágeno e o fator tissular que estão presentes no endotélio são expostos ao fluxo sanguíneo estimulando a ativação e agregação plaquetária. O colágeno presente na derme papilar liga-se a glicoproteína Ib/IX/V presente na superfície das plaquetas, sendo esta aderência mediada pelo fator de von Willebrand, que funciona como uma “ponte” entre a superfície da plaqueta e o colágeno subendotelial. O fator tissular forma um complexo com o fator VIIa, que corresponde a forma enzimaticamente ativa do fator VII. Este complexo formado ativa o fator IX, ativando a cascata proteolítica que culmina na geração de trombina que converte fibrinogênio em fibrina (FURIE; FURIE, 2008).

A ativação da cascata de coagulação resulta na formação de um coágulo de fibrina, fibronectina, vitronectina, trombospondina e plaquetas (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004). Promovendo a hemostasia, prevenindo a entrada de micro-organismos, fornecendo a arquitetura básica da matriz para iniciar a invasão e recrutamento de células inflamatórias e ainda disponibilizando uma matriz provisória para o início da reestruturação da área lesionada (THEORET, 2004; PARK; BARBUL, 2004).

As plaquetas secretam vários fatores de crescimento e quimiocinas no ambiente local da ferida (MARTINEZ-ZAPATA *et al.*, 2012). Dentre eles, o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β) (Tabela 1), e várias quimiocinas que promovem o recrutamento de polimorfonucleares (PMNs) para o local da lesão (KONDO; ISHIDA, 2010; SHAH *et al.*, 2012).

A fase inflamatória tem início imediatamente após a injúria, podendo estender-se durante duas semanas ou mais e é acompanhada por sintomas característicos, tais como hiperemia (vermelhidão), edema (inchaço) e dor em torno do local ferido (BUSTI *et al* 2005).

Uma vez que os neutrófilos são as células mais abundantes no sangue, um número significativo deles é passivamente coletado pelo trombo provisório durante o rompimento dos vasos, e após o extravasamento passivo, os neutrófilos migram para a superfície da ferida para formar uma barreira contra a invasão de micro-organismos e promover o recrutamento ativo de mais neutrófilos a partir dos vasos adjacentes não lesados (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Tabela 1 - Características dos fatores de crescimento atuantes nos processos hemostático e inflamatório.

Fator de Crescimento	Local	Tecido alvo/ efeito biológico
Fator de crescimento derivado de plaquetas	Células endoteliais, plaquetas, macrófagos, fibroblastos.	Mitogênico para o músculo liso vascular, fibroblastos.
Fator de crescimento epidérmico	Quase todos os fluidos corporais, plaquetas.	Mitogênico para a maioria dos tecidos epiteliais, fibroblastos, células endoteliais.
Fator de crescimento transformante-β	Os macrófagos, linfócitos, fibroblastos, células ósseas, queratinócitos, plaquetas.	Inibe a replicação da maioria das células in vitro, incluindo queratinócitos, células endoteliais, linfócitos e macrófagos; pode inibir ou estimular fibroblastos.

Adaptado de DINH; BRAUNAGEL; ROSENBLUM, 2015.

Os neutrófilos são estimulados por prostaglandinas, produtos do complemento, interleucina-1 (IL-1), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), TGF- β , bem como pelos produtos de degradação dos agentes patogênicos. Além disso, pode-se destacar a secreção de interleucina-8 (IL-8), por macrófagos e células epiteliais. A IL-8 ou “fator quimiotático para neutrófilos” é a citocina responsável por estimular a quimiotaxia e haptotaxia de neutrófilos diretamente para o local da lesão. Desse modo, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a chegarem ao local da lesão e podem permanecer durante 24 a 48 horas (FURIE; FURIE, 2008; TELLER; WHITE, 2009). Dessa forma, no início do processo cicatricial os neutrófilos constituem as células predominantes na ferida, porém sua presença é limitada apenas ao início da resposta inflamatória. Devido sua capacidade de fagocitose e secreção de proteases, os neutrófilos desempenham um papel crucial na eliminação de diversas bactérias e na degradação do tecido necrosado (REINKE; SORG, 2012). Eles produzem agentes quimiotáticos, tais como o TNF- α , que é uma citocina importante que amplifica a quimiotaxia de neutrófilos e de macrófagos, além de estimular queratinócitos, fibroblastos e a expressão de fatores de crescimento necessários na angiogênese e síntese de colágeno (TELLER; WHITE, 2009).

Os neutrófilos também secretam citocinas como IL-1 e IL-6 que são fundamentais, pois amplificam a resposta inflamatória e estimulam a síntese e secreção de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) por fibroblastos e células epiteliais neoformadas, para uma resposta de reparação adequada do tecido lesionado. Além disso, neutrófilos liberam peptídeos antimicrobianos (catiônicos e eicosanóides) e proteinases que são importantes para o debridamento da ferida (REINKE; SORG, 2012; EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007).

Os neutrófilos produzem radicais livres de oxigênio, tais como superóxido e peróxido de hidrogênio e mediadores químicos que podem causar danos adicionais ao tecido normal, influenciando negativamente a cicatrização, devido à produção de substâncias tais como as elastases e catepsina G que podem degradar componentes da MEC (KOH; DIPIETRO, 2011). Uma vez que a MEC exerce função de apoio e influência na migração e proliferação dos queratinócitos, alterações estruturais e funcionais podem ter consequências na cicatrização do tecido (DOVI; SZPADERSKA; DIPIETRO, 2004).

As próximas células que surgem no local da lesão são os macrófagos que auxiliam os neutrófilos no combate aos microrganismos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Os macrófagos são células teciduais mielóides maduras, derivadas da diferenciação de monócitos residentes na circulação e constituem uma população celular homogênea que pode exibir uma gama de fenótipos e propriedades fisiológicas diferentes a depender das citocinas que estimulam a maturação (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010).

Na fase inicial da cicatrização, os macrófagos secretam citocinas que promovem a resposta inflamatória através do recrutamento e ativação de células inflamatórias adicionais e são responsáveis por fagocitar neutrófilos que estão em apoptose contribuindo para resolução da inflamação (GUO; DIPIETRO, 2010).

No local da lesão, os macrófagos realizam intenso processo de debridamento e exercem atividade antimicrobiana através da fagocitose e da liberação de radicais livres de oxigênio, óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio de maneira semelhante aos neutrófilos (HALPER *et al.*, 2003). Os macrófagos podem, ainda, estimular a fase proliferativa da cicatrização através da liberação de fatores de crescimento e citocinas tais como PDGF, TGF- β , o TNF- α , IL-1 e IL-6 (SHAH *et al* 2012; REINKE; SORG, 2012).

Os macrófagos atuam, também, como elo entre o sistema imune inato e o adaptativo, pois após fagocitar os microrganismos, estes são capazes de processar seus peptídeos e apresentar via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) às células T

auxiliares. (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Além disto, ao realizar a fagocitose, os macrófagos podem sofrer uma transição fenotípica reparadora que estimula queratinócitos, fibroblastos e angiogênese (GUO; DIPIETRO, 2010). A mudança de fenótipo tem sido demonstrada como um requisito para a transição da fase inflamatória para de proliferação na cicatrização de feridas, sendo característica desse fenótipo a expressão de mediadores anti-inflamatórios, tais como IL-10, TGF- β , VEGF, Fator de Crescimento “Insulina-Like” tipo 1 (IFG-1) (KOH; DIPIETRO, 2011).

Outras células envolvidas na cicatrização de feridas são os mastócitos que possuem a função de secretar mediadores químicos em torno do local da ferida, tais como enzimas, histamina e outras aminas vasoativas, que tem a função de aumentar a permeabilidade ao redor dos vasos e, assim, facilitar a rápida migração das células na/para área da lesão (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

As últimas células a infiltrar no local da lesão são os linfócitos, que são importantes nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização, imprescindíveis na imunidade celular e na produção de anticorpos, e ainda, atuam como mediadores no ambiente da ferida através da produção de linfocinas (TELLER; WHITE, 2009; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003), tais como o fator de inibição da migração (MIF), interleucina-2 (IL-2), fator de ativação de macrófago (MAF) e fatores quimiotáticos, e ainda, aumentam o estágio inicial da cicatrização através da estimulação de macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

1.3.3 Proliferação e remodelação

A fase proliferativa tem início em três a quatro dias após a lesão, podendo permanecer durante duas a quatro semanas. Os fatores de crescimento e citocinas liberados na fase inflamatória são os responsáveis por desencadear esta etapa (GREAVES *et al*, 2013).

A epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e a deposição de colágeno caracterizam a fase proliferativa (SINNO; PRAKASH, 2013). Nesta fase, ocorrem intensa migração e proliferação de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos que são responsáveis por sintetizar e secretar mediadores que estimulam e modulam a síntese de componentes da MEC, a angiogênese e a remodelação tecidual (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014).

A epitelização da ferida tem início horas após a abrasão, e nas lesões em que a membrana basal se mantém preservada, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas da epiderme são restauradas em 2-3 dias, no entanto quando há desruptura da membrana basal, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora (SINNO; PRAKASH, 2013). A migração destas células é facilitada pela produção de proteases específicas, tais como a colagenase pelas células epidérmicas para degradar a matriz extracelular (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010).

Uma boa evolução do processo cicatricial é caracterizada pela vascularização do tecido recém-formado, ocorrendo na fase proliferativa a formação do tecido de granulação, onde o número de vasos sanguíneos na derme aumenta e desta forma há um aumento significativo na densidade de vasos sanguíneos em relação à pele saudável (BROWN *et al.*, 2002; JOHNSON; WILGUS; 2014).

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos que ocorre a partir dos vasos preexistentes, onde após a abrasão, as células endoteliais microvasculares que revestem a superfície interna de vasos sanguíneos são ativadas pela hipóxia e por fatores pró-angiogênicos tais como o VEGF e o Fator de Crescimento de Fibroblastos tipo 2 (FGF-2) (DEMIDOVA-RICE; DURHAM; HERMAN, 2012). Os novos vasos sanguíneos formados invadem a matriz provisória e formam uma densa rede de capilares com o objetivo de suprir as células no leito da ferida com oxigênio e nutrientes (SGONC; GRUBER, 2013). O tecido de granulação tem, ainda, por finalidade substituir o tampão de fibrina hemostático formado durante a fase inflamatória (PROFYRIS; TZIOTZIOS; DO VALE, 2012). Além de produzir fatores de crescimento que favorecem a proliferação e diferenciação de células epiteliais para restauração da integridade da barreira epitelial (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010).

Os fibroblastos são formados, principalmente, a partir de células mesenquimais não diferenciadas residentes na derme, estas sob influência das citocinas e fatores de crescimento liberados a partir de plaquetas, neutrófilos e macrófagos (GUO; DIPIETRO, 2010). Os fibroblastos são capazes de sintetizar diversos componentes da MEC tais como colágeno tipo I e III, glicosaminoglicanos e proteoglicanos (SGONC; GRUBER, 2013). Além disso, estão envolvidos em diversos eventos do processo cicatricial, onde contribuem na formação de tecido de granulação, produção de citocinas que favorecem a proliferação e migração de queratinócitos e no efeito autocrino para própria diferenciação fenotípica em miofibroblastos, com o intuito de exercer forças de tração para promover a contração da derme e consequente fechamento da lesão (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010;

WERNER; KRIEG; SMOLA, 2007). Os miofibroblastos aproximam as margens da ferida, forçando as fibras de colágeno a se sobreporem e se entrelaçarem (PAGANELA *et al.*, 2009).

Um grupo importante de proteases, denominadas de metaloproteinases de matriz (MMPs) desempenham um papel central na cicatrização de feridas, pois estas degradam determinados constituintes do tecido provisório da ferida como colágeno I, III, IV e VII (SCHREML *et al.*, 2010). Além de eliminar proteínas defeituosas, destruir a matriz extracelular provisória, remodelar o tecido de granulação e regular a atividade de alguns fatores de crescimento (MULLER *et al.*, 2008)

A atividade destas enzimas é inibida especificamente por inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMPs) (MULLER *et al.*, 2008). Estes inibidores desempenham uma função relevante, visto que a degradação continuada prejudicaria a formação do novo tecido. Dessa forma, a cicatrização de feridas é, também, influenciada pela relação entre a produção de MMPs e TIMPs (SCHREML *et al.*, 2010).

A fase de remodelação tecidual é marcada pela transição de tecido de granulação para maturação e reorganização de fibras colágenas (KONDO; ISHIDA, 2010). Desta forma, durante a segunda semana após a lesão, as células inflamatórias gradualmente abandonam a área da ferida e a síntese do colágeno tipo I aumenta, devido tanto ao aumento do número de fibroblastos, como a necessidade de deposição de fibras para substituir a matriz degradada pelas MMPs (DIEGELMAN, 2004). Em seguida, o tecido de granulação regride e ocorre a formação de uma cicatriz preliminar firme, composta por colágeno, fibroblastos e fragmentos de tecido elástico. Os fibroblastos desaparecem gradualmente em alguns dias e origina-se uma cicatriz acelular que preenche a região da ferida, coberta por uma epiderme intacta e desenvolvida (KRAFTS, 2010).

Por conseguinte, a fase de remodelação é responsável pelo aumento da resistência do leito da ferida danificado. Isto reflete uma diminuição da deposição de colágeno, do número de ligações cruzadas feitas entre monômeros desta substância e da mudança do colágeno tipo III para o I (ISAAC *et al.*, 2010).

Após a maturação e remodelação da matriz extracelular, a cicatrização da ferida é considerada completa. Este processo ocorre lentamente e, mesmo assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da capacidade/força tênsil da pele normal (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

O reparo de uma ferida pode ocorrer de maneira espontânea, porém quando tratada, a cicatrização da lesão tende a ser mais rápida e com melhores resultados sob o ponto

de vista funcional e estético. Desta forma, a possibilidade de acelerar a cicatrização tem sido o foco de diversas pesquisas (MÖRSCHBÄCHER *et al.*, 2011). De modo que o emprego de plantas medicinais na cicatrização de feridas tem crescido ao longo dos tempos, sendo utilizadas desde as formas mais simples como tratamento local, até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial utilizadas pelo homem atualmente (MONTES *et al.*, 2009).

1.4 Plantas medicinais

Desde os tempos antigos e em praticamente todas as culturas, as plantas têm sido utilizadas para fins medicinais, demonstrando sua importância para a saúde dos indivíduos e das comunidades (LIMA *et al.*, 2012). O homem primitivo buscava descobrir soluções para suas necessidades básicas e suas experiências e observações resultaram em descobertas importantes para soluções de tratamentos de ferimentos ou doenças através do uso das plantas e ervas (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

A medicina tradicional é utilizada em todas as partes do mundo e tem grande relevância econômica, especialmente nos países em desenvolvimento (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007). Onde cerca de 80% desta população necessitam de plantas para fins medicinais (BALICK; ARVIGO; ROMERO, 1994; FYHRQUIST *et al.*, 2002). No Brasil, o emprego de plantas medicinais está presente desde antes da colonização, quando índios já as utilizavam e, em seguida, passaram seus conhecimentos para os colonizadores (LIMA *et al.*, 2012).

O Brasil possui uma grande extensão territorial e condições climáticas diversas, o que faz com que a sua flora possua várias espécies vegetais, muitas destas consideradas importantes matérias-primas, outras incorporadas ao hábito alimentar e algumas pouco conhecidas e potencialmente benéficas (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Além da potencialidade do valor econômico-estratégico no campo do desenvolvimento de novos medicamentos (CALIXTO, 2003).

A descoberta de novas moléculas biologicamente ativas pela indústria farmacêutica e o uso de extratos de plantas para a automedicação pelo público em geral contribuem para o crescente interesse em plantas medicinais (DARWISH; ABURJAI, 2010). De modo que, as plantas constituem uma fonte de novos compostos biologicamente ativos,

que podem ser utilizados seja de maneira direta, como remédios populares ou indiretamente nas preparações farmacêuticas de medicamentos (MASOKO; PICARD; ELOFF, 2007).

Nesse contexto, vários trabalhos presentes na literatura relatam as ações farmacológicas de biomoléculas provenientes de plantas, através de testes pré-clínicos com animais, sendo, portanto, substâncias com grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como recursos medicamentosos no seguimento da produção em larga escala de novos fármacos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Atualmente, as maiores indústrias farmacêuticas mundiais possuem programas de pesquisa na área de produtos naturais, pois estes oferecem diversas vantagens, tais como grande quantidade de compostos químicos; muitas classes de estruturas homólogas; estruturas químicas di e tridimensionais; fonte de pequenas moléculas para alvos moleculares complexos e, mais importante, capazes de serem absorvidas e metabolizadas pelo organismo (CALIXTO, 2003).

1.5 Características da família *Combretaceae* e gênero *Combretum*.

A família *Combretaceae* possui duas subfamílias denominadas *Strephonematoideae* e *Combretoideae* (TAN *et al.* 2002). A subfamília *Strephonematoideae* é distribuída exclusivamente na África e possui um único gênero, *Strephonema*. Enquanto que a subfamília *Combretoideae* possui diversas espécies e sua distribuição ocorre de forma mais ampla, sendo formada por duas tribos, *Laguncularieae* e *Combreteae*, com quatro e doze gêneros, respectivamente, sendo os gêneros *Combretum* e *Terminalia* encontrados em todos os continentes (LOIOLA *et al.*, 2009).

As espécies da família *Combretaceae* constituem importantes elementos de mangues, florestas úmidas e de regiões semiáridas, possuindo cerca de 13 gêneros e 500 espécies, com distribuição tropical, ocorrendo em ambientes quentes de todos os continentes, com centros de diversidade na África e Ásia (LOIOLA *et al.*, 2009). No Brasil, ocorrem 05 gêneros e 79 espécies, sendo 27 endêmicas (MARQUETE; VALETE, 2010).

As plantas do gênero *Combretum* apresentam diversas formas de crescimento, podendo variar desde árvores da floresta com mais de 50 metros de altura para arbustos e cipós. Observa-se também grande variação na morfologia das flores, frutos e ramo vegetativo, o que dificulta a identificação das espécies deste gênero (ELOFF; KATERERE; MCGAW, 2008).

Os gêneros *Combretum* e *Terminalia* possuem diversas espécies que são utilizadas amplamente na medicina popular, principalmente, em partes da África, onde a maioria das espécies é encontrada (MCGAW *et al.*, 2001). Plantas pertencentes aos gêneros *Combretum* e *Terminalia* são utilizadas para inúmeros tratamentos, tais como dores abdominais, dor nas costas, tosse no peito, resfriados, conjuntivite, diarreia, dismenorreia, dor de ouvido, febre, dor de cabeça, ancilostomíase, infertilidade em mulheres, hanseníase, pneumonia, mordida de escorpião e cobra, inchaço causado por caxumba, sífilis, fraqueza e dor de dentes (MCGAW *et al.*, 2001; MASOKO; PICARD; ELOFF, 2007; ELOFF; KATERERE; MCGAW, 2008).

As espécies do gênero *Combretum* apresentam inúmeros metabólitos secundários com propriedades biológicas conhecidas, como taninos, di e triterpenos e seus derivados glicosilados, saponinas, flavonóides, cumarinas, estilbenos, derivados do ácido elágico e alcaloides. Além de demonstrarem diversas atividades farmacológicas, tais como anticolinesterase, antiparasita, leishmanicida, antimalária, larvicida, antibacteriana, antimicrobiana, antifúngica, antitripanossômica, hipoglicemiante, anti-inflamatória, antinociceptiva, antitumoral, antiviral, antitussígena, cardiovascular, imunoestimulante, citotóxica, moluscicida, anti-hepatotoxicidade, antiespasmódica, gastrointestinal, geniturinária (LIMA *et al.*, 2012; FARIAS *et al.*, 2015).

Devido a sua toxicidade para os seres humanos, os frutos das espécies de *Combretum* não servem para fins medicinais sendo, portanto, utilizado predominantemente as folhas e cascas (MCGAW *et al.*, 2001).

1.6 Características do *Combretum leprosum* Mart.

O *Combretum leprosum* é uma espécie neotropical com distribuição exclusiva na América do Sul, com registros na Bolívia, Paraguai e Brasil (EXELL *apud* LOIOLA *et al.*, 2009). No Brasil, as populações de *C. leprosum* possuem distribuição nativa e são encontradas na Amazônia, Caatinga, Mata-Atlântica, ocorrendo no Norte (PA, AM, TO), Nordeste (MA, PI, CE, RN, PB, PE, BA), Centro-Oeste (MT, GO, MS) e Sudeste (MG) (FORZZA; LEITMAN, 2010).

O *Combretum leprosum* possui sinônimos populares tais com mofumbo, mufumbo, cipoaba, pente de macaco (Estado da Paraíba) e carne de vaca (Estado do Mato Grosso do Sul) (LIRA *et al.*, 2002). E o nome dado ao epíteto específico *leprosum* faz referência às manchas nas folhas, com a relativa semelhança com a “lepra” (MAIA, 2004).

Esta espécie é capaz de sobreviver em solos extremamente degradados, sendo tolerante ao encharcamento e resistente ao fogo (PACHECO *et al.*, 2014). E é extremamente empregada na recuperação de áreas degradadas, principalmente, de matas ciliares, além de exercer função de forrageira, medicinal e apícola (MAIA, 2004).

Várias partes do *C. leprosum*, tais como folhas, raiz e casca do caule são empregadas na medicina popular com a função de calmante e agente hemostático, e são utilizadas, também no tratamento de bronquite, gripe, tosse, sudorese, difteria, azia e na cicatrização de feridas (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; FACUNDO *et al.*, 2005).

O *Combretum leprosum*, contém diversos compostos, tais como triterpenos, flavonóides, estilbenos, fenantrenos e alcalóides (FACUNDO *et al.*, 1993). E estudos que avaliaram compostos isolados de diferentes partes desta planta sugeriram que o mofumbu apresentou algumas atividades biológicas que incluem ações anti-inflamatória, anti-nociceptiva, anti-colinesterase e anti-ulcerosas (NUNES *et al.*, 2009; PIETROVSKI *et al.*, 2006).

A análise química do extrato etanólico das folhas, demonstrou que os monossacarídeos são os principais componentes (80%), os triterpenos representam 10%, seguidos dos oligossacarídeos (5%) e ácidos graxos (3%). Foram isolados, ainda, das folhas e raízes do *Combretum leprosum* cicloartanos, triterpenos (ácido arjunólico, ácido mólico, e 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20 (29) -eno) e flavonóides (3-O-metilquercetina, e quercetrina), tendo algumas destas substâncias atividade biológica comprovada (FACUNDO *et al.*, 1993; FACUNDO *et al.*, 2005).

Em um estudo conduzido por Facundo e colaboradores (2005), foi constatado que o extrato etanólico e o ácido arjunólico obtidos a partir de raízes de *C. leprosum* podem exercer atividades anti-inflamatórias, antinociceptiva e anticolinesterásicas. Além disso, Pietrovski e colaboradores (2006) demonstraram que o extrato etanólico das flores de *C. leprosum* foi capaz de inibir a nocicepção provocada em diferentes modelos como a hiperalgesia visceral provocada por ácido acético, a hiperalgesia por calor na placa quente, e ainda, hiperalgesia neurogênica e inflamatória, nos modelos com formalina, capsaicina e Glutamato. Ademais, estudos realizados por Medeiros *et al.* (2003) comprovaram que o extrato etanólico da raiz de *C. leprosum* e o ácido arjunólico, triterpeno isolado desta planta, reduziram o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

O triterpeno lupano, e o extrato etanólico dos frutos do *C. leprosum* apresentam atividade contra formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* (TELES *et al.*, 2011). Em

estudos mais recentes, observou-se que o lupano foi capaz de interferir na replicação da forma amastigota de *L. amazonensis* comprovando sua ação leishmanicida e, ainda, nas análises de bioinformática verificou-se que possivelmente esta molécula pode ser um inibidor potencial da topoisomerase tipo 1B (TELLES *et al.*, 2015).

Em 2008, Da Silva demonstrou que extrato etanólico e o triterpeno ($3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno) isolado das flores de *C. leprosum* possuem potente atividade anti-inflamatória por via tópica, visto que foram capazes de inibir o edema e a migração celular em processos inflamatórios na pele. Além disso, a aplicação tópica do extrato etanólico das flores de *C. leprosum* foi capaz de reduzir o processo inflamatório da pele hiperproliferativa, demonstrando o potencial anti-inflamatório deste composto (HORINOUCI *et al.*, 2013).

Figura 2 - Partes aéreas da *Combretum leprosum*



Fonte: Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos (2011)

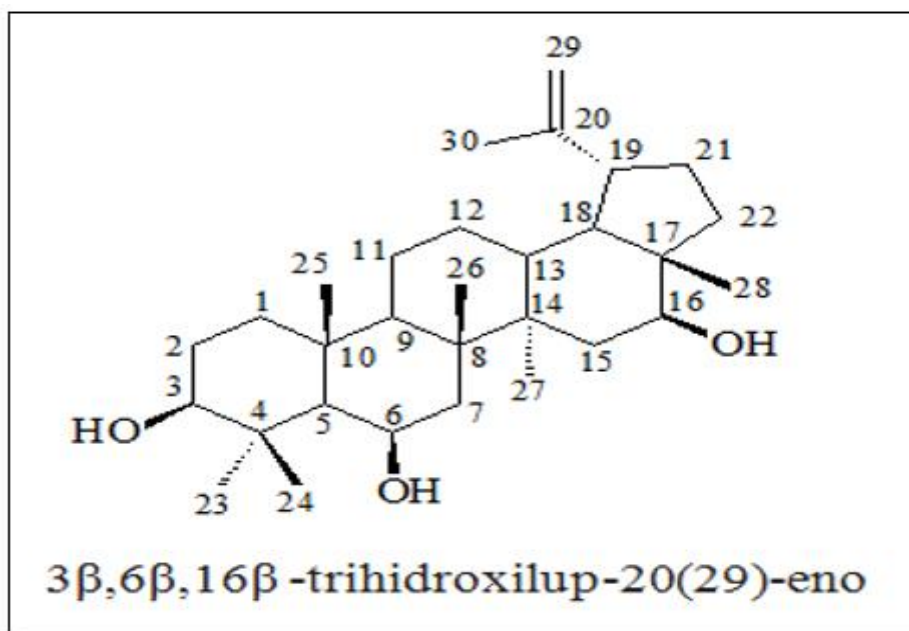
1.7 Triterpenos

Triterpenos pertencem às classes de terpenos, que são caracterizados quimicamente pela presença de seis unidades de isopreno, com um total de 30 átomos de carbono. Estas moléculas são encontradas em extratos vegetais e óleos essenciais e são responsáveis por desempenhar diferentes atividades biológicas (HILL, R.A.; CONNOLLY, J.D., 2011).

Os triterpenos são metabólitos secundários produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto) das plantas (LÓPEZ CARRERAS; MIGUEL; ALEIXANDRE, 2012)

A classificação dos terpenos ocorre de acordo com o número de unidades de cinco carbonos de isopreno que participam da estrutura molecular. Desta forma, são denominados monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20) que são moléculas originadas pela adição de uma molécula de C5 de cada vez. Os triterpenos (C30) são resultados da união de duas moléculas C15 (XU *et al.*, 2004).

Figura 3- Desenho esquemático estrutural de CLF-1



Fonte: MAHATO; KUNDU, 1994

2 JUSTIFICATIVA

Defeitos na cicatrização de feridas estão relacionados com certo grau de morbidade e mortalidade, além de interferir na qualidade de vida da população constituindo, assim, um problema de saúde pública.

A compreensão incompleta dos mecanismos moleculares, celulares e fisiológicos que regulam a cicatrização de feridas pode culminar em resultados insatisfatórios nas terapias modernas. Desta forma, elucidar os mecanismos que envolvem o processo de cicatrização é imprescindível para avaliação da evolução da ferida, bem como fundamentar um correto diagnóstico e desenvolver novas terapias com a finalidade de obtenção de uma cicatrização ideal.

A descoberta de novos produtos que elevem o entendimento do processo cicatricial ou que exerçam atividade pró-cicatrizante sobre feridas, que possam substituir fármacos sintéticos, sendo dispostos a custos menores e que venham a favorecer de modo mais acessível o bem-estar do paciente é de fundamental importância para a população e a comunidade científica.

Nesse contexto, produtos naturais poderiam fornecer insumos alternativos para o tratamento de lesões, em virtude da grande variedade de estruturas químicas e por ser uma fonte biológica renovável.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial pró-cicatrizante do extrato etanólico (EECL) e do triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno (CLF-1) provenientes de folhas de *Cobretum leprosum* MART. através de sua utilização como tratamento tópico em lesões cutâneas induzidas em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito citotóxico e mitogênico do CLF-1 em modelo de cicatrização *in vitro* utilizando fibroblastos.
- Avaliar o efeito do EECL e CLF-1 no processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos sob o ponto de vista clínico;
- Investigar a progressão do processo cicatricial, em suas distintas fases, do ponto de vista macroscópico, através da avaliação do processo de reepitelização das lesões;
- Analisar o efeito do EECL e CLF-1 sobre o processo cicatricial de lesões cutâneas, avaliando a evolução sob o ponto de vista histológico;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Todos os animais foram tratados e eutanasiados de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (Ministério da Saúde 012/02), guia para os cuidados e uso de animais de laboratório do *National Institutes of Health* (NIH) e pelo *Canadian Council Animal Care* (CCAC).

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPA da UFC sob o nº 77/2013. E todos os esforços foram feitos para diminuir ao máximo qualquer incômodo existente por parte dos procedimentos realizados nos animais.

4.2 Material vegetal

Folhas de *C. leprosum* foram coletadas em junho de 2013 no distrito de Salgado dos Machados (3.146.043 "S 40 120027" W), localizada a 15 km de distância da cidade de Sobral, Ceará, Brasil. A identificação botânica foi realizada pelo professor Elnatan Bezerra de Souza, taxonomista da Universidade Estadual Vale do Acaraú (Sobral, Brasil), e a excicata da espécie encontra-se depositada no herbário Francisco José de Abreu Matos (Sobral, Brasil) sob número 4573.

4.3 Extração do EECL e CLF-1

O extrato etanólico (EECL) e o triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno (CLF-1) foram preparados como descrito anteriormente por Evaristo *et al.* (2014). Resumidamente, folhas foram trituradas e imersas em uma solução 80% de etanol/ H₂O, na proporção de 25 g/100 mL, por um período de 15 dias. Em seguida foi realizada filtração simples do material e uma alíquota desta solução foi concentrada e liofilizada por 4 dias, resultando no extrato etanólico (EECL).

Para obtenção do CLF-1, foi realizada uma partição líquido-líquido do EECL com o diclorometano. A fração diclorometano foi submetida a um fracionamento cromatográfico com diferentes solventes (hexano, acetato de etila e metanol) puros ou em misturas binárias, onde se obteve a fração hexano/acetato de etila 40%, a qual foi submetida a um novo fracionamento cromatográfico seguido da análise das frações por cromatografia de camada delgada. O isolamento de CLF-1 foi realizado após o último fracionamento cromatográfico da

fração hexano/acetato de etila (91-110), denominada fração 89-95, que se apresentou na forma de um sólido branco.

4.4 Avaliação do efeito do triterpeno bioativo 3 β , 6 β , 16 β trihydroxylup-20 (29) -eno CLF-1) na cicatrização *in vitro*.

O ensaio de cicatrização *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Lampugnani (1999), com algumas modificações. Os fibroblastos foram cultivados em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM - GIBCO® - life Technologies) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO® - life Technologies), 1% de L-Glutamina e 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (GIBCO® - life Technologies) e foram semeados em frascos T-25 para cultura de células (TPP®-Mod:90025) e mantidos a 37°C, em uma atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂.

Após atingirem 80% de confluência, os fibroblastos foram tripsinizados e semeados em placas de 6 poços de fundo chato (2,25 x 10⁵/poço) e mantidos nas condições supracitadas. Após 48h, com os poços completamente confluentes, foi realizado, com auxílio de uma ponteira estéril (200 μ L), a criação de uma *scratch* (“lesão”) na monocamada de células. O sobrenadante foi removido para retirada dos fibroblastos não aderentes e os poços foram novamente preenchidos com as soluções teste preparadas com meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 0,1% de DMSO contendo 1,75 ou 2,5 μ g/mL do triterpeno bioativo CLF-1. Além disso, apenas meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 0,1% de DMSO foi utilizado como controle. A proliferação e migração celular foi avaliada em 0, 6 e 24h após o tratamento.

Para determinar as concentrações utilizadas neste experimento, primeiramente foi realizado um *screening* onde observou-se que o efeito obtido na dose de 2,5 μ g/mL foi o mesmo na concentração de 5,0 μ g/mL.

O experimento foi realizado em duplicata e as imagens foram captadas com câmera digital acoplada ao microscópio invertido de fase (Eclipse Ti-E com óptica CFI60® - Nikon), sendo as áreas das lesões mesuradas com o auxílio do programa de tratamento de imagens ImageJ versão 1.48 (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

4.5 Avaliação do efeito do extrato etanólico (EECL) e do triterpeno bioativo 3 β , 6 β , 16 β trihydroxylup-20 (29) -eno (CLF-1) na cicatrização *in vivo*.

4.5.1 Grupos experimentais

Para a realização do estudo *in vivo* foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) *Swiss* (n=30), machos, com 8 a 10 semanas de vida, pesando $35,0 \pm 5,0$ g, provenientes do biotério central da UFC, *Campus* do Pici - Fortaleza. Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, no biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFC - *Campus* Porangabussu, permanecendo em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12 h claro/escuro, temperatura 25 ± 2 °C e umidade $55 \pm 10\%$) com fornecimento de água e ração específica à vontade.

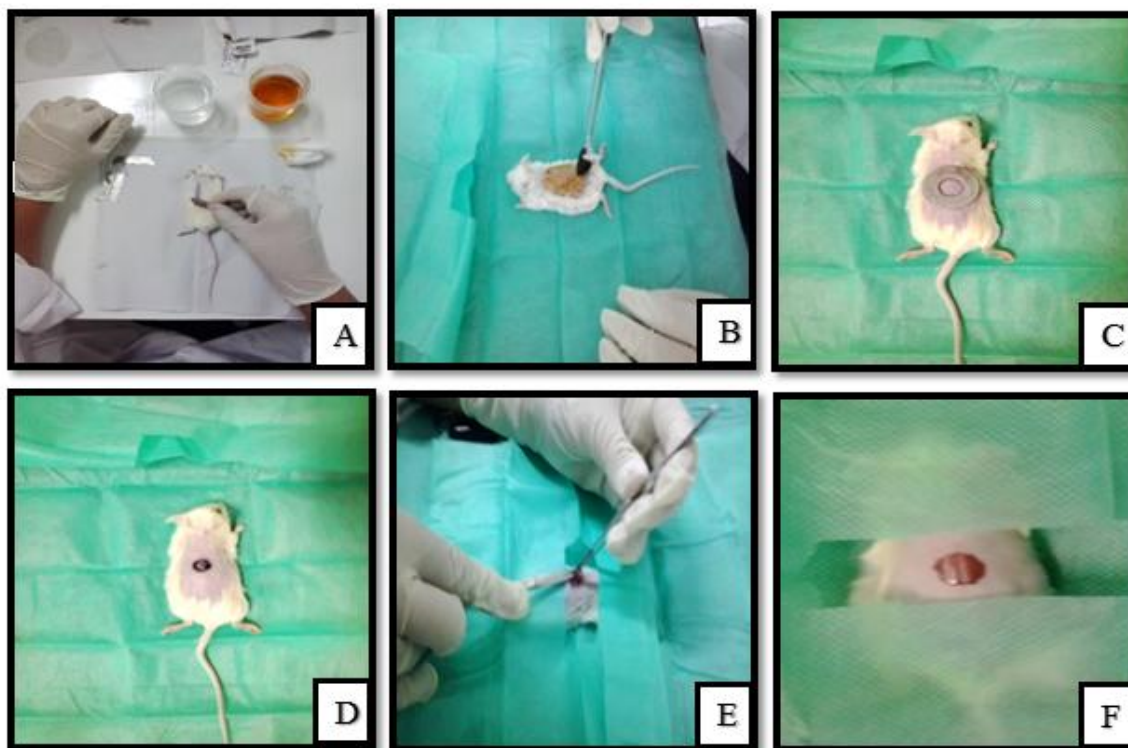
Antes da realização do procedimento cirúrgico, os animais foram aleatoriamente divididos e organizados em 3 grupos (n= 10), de acordo com o tratamento/tipo solução aplicada:

- Grupo 01: Salina estéril
- Grupo 02: EECL 100µg/mL;
- Grupo 03: CLF-1 100µg/mL

4.5.2 Procedimento cirúrgico

Para realização do procedimento cirúrgico experimental, os camundongos foram previamente anestesiados com cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de ketamina 10% (10 mg/Kg e 115 mg/Kg, respectivamente), por via subcutânea (HALL; CLARKE, 1991). Após a anestesia, foram realizadas a tricotomia e a anti-sepsia da região dorsal torácica com iodopovidona e solução salina estéril. A pele foi demarcada com caneta dermatográfica, usando-se um molde metálico para delimitar a área (1,00 cm²) e a ferida cutânea foi produzida pela incisão da pele através de lâmina de bisturi número 15. A tela subcutânea foi divulsionada com tesoura de pontas tipo fina/fina e pinça de dissecação, até sua total ressecção (Figura 3).

Figura 4- Representação do procedimento cirúrgico em camundongos.



Fonte: Próprio autor. A. Tricotomia; B. Anti- Sepsia; C. Padronização da Lesão; D. Demarcação da Lesão E. Ressecção do fragmento de pele; F. Lesão Experimental Realizada.

4.5.3 Tratamento e avaliação macroscópica da atividade cicatrizante

Para preparação das soluções de tratamento, EECL e CLF-1 foram pesados em uma balança de precisão e transferidos para um tubo estéril, onde foi adicionado salina até uma concentração final de $100\mu\text{g/mL}$. Em seguida os tubos foram levados ao vórtex para facilitar a completa solubilização dos compostos.

O tratamento foi realizado imediatamente após o procedimento cirúrgico, e todas as lesões foram tratadas topicamente em dose única diária de $100\mu\text{L}$ de acordo com cada grupo (EECL, CLF-1 e salina estéril), sendo aplicada com auxílio de uma pipeta volumétrica durante os 12 dias do experimento.

As lesões foram avaliadas diariamente até o 12º dia pós-cirúrgico (P.C.) observando-se os sinais flogísticos como: edema (no leito e nas bordas da lesão experimental), hiperemia, sangramento, presença de crosta, exsudato e tecido cicatricial.

Para avaliar a evolução das áreas das lesões, foram realizadas tomadas fotográficas nos dias 2, 4, 6, 8, 10 e 12 P.C.. Com a finalidade de padronizar as imagens,

todas as fotografias foram captadas com auxílio de uma câmera digital (Olympus, VG-110, Japão) acoplada a um tripé com altura fixa. Além disto, todos os animais foram colocados sobre papel milimetrado a fim de se obter uma medida referencial em centímetros. A partir das imagens obtidas foram realizadas a mensuração das áreas das lesões com auxílio do programa de tratamento de imagens ImageJ versão 1.48 (<http://imagej.nih.gov/ij/>) (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). As áreas foram expressas com média \pm SEM para avaliar a evolução do processo sobre o tecido de revestimento.

4.5.4 Avaliação histopatológica

Com os camundongos anestesiados, conforme previamente descrito, amostras do tecido lesionado foram coletadas nos tempos 2º, 7º e 12º dias P.C., com objetivo de realizar a análise histopatológica. Nestes tempos, que são representativos das fases do processo de cicatrização, três animais foram retirados aleatoriamente dos grupos experimentais no 2º e 7º dia P.C. e quatro animais no 12º dia P.C. Após a realização da excisão cirúrgica com margem, os animais foram eutanasiados com deslocamento da cervical e as amostras de tecido foram fixadas em formaldeído 10% (v/v) preparado em tampão PBS 10 mM, pH 7,2. Estas amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em parafina. Após microtomia, os cortes feitos em secções de 5 μ m foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE) (MICHALANY, 1991).

A visualização e a avaliação histopatológica dos fragmentos de pele foram realizadas em microscópio de luz Zeiss modelo Axio Lab A1, através de ampliações de 4, 10, 20 e 40x. As características do processo cicatricial de cada tratamento/grupo foram discriminadas por dois avaliadores, utilizando uma avaliação semiquantitativa dos seguintes componentes: padrão e intensidade do infiltrado inflamatório, edema, hiperplasia da epiderme, deposição de colágeno e neovascularização. A avaliação de cada componente foi caracterizada por presença ou ausência. Para tanto, no caso de presença foram atribuídos escores: intensa (3), moderada (2), leve (1) e ausência (0).

4.6 Avaliação estatística

Os resultados foram analisados com auxílio do programa estatístico GraphPad Prism® versão 6.00 para Microsoft Windows®, onde foram utilizados o teste t de student e Análise de variância (One-way ANOVA com post test de Tukey).

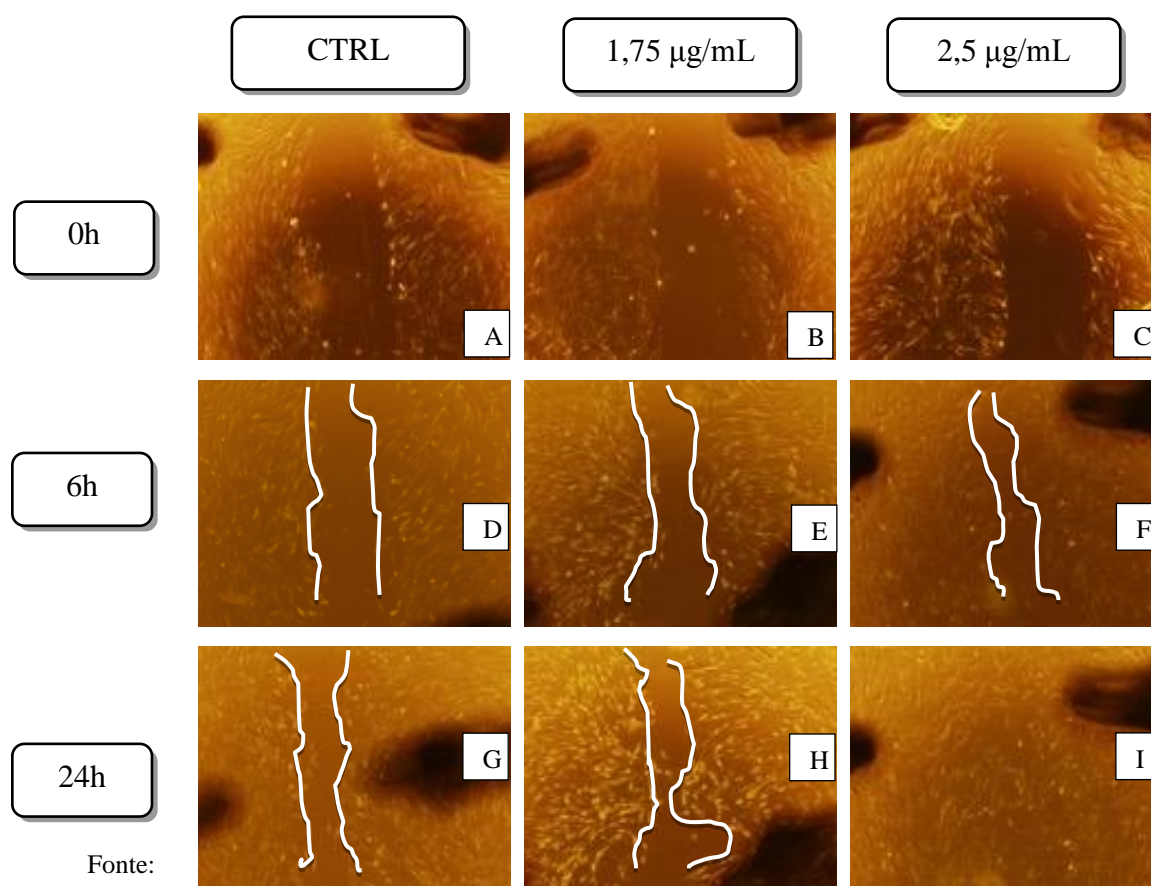
Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média ($M \pm SEM$), sendo considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação microscópica do experimento *in vitro*.

As fotomicrografias apresentadas na figura 5 demonstram o efeito do tratamento com o triterpeno ativo CLF-1 em diferentes concentrações (1,75 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e do controle (0,1% DMSO) nos tempos 0, 6 e 24 horas. No presente estudo, pode-se verificar que o tratamento com CLF-1 não apresentou toxicidade aos fibroblastos, visto que estes permaneceram viáveis durante os tempos analisados. Observou-se, também, que os fibroblastos tratados com CLF-1 apresentaram um aumento significativo na proliferação/migração celular quando comparados àqueles sem tratamento (figura 5).

Figura 5 - Fotomicrografias do efeito do triterpeno (CLF-1) de *Combretum leprosum* no ensaio de migração de fibroblastos *in vitro*.



Fonte:

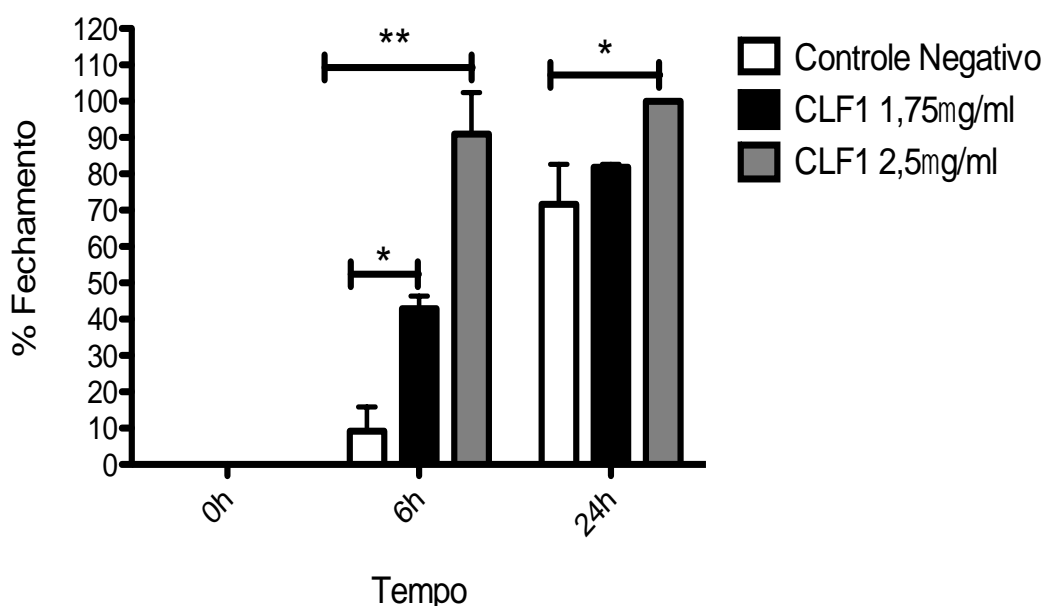
Próprio autor: Efeito do tratamento com CLF-1 1,75 μg (B,E e F), CLF-1 2,5 μg (C, F e I) e controle (meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 0,1% de DMSO) (A,D e G) sob as atividades de migração e proliferação de fibroblastos nos tempos 0, 6 e 24 horas. A linha branca indica a bordo da ferida.

Quando as medições das áreas do *scratch* foram comparadas, observou-se um aumento significativo na porcentagem de fechamento das lesões, em 6 horas, quando

comparado tanto o grupo tratado com CLF-1 1,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, quanto com CLF-1 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ambos com $p < 0,05$) em relação ao controle (gráfico 1).

Além disso, constatou-se que, no tempo de 24 horas, ocorreu um aumento significativo na taxa de migração dos fibroblastos em todos os grupos analisados, e ainda, no grupo tratado com CLF-1 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi possível verificar fechamento total das lesões, sendo este resultado significativo quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$) (gráfico 1).

Gráfico 1- Efeito do tratamento com CFL-1 em diferentes concentrações no ensaio de migração de células *in vitro*.



Fonte: Próprio autor. Fibroblastos confluentes, após a realização do *scratch* foram tratados com diferentes concentrações de CLF-1 (1,75 e 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e controle, sendo analisados em 0, 6, 24 horas. As áreas foram medidas com auxílio do ImageJ versão 1.48. Dados expressos como $M \pm SEM$. * $p < 0,001$; # $p < 0,05$

5.2 Avaliação macroscópica do experimento *in vivo*.

Durante os 12 dias de experimento a evolução das áreas das lesões foi avaliada macroscopicamente indicando uma reepitelização efetiva através do tratamento com CLF-1 e EECL em comparação aos controles (Figura 6).

No 3º dia P.C., observou-se no grupo tratado com CLF-1 discreta hiperemia e edema moderado (Figura 6C), enquanto, que o grupo tratado com EECL apresentou

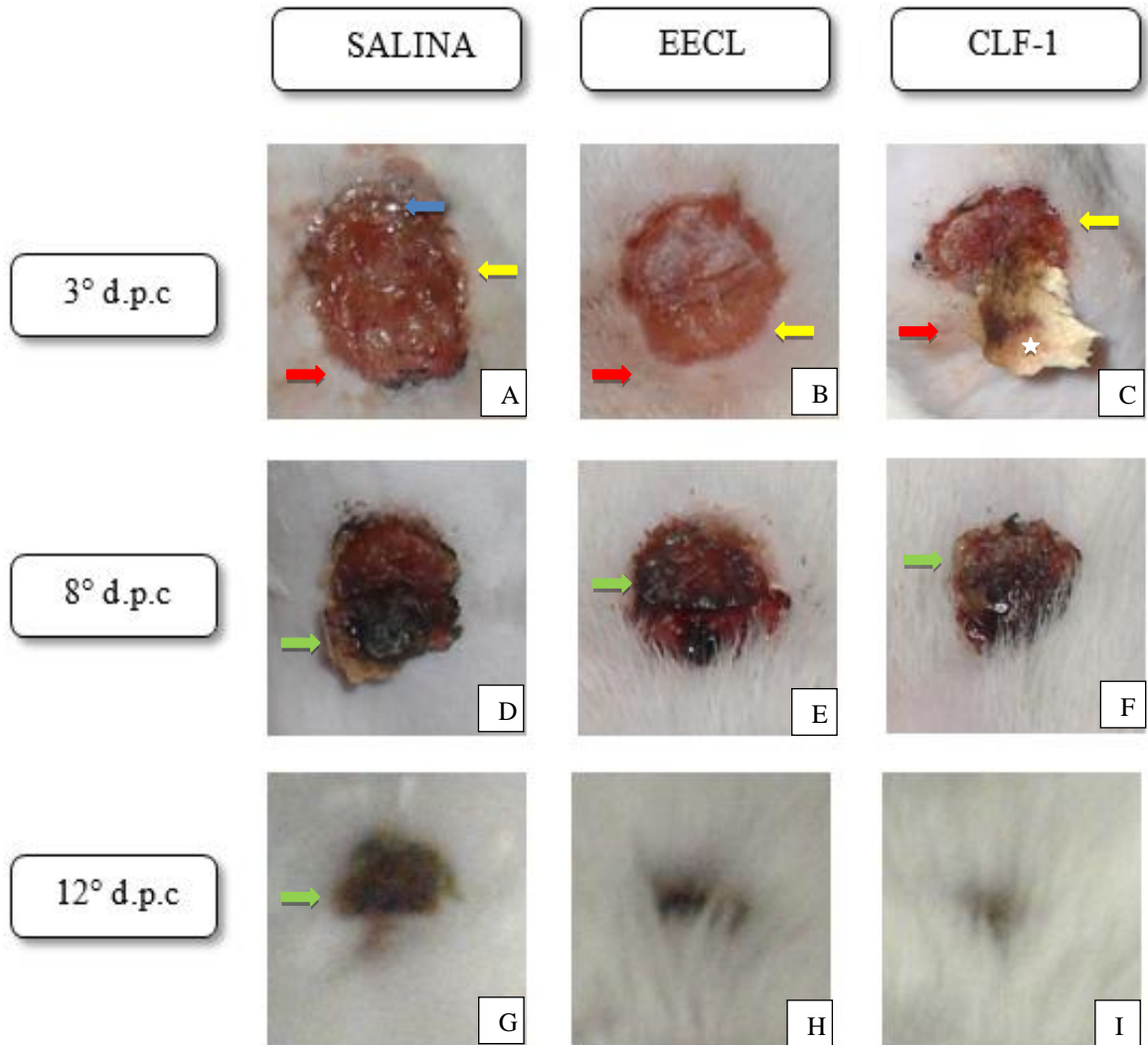
hiperemia moderada e discreto edema (Figura 6B). Por outro lado, os animais que recebeu salina demonstraram edema intenso, moderada hiperemia e presença de exsudato (Figura 6A).

No 8º dia P.C., todos os grupos apresentaram crosta e ausência de hiperemia e edema. No entanto, vale ressaltar, que no 12º dia P.C. os animais tratados com EECL e CLF-1 apresentaram tecido cicatricial. No entanto, aqueles tratados com EECL ainda possuíam fragmentos de crosta no leito da ferida. Em contraste, apenas 25% dos animais no grupo tratado com salina exibiram tecido cicatricial no 12º dia P.C., onde a maior parte das lesões permaneceram abertas até o final do tratamento (Figura 6).

Todos os grupos apresentaram diminuição na área das lesões nos dias avaliados, porém no grupo em que foi administrado CLF-1, observou-se diminuição significativa nas áreas das feridas quando comparado ao grupo controle nos dias 2, 6, 8 e 10 P.C ($p < 0,05$) (gráfico 2). Quando avaliado EECL em relação ao controle negativo, verificou-se diferença significativa nos dias 6, 10 e 12 P.C. ($p < 0,05$) (gráfico 2).

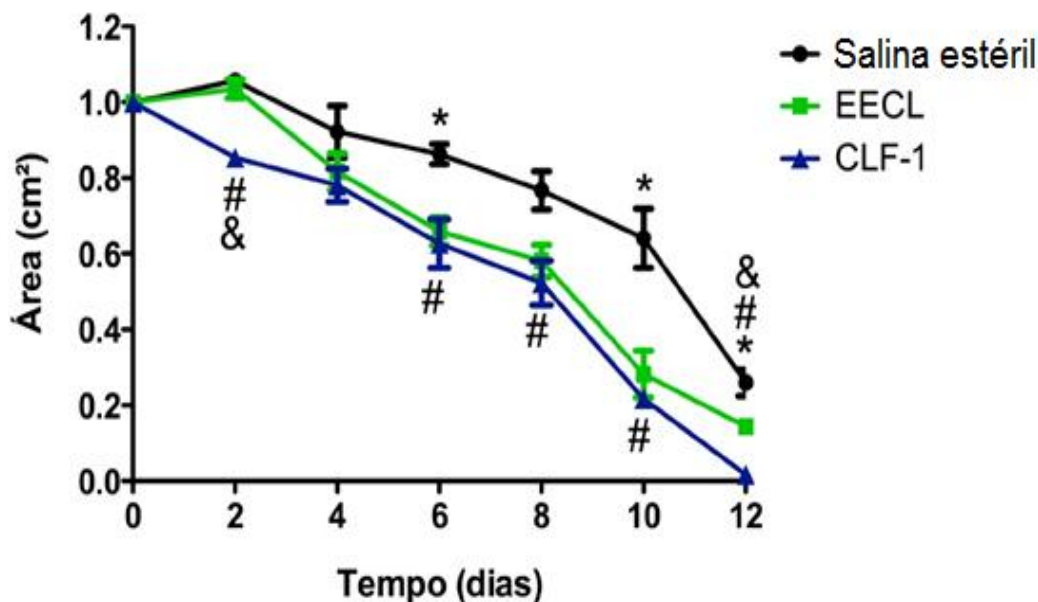
O tratamento com EECL e CLF-1 resultou na diminuição das áreas das feridas em quase todos os dias avaliados. Contudo, foram observadas diferenças significativas entre EECL e CLF-1 somente no 2º e 12º dia P.C. (ambos com $p < 0,05$) (gráfico 2). Além disso, EECL e CLF-1 apresentaram efeitos semelhantes nas áreas das feridas entre 4º e o 10º dia P.C. (gráfico 2).

Figura 6 – Evolução de feridas após tratamento com EECL e CLF-1 de *Combretum leprosum* em lesões induzidas em camundongos.



Fonte: Próprio autor. Fotografias das feridas cirúrgicas dorsais de camundongos tratadas com salina (A, D e G), EECL (B, E e H) e CLF-1 (C, F e I) no 3°, 8° e 12° dia P.C.. Seta: azul: Exsudato; amarela: edema; vermelha: hiperemia; verde: crosta; estrela: raspas

Gráfico 2 – Efeito do tratamento com EECL e CLF-1 de *Combretum leprosum* na evolução das áreas das lesões induzidas em camundongos.



Próprio autor. Efeitos da aplicação tópica EECL e CLF-1 no tamanho das feridas cutâneas induzidas cirurgicamente em camundongos nos seguintes dias pós-operatório (2, 4, 6, 8, 10, 12). Os dados são expressos com $M \pm SEM$. # $p < 0,05$ para CLF-1 em relação ao controle negativo; * $p < 0,05$ para EECL em comparação com o controle negativo; & $p < 0,05$ para CLF-1 em comparação com EECL e controle negativo.

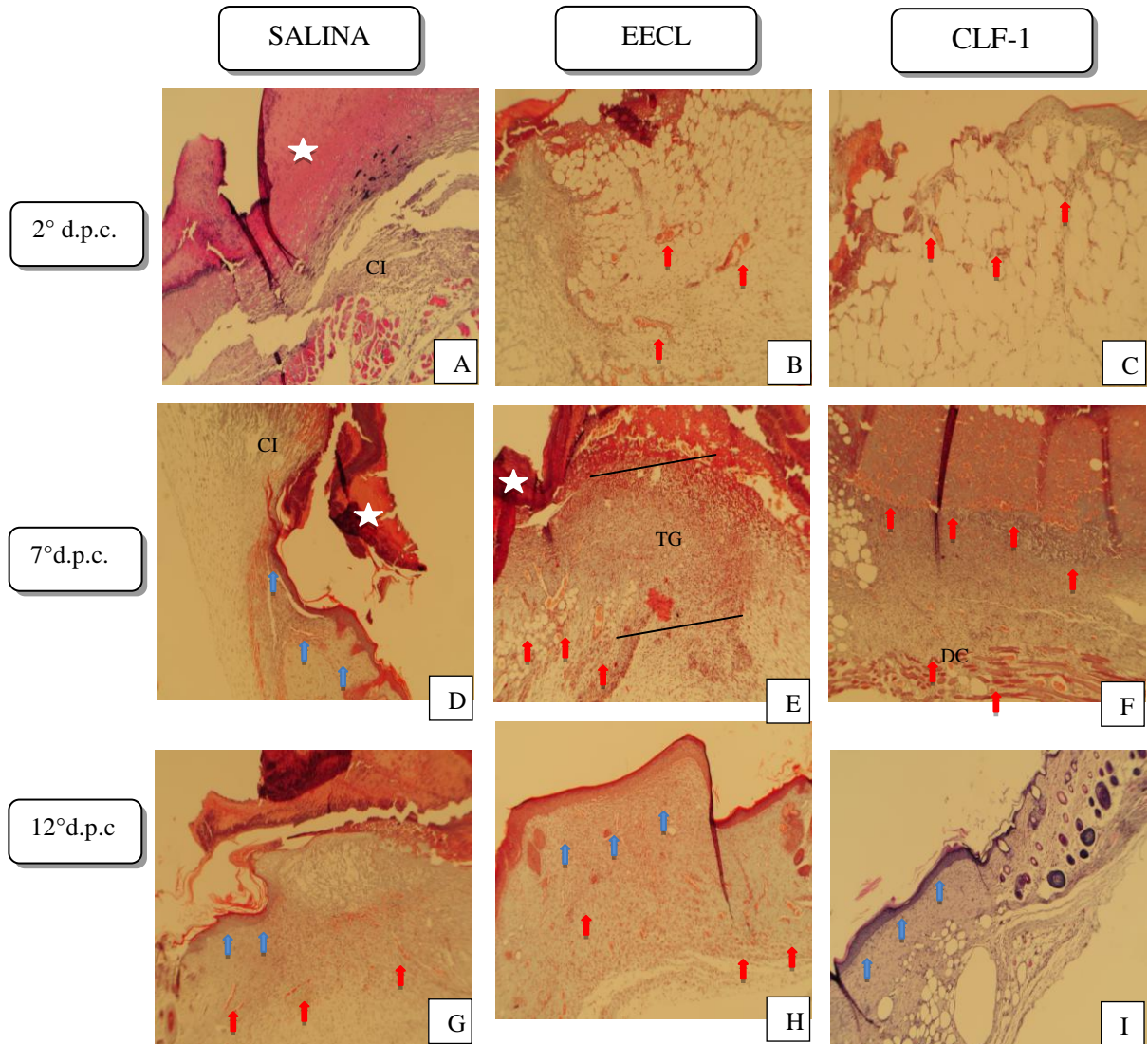
5.3 Avaliação histopatológica

Pode-se observar no 2º dia P.C. que os animais tratados com EECL e CLF-1 exibiram formação do tecido de granulação, com a presença de angiogênese no tecido adiposo e leve infiltrado inflamatório (Fig. 7B e 7C). Enquanto que os animais tratados com salina demonstraram uma crosta espessa cobrindo a ferida e presença de infiltrado inflamatório moderado (figura 7A) com maior prevalência em relação aos animais que receberam EECL e CLF-1.

No 7º dia P.C., verificou-se que alguns animais tratados com EECL apresentaram hemorragia na derme papilar, com uma leve presença de vasos resultantes do processo de angiogênese (figura 7E). Enquanto que os animais tratados com CLF-1 apresentaram uma grande quantidade de vasos na derme (figura 7F). Ao passo que os animais tratados com salina apresentaram proliferação e migração de células epidérmicas nas bordas da área lesionada, avançando para o leito da lesão (figura 7D).

No 12º dia P.C., os animais tratados com EECL apresentaram fechamento da ferida com a presença de hiperplasia epidérmica e com vestígios de tecido de granulação na derme (figura 7H). Enquanto que no grupo tratado com CLF-1, foi observada total reepitelização das feridas com produção de queratina e retração do tecido adiposo, ocorrendo reestruturação das camadas da pele (figura 7I). Em contraste, os animais tratados com salina apresentaram, ainda, feridas abertas com presença de crosta no leito da ferida e proliferação das células epidérmicas nas bordas em direção ao leito, assim como intensa angiogênese na derme (figura 7G).

Figura 7 - Fotomicrografias da pele de camundongos tratados com EECL e CLF-1 de *C. leprosum* no 2º, 7º e 12º dias pós cirúrgico.



Fonte: próprio autor. As fotomicrografias das lesões cutâneas induzidas cirurgicamente em camundongos tratados com a administração tópica de salina (A, D e G), EECL (B, E e H) e CLF-1 (C, F e I). As imagens foram adquiridas no 2º, 7º e 12º dia P.C.. As setas indicam eventos que ocorreram durante o processo de cicatrização: vermelho - vasos de angiogênese; preto – infiltrado inflamatório; azul - reepitelização. Estrela branca - crosta, CI - células inflamatória, TG - tecido de granulação, DC - deposição de colágeno. Método de coloração: H & E. Aumento de 10x (A -F) e 4x (G -I).

6 DISCUSSÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas como fonte de medicamentos em praticamente todas as culturas, desde os tempos antigos, e são de grande importância para a saúde dos indivíduos e das comunidades (VIAU *et al.*, 2014). Além disto, as plantas vêm sendo utilizadas para tratamento de feridas desde a antiguidade (KASOTE; AHMAD; VILJOEN, 2015).

Produtos naturais são a base para diversos insumos biotecnológicos. De fato, estes são compostos biologicamente ativos com grande potencial terapêutico que formam bases moleculares para muitas drogas em uso clínico (PESSOA *et al.*, 2006). A caatinga (vegetação semiárida) é um bioma exclusivamente brasileiro e possui uma significativa biodiversidade, entretanto, ainda pouco estudada (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

No presente estudo, foi avaliado o efeito do tratamento com o extrato etanólico e o triterpeno 3β , 6β , 16β -trihydroxylup-20 (29)-eno (CLF-1) provenientes de folhas de *C. leprosum* no processo de cicatrização de feridas, sendo analisado tanto “*in vitro*” com o ensaio de migração de células, quanto “*in vivo*”, onde, em modelo experimental, feridas cutâneas foram realizadas em camundongos e a evolução clínica e histopatológica foram analisadas.

A cicatrização cutânea é um processo dinâmico que envolve uma ação integrada de vários tipos celulares, com a MEC e mediadores solúveis como citocinas, e que tem por finalidade restaurar a integridade da estrutura anatômica lesada (THOMAS *et al.*, 1995; PARK; BARBUL, 2004). A sequência de eventos que ocorrem na cicatrização é classificada em fases inflamatória, proliferativa e maturação (DIEGELMANN; EVANS, 2004). No entanto, embora a reparação tecidual compreenda um processo sistêmico, é necessário muitas vezes fornecer condições locais adequadas, através de terapia tópica, para viabilizar o processo fisiológico (COELHO *et al.*, 2010).

O objetivo do tratamento de uma ferida é sua recuperação rápida, com mínima dor e formação de cicatriz fibrótica (CLARK, 1991). Entretanto, a informação científica sobre o efeito potencial de agentes tópicos na cicatrização de feridas da pele é limitada, mesmo sendo o estudo da cicatrização cutânea de grande interesse para o setor da saúde pública, visto que as feridas da pele acometem um grande número de pacientes, reduzindo sua qualidade de vida e prolongando o tempo de internação, o que acarreta no aumento significativo das despesas de saúde (RIZZI *et al.*, 2010; PERINI *et al.*, 2015).

As substâncias bioativas oriundas de plantas têm mostrado potencial notável para acelerar a cicatrização de feridas, e devem a sua atividade medicinal a presença de

metabólitos secundários, tais como terpenos, alcalóides, esteróides, taninos, glicosídeos, saponinas e flavonóides, que podem estar contidos nas folhas, hastes, cascas, frutos, sementes, raízes e flores (ADIELE; ADIELE; ENYE, 2014).

O ensaio de *scratch* compreende um método *in vitro* clássico que comumente é utilizado para estudar a migração de células e a biologia subjacente na cicatrização de feridas (YARROW *et al.*, 2004). Além de ser considerado uma plataforma promissora para diferenciar o potencial anti-inflamatório e cicatrizante de diferentes compostos isolados de plantas (FRONZA *et al.*, 2009).

Uma das grandes vantagens desta técnica é a possibilidade da mimetização da migração celular *in vivo*, a adequação especial para o estudo da regulação da migração das células por interação da célula com a MEC e as interações célula-célula, além do método ser compatível com a microscopia, o que permite a análise dos acontecimentos de sinalização intracelular (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Ademais, os ensaios de migração de células *in vitro* podem ser utilizados na investigação da influência de várias drogas e outras substâncias na migração celular (FISCHER; STINGL; KIRKPATRICK, 1990; YARROW *et al.*, 2004).

De acordo com Ghosh *et al.* (2012), compostos isolados de plantas podem promover a contração das lesões de forma mais eficaz e num período de tempo mais curto em relação a outros tratamentos tópicos convencionais, especialmente por estimulação da proliferação de células epiteliais e epitelialização subsequente. Kisseih *et al.* (2015) avaliaram os efeitos *in vitro* (imunofluorescência e Western Blot) do extrato aquoso de folhas de *C. Mucronatum*, planta pertencente ao gênero *Combretum*, sobre as células da pele e verificaram um efeito positivo deste extrato na cicatrização de feridas.

No presente estudo, foi investigado o efeito de diferentes concentrações do triterpeno bioativo isolado de folhas de *C. leprosum* (CLF-1) na migração e proliferação de fibroblastos normais, onde o triterpeno bioativo CLF-1 apresentou influência positiva dose-dependente, levando a completa confluência dentro da área do *scratch* na dose de 2,5µg/mL no tempo de 24 horas. Esses resultados corroboram com os resultados *in vivo*, onde as lesões que foram tratadas com CLF-1 apresentaram fechamento total, enquanto que no grupo controle ainda foi possível observar no 12º dia P.C. feridas abertas com crostas no leito. Adicionalmente, CLF-1 não apresentou toxicidade sobre os fibroblastos, pois estes apresentaram-se viáveis durante o período avaliado.

O ensaio de *scratch* compreende a segunda fase do processo cicatricial, que se caracteriza pela proliferação e migração tanto de queratinócitos, quanto de fibroblastos

(GURTNER *et al.*, 2008). Nesse sentido, os fibroblastos estão envolvidos na produção de colágeno, o que os torna uma das principais células envolvidas na cicatrização, que têm como função principal a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os estudos farmacológicos com extratos e compostos isolados a partir de diferentes partes do *C. leprosum* sugerem várias atividades biológicas tais como anti-inflamatória, anti-nociceptiva, anti-colinesterase e anti-ulcerosa (FACUNDO *et al.*, 2005, NUNES *et al.*, 2009 e PIETROVSKI *et al.*, 2006). Embora o “mofumbo” seja utilizado popularmente como planta medicinal no tratamento de feridas (FACUNDO *et al.*, 2005), não há dados científicos suficientes que demonstrem a eficácia da sua atividade pró-cicatrizante em feridas cutâneas.

A mensuração da área da ferida é um dos aspectos fundamentais na avaliação do processo cicatricial, pois fornece de maneira objetiva parâmetros que indicam a progressão do processo cicatricial (BATES-JENSEN, 1995). No presente estudo, verificou-se uma diminuição nas áreas das feridas tratadas com EECl e CLF-1 durante o período analisado e, adicionalmente, na análise histopatológica foi observado estimulação da formação do tecido de granulação e da proliferação das células epidérmicas.

Estudos *in vivo*, que testaram uma pomada produzida a partir do extrato da casca de *Terminalia catappa*, planta pertencente a família *Combretaceae*, em lesões realizadas em ratos *wistar* demonstrando uma redução de 97% no tamanho da ferida, em comparação com os animais de controle (KHAN *et al.*, 2014). No presente estudo, CLF-1 induziu o fechamento de todas as lesões, enquanto que algumas feridas tratadas com controle, ainda, apresentaram-se abertas.

A reepitelização é um processo que permite a reconstrução da integridade da permeabilidade da epiderme e envolve mecanismos tais como migração e diferenciação dos queratinócitos e reestruturação da membrana basal (LAUREANO; RODRIGUES, 2011). O tecido de granulação consiste em uma matriz formada por células inflamatórias, vasos sanguíneos e fibroblastos. Os fibroblastos produzem uma grande variedade de substâncias importantes no processo cicatricial tais como os componentes da MEC e atuam principalmente na proliferação e migração celular (SINGER & CLARK, 1999).

O reparo dos tecidos no processo de cicatrização de feridas é regulado por uma resposta inflamatória, que por sua vez é caracterizada por um intenso infiltrado inflamatório composto por neutrófilos polimorfonucleares (PMN), seguido de macrófagos (MARTIN;

LEIBOVICH, 2005). Quando adequadamente estimulados por prostaglandinas, estas células produzem mediadores, tais como IL-1, IL-6, TNF- α , e proteoglicanos tais como PF4, que estimulam a remodelação da matriz extracelular (TELLER; WHITE, 2009). Os neutrófilos possuem, ainda, um arsenal de proteínas antimicrobianas e espécies reativas de oxigênio, os quais são capazes de degradar agentes patogênicos. No entanto, este sistema de defesa pode não somente ser nocivo para organismos patogênicos, mas também pode ter um efeito prejudicial sobre os componentes dos tecidos do hospedeiro (NÉMETH; MÓCSAI, 2012).

Horinouchi *et al.* (2013) mostraram que o extrato etanólico das flores de *C. leprosum* reduziu níveis de IL-6 em camundongos, promovendo, assim, um resposta anti-inflamatória. Além disso, o triterpeno 3β , 6β , 16β -trihydroxylup-20(29)-ene isolado a partir das flores da mesma planta reduziu os níveis de IL-1 β e TNF- α sem alterar os níveis de IL-10, demonstrando, assim, ação anti-inflamatória e efeitos antinociceptivos (LONGHIBALBINOT *et al.*, 2012; LONGHIBALBINOT *et al.*, 2011). Ademais, estudos que avaliaram plantas membros da família *Combretaceae* também relataram atividade anti-inflamatória em diferentes extratos. Segundo Zhong *et al.* (2014), o extrato polifenólico da *Terminalia chebula* Retz. diminui a reação inflamatória em múltiplos órgãos de frangos contaminados com *Escherichia coli* aviária. E ainda, o alcalóide extraído do *Combretum molle* demonstrou ter efeitos inibidores da prostaglandina D2 sintase hematopoética (H-PGD), exibindo portanto efeito anti-inflamatório, o que apoia, assim, o uso tradicional desta planta para o controle de inflamações em geral (MOYO; CHIMPONDA; MUKANGANYAMA, 2014).

Desta forma, estes trabalhos corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, em que o tratamento com EECL e CLF-1 induziu uma diminuição na resposta inflamatória, em comparação com o grupo controle. No entanto, apesar da resposta anti-inflamatória, é importante ressaltar que o tratamento com CLF-1, durante o estudo *in vitro* demonstrou o fechamento da área do *scratch* em 24 horas e, por conseguinte, no estudo *in vivo* foi possível observar a atuação do EECL e CLF-1 na diminuição gradativa das áreas das lesões tratadas.

A neovascularização é essencial, pois permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas envolvidas na cicatrização (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). O processo de angiogênese está associado com a fase proliferativa da cicatrização de feridas, na qual novos vasos emergem no terceiro ou no quarto dia após a ocorrência da lesão e está intimamente relacionado com a formação de tecido de granulação. Além disso, a

formação de novos vasos depende do controle dos fatores pró- e anti-angiogênicos (BAO *et al.*, 2009).

Um dos principais fatores pró-angiogênicos é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que está estreitamente relacionado com a proliferação e migração de células endoteliais para formação de novos vasos sanguíneos (JOHNSON; WILGUS, 2012). Outro mediador essencial é o fator de crescimento transformador- β (TGF- β), que promove a formação do tecido de granulação por induzir proliferação de fibroblastos, e pode estimular a produção e deposição de proteoglicanos a partir da matriz extracelular (WERNER; GROSE, 2003). Portanto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que CLF-1 pode estar atuando sobre a produção de VEGF e TGF- β , estimulando, assim, a angiogênese, a produção de colágeno pelos fibroblastos e a migração dos queratinócitos, resultando em um rápido fechamento das lesões mais rápido.

Estudos realizados com plantas pertencentes à família *Combretaceae* corroboram com os achados deste estudo. Taninos extraídos de frutos da *Terminalia chebula Fructus Retz.* demonstraram uma potente atividade anti-bacteriana e pró-angiogênica. Vale ressaltar que a atividade pró-angiogênica dos taninos foi resultante da regulação positiva dos níveis de transcrição, translação e de expressão VEGF-A, o que propiciou o aumento da quantidade de capilares recentemente formados na fase inflamatória, bem como a porcentagem de contração da ferida nas fases de granulação e de formação de cicatriz (LI *et al.*, 2011).

Em resumo, os principais achados deste estudo sugerem que EECL e CLF-1 sejam compostos com atividade pró-cicatrizante e anti-inflamatório que possuem capacidade de auxiliar na terapia de pacientes acometidos por feridas, porém, vale salientar que estudos futuros são necessários para avaliar os mecanismos envolvidos neste processo.

7 CONCLUSÃO

- O triterpeno bioativo CLF-1 de *C. leprosum* não apresentou efeito citotóxico em fibroblastos saudáveis, e induziu proliferação dose-dependente destas células em modelo de cicatrização *in vitro*.

- EECL e o triterpeno CLF-1 isolados de folhas do *Cobretum leprosum* MART. apresentaram potencial pró-cicatrizante em lesões cutâneas induzidas em camundongos.

- EECL e CLF-1 induziram uma diminuição do infiltrado inflamatório, demonstrando assim uma possível atividade anti-inflamatória, além de estimular angiogênese e a epitelização das lesões.

REFERÊNCIAS

- ADIELE, L.C.; ADIELE, R.C.; ENYE, J.C. Wound healing effect of methanolic leaf extract of *Napoleona vogelii* (Family: *Lecythidaceae*) in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 8, p. 620–624, 2014.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.17, p. 114–140, 2007.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-52, 2005.
- BALICK, M. J.; ARVIGO, R.; ROMERO, L. The development of an ethnobiomedical forest reserve in Belize: Its role in the preservation of biological and cultural diversity. **Conservation Biology**, v. 8, ed. 1, p. 316-317, 1994.
- BAO, P. *et al.* The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. **J. Surg. Res.**, v. 153, n. 2, p. 347-358, 2009.
- BATES-JENSEN, B.M. Indices to include in wound healing assessment. **Advanced Wound Care**, v.8, n.4, p.25-33, 1995.
- BHASKAR, RAO, A. *et al.* Wound healing: a new perspective on glucosylated tetrahydrocurcumin. **Drug Design, Development and Therapy**. v.9, p. 3579-3588, 2015.
- BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **J Invest Dermatol.**, v. 126, p. 2565–2575, 2006.
- BROWN, N. J.; SMYTH, E. A.; CROSS, S.S.; REED, M.W. Angiogenesis induction and regression in human surgical wounds. **Wound Repair Regen.**, v. 10, n. 4, p. 245-251, 2002.
- BRUNNEER & SUDDARTH. Tratado de enfermagem médico cirúrgico. 10º ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2005.
- BUSTI, A. J.; HOOPER, J. S.; AMAYA, C. J.; KAZI, S. Effects of perioperative antiinflammatory and immunomodulating therapy on surgical wound healing. **Pharmacotherapy**, v.25, n.11, p.1566–1591, 2005.
- CALIXTO, J. B.. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 55, n. 3, 2003.
- CATALANO, E. *et al.* Tissue-engineered skin substitutes: an overview. **J Artif Organs.**, v. 6, p. 397–403, 2013.
- 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.

CLARK, R. A. F. *Cutaneous Wound Repair*. Oxford University, New York, p. 576, 1991.

CLARK R. A. F.; GHOSH, K.; TONNESEN M. G. Tissue engineering for cutaneous wounds. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, n. 5, p. 1018–1029, 2007.

COELHO, J. M. *et al.* O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 37, n. 1, p. 45-51, 2010.

DA SILVA, C. *Combretum leprosum* Mart. & Eicher (Combretaceae) – Avaliação da atividade antiinflamatória tópica em modelos de inflamação de pele agudo e crônico em camundongos. 2008. 93 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DARGAVILLE, T. R. *et al.* Sensors and imaging for wound healing: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 41, p. 30-42, 2013.

DARWISH, R. M.; ABURJAI, T. A. Effect of ethnomedicinal plants used in folklore medicine in Jordan as antibiotic resistant inhibitors on *Escherichia coli*. *Complementary and Alternative Medicine*. v.10, n.9, 2010.

DE ALBUQUERQUE, *et al.* Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, p. 325–354, 2007.

DELAVARY, B. M. *et al.* Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*, v. 216, p. 753-762, 2011.

DEMIDOVA-RICE, T. N.; DURHAM, J. T.; HERMAN, I. M. Wound Healing Angiogenesis: Innovations and Challenges in Acute and Chronic Wound Healing. *Advances in Wound Care*, v. 1, n.1, p. 17- 22, 2012.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.*, v. 1, n.9, p. 283-9, 2004.

DINH, T.; BRAUNAGEL, S.; ROSENBLUM, B.I. Growth factors in Wound Healing. *Clin Podiatr Med Surg*, v. 32, p. 109–119, 2015.

DOVI, J. V.; SZPADERSKA, A. M.; DIPIETRO, L.A. Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thromb Haemost*, v. 92, p. 275–280, 2004.

DREIFKE, M.B.; JAYASURIYA, A. A.; JAYASURIYA, A. C. Current wound healing procedures and potencial care. *Materials Science and Engineering*, v. 48, p. 651–662, 2015.

DRÉNO, B. Anatomie, immunologie de la peau et de ses ennexes. *Ann Dermatol Venereol*, v. 135, p. 149-52, 2008.

DULMOVITS, B. M.; HERMAN I. M. Microvascular Remodeling and Wound Healing: A Role for Pericytes. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 44, n. 11, p. 1800–1812, 2012.

ELNAR, T. V.; AILEY T. B.; MRKOLJ, V. S. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **The Journal of International Medical Research**. v. 37, n. 5, p. 1528-1542, 2009.

ELOFF, J. N.; KATERERE, D. R. ; MCGAW, L. J. The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 119, ed.3, p.686–699, 2008.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 514–525, 2007.

EVARISTO, F.F., *et al.* Antimicrobial Effect of the Triterpene 3 β ,6 β ,16 β -Trihydroxylup 20(29)-ene on Planktonic Cells and Biofilms from Gram Positive and Gram Negative Bacteria. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

FACUNDO, V. A. *et al.* Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**, v.32, p. 411–415, 1993.

FACUNDO, V. A. *et al.* Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: Anti-inflammatory and anticholinesterasic activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1309–1312, 2005.

FARIAS, R. R. S. *et al.* Prospecção científica e tecnológica das espécies *Combretum duarteanum* Cambess e *Combretum mellifluum* Eichler. **Revista GEINTEC**. v. 5, n.1, p.1606-1616, 2015.

FISCHER, E.G.; STINGL, A.; KIRKPATRICK, C.J.; Migration assay for endothelial cells in multiwells. Application to studies on the effect of opioids. **J Immunol Methods**, v.128, p. 235-239, 1990.

FORZZA, R. C., and LEITMAN, P., coords. Lista de espécies: angiospermas. In: FORZZA, RC., org., *et al.* INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 570-871. Vol. 1. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>. Acesso em 07/07/2015

FURIE, B.; FURIE, B. C. Mechanisms of Thrombus Formation. **N Engl J Med.**, v.359, p. 938-949, 2008.

FYHRQUIST, P. *et al.* Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 79, ed. 2, p.169–177, 2002.

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

GOLDBERG, S. R.; DIEGELMANN, R. F. Wound Healing Primer. **Surg Clin N Am.**, v. 90, p. 1133–1146, 2010.

GREAVES, N. S. *et al.* Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **J. Dermatol. Sci.**, v. 72, p. 206–217, 2013.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, p. 314–321, 2008.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Critical review in oral biology & medicine: factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v.89, n.3, p.219–229, 2010.

HALL, L. W.; CLARKE, K. W. **Veterinary anaesthesia**. London: Ballière Tindall, p. 410, 1991.

HALPER, J.; LESHIN, L. S.; LEWIS, S. J.; LI, W. I. Wound Healing and Angiogenic Properties of Supernatants from Lactobacillus Cultures. **Exp Biol Med** (Maywood), v. 228, p.1329-1337, 2003.

HILL, R.A.; CONNOLLY, J.D. Triterpenoids. **Natural Product Reports**. v. 28, n. 6, p.1087–1117, 2011.

HORINOUCI, C. D. S. *Combretum leprosum* Mart. (*Combretaceae*): Potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v.145, ed. 1, p. 311–319, 2013.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; REGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev Med** (São Paulo), v.89, p.125-123, 2010.

JOHNSON, K.E.; WILGUS, T.A. Multiple roles for VEGF in non-melanoma skin cancer: Angiogenesis and beyond. **J Skin Cancer**, v. 2012, 2012.

JOHNSON, K. E.; WILGUS, T. A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 10, p. 647–661, 2014.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAHN, S. A.; BEERS, R. J.; LENTZ, C. W. Use of acellular dermal replacement in reconstruction of nonhealing lower extremity wounds. **J Burn Care Res**, v. 32, p. 124–128, 2011.

KASOTE, D.; AHMAD, A.; VILJOEN, A. Proangiogenic Potential of Medicinal Plants in Wound Healing. **Evidence-Based Validation of Herbal Medicine**, p. 149–164, 2015.

- KHAN, A.A. et al. Evaluation of wound healing property of *Terminalia catappa* on excision wound models in Wistar rats. **Drug Res (Stuttg)**, v. 64, n.5, p. 225-228, 2014.
- KISSEIH, E. *et al.* Phytochemical characterization and *in vitro* wound healing activity of leaf extracts from *Combretum mucronatum* Schum. & Thonn.: Oligomeric procyanidins as strong inducers of cellular differentiation. **Journal of Ethnopharmacology.**, 2015.
- KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: The role of the macrophage. **Expert Rev Mol Med.**, v. 2013, p. 1-12, 2011.
- KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Sci. Int.**, v. 15, n.1-3, p. 93-98, 2010.
- KRAFTS, K.P. Tissue repair: The hidden drama. **Organogenesis**; v. 6, n. 4, p. 225-233, 2010.
- LAMPUGNANI, M.G. Cell migration into a wounded area *in vitro*. **Methods Mol Biol.**, v. 96, p.177-82, 1999.
- LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M.. Cicatrização de Feridas. **Revista da SPDV**, v. 69, n. 3, 2011.
- LI, K. *et al.* Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula Fructus* Retz. promote cutaneous wound healing in rats. **BMC Complement Altern Med.** v. 11, 2011.
- LIANG, C. C.; PARK, A.Y.; GUAN, J.L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols.** v.2, n.2, p. 329-333,2007.
- LIMA, G. R. M. *et al.* Bioactivities of the Genus *Combretum* (*Combretaceae*): A Review. **Molecules**, v. 17, 9142-9206, 2012.
- LIRA, S.R.D.; ALMEIDA, R.N.; ALMEIDA, F.R.C.; OLIVEIRA, F.S.; DUARTE, J.C. Preliminary Studies on the analgesic properties of the etanol extract of *Combretum leprosum*. **Pharm. Biol**, v.40, p. 213-215, 2002.
- LOIOLA, M. I. B.; ROCHA, E. A.; BARACHO, G. S.; AGRA, M. F. Flora da Paraíba, Brasil: *Combretaceae*. **Acta bot. bras.** v.23, n. 2, p. 330-342. 2009.
- LONGHI-BALBINOT, D. T. *et al.* Further analyses of mechanisms underlying the antinociceptive effect of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 653, n. 1-3, p. 32-40, 2011.
- LONGHI-BALBINOT, D. T. *et al* Anti-inflammatory effect of triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 59-64, 2012.
- LÓPEZ CARRERAS, N.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud : Beneficial health properties of iridoids terpenes. **Nutr. clín. diet. hosp.** v. 32, n. 3, p. 81-9, 2012.

- MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora, 2004.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, Nova York, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources- part I. **An. Bras. Dermatol**, v. 78, n.4, p. 393-410, 2003.
- MARTIN, P.; LEIBOVICH, S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol.**, v. 15, n.11, p. 599-607, 2005.
- MARQUETE, N.; VALETE, M. C. *Combretaceae*. In: FORZZA, RC., org., et al. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 570-871. Vol. 1. ISBN 978-85-8874-242-0. Available from SciELO Books < <http://books.scielo.org> >. Acesso em 28/07/2015.
- MARTINEZ-ZAPATA, M. J. *et al.* Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. **Cochrane Database Syst. Rev.**, 2012.
- MASOKO, P.; PICARD, J.; ELOFF, J. N.. The antifungal activity of twenty-four southern African *Combretum* species (*Combretaceae*). **South African Journal of Botany**. v.73, ed. 2, p.173–183, 2007.
- MCGAW, L. J. *et al.* An investigation on the biological activity of *Combretum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, ed. 1, p. 45–50, 2001.
- MCKELVEY, K.; JACKSON, C. J.; XUE, M. Activated protein C: A regulator of human skin epidermal keratinocyte function. **World J Biol Chem.**, v. 5, n. 2, p. 169-179, 2014.
- MEDEIROS, C. M., *et al.* Atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato etanólico da raiz de *Combretum leprosum* Mart. (*Combretaceae*) (06.032). In: XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Águas de Lindóia, S.P. v. 1. p. 134, 2003.
- MENKE, N. *et al.* Impaired wound healing. **Clin Dermatol**, v. 25, p. 19–25, 2007.
- MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 2. ed. São Paulo: Michalany, p. 277, 1991.
- MIDWOOD, K. S.; WILLIAMS, L. V.; SCHWARZBAUER, J. E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1031–1037, 2004.
- MONTES, L.V. *et al.* Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. **Natureza on line**, v. 7, n. 2, p. 61- 67, 2009.

MÖRSCHBÄCHER, P.D. *et al.* Uso de membrana biológica de Hemicelulose (Veloderm®) e pomada de calêndula (*Calendula officinalis*) como adjuvante na cicatrização músculo-cutânea em um cão. **Vet. e Zootec.**, v.18, n.3, p. 366-370, 2011.

MOYO, R.; CHIMPONDA, T.; MUKANGANYAMA, S. Inhibition of hematopoietic prostaglandin D₂ Synthase (H-PGDS) by an alkaloid extract from *Combretum molle*. **BMC Complementary and Alternative Medicine Basic research**, v. 14, 2014.

MULLER, M. *et al.* Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. **Diabet Med**, v. 25, ed. 4, p. 419–426, 2008.

NÉMETH, T.; MÓCSAI, A.. The role of neutrophils in autoimmune diseases. **Immunol. Lett.**, v. 143, p. 9–19, 2012.

NOVAK, M. L.; KOH, T. J. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. **The American Journal of Pathology**, v. 183, n. 5, 2013.

NUNES, P.H. *et al.* Antiulcerogenic activity of *Combretum leprosum*. **Pharmazie**, v.64, p. 58–62, 2009.

OLCZYK, P.; MENCNER, Ł.; KOMOSINSKA-VASSEV, K. The Role of the Extracellular Matrix components in Cutaneous Wound Healing. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. Wound healing: stages and influencing factors. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p. 267-271, 2012.

PACHECO M. V. *et al.* GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Combretum leprosum* MART. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 1, p. 154 – 162, 2014.

PAGANELA J. C. *et al.* Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.104, n. 569-572, p. 13-18, 2009.

PARK, K. Role of Micronutrients in Skin Health and Function. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 207-217, 2015.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American Journal of Surgery**, v. 187, n. 5, p. 11S-16S, 2004.

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

PERINI, J.A. *et al.* Topical application of Acheflan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, 2015.

PIETROVSKI, E. F. *et al.* Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta,6beta,16beta-trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of

Combretum leprosum in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.83, p. 90–99, 2006.

POWLEY, E, H. The Process and Mechanisms of Organizational Healing. **Journal of Applied Behavioral Science**, v. 49, n. 1, p. 42-68, 2013.

PROFYRIS, C.; TZIOTZIOS, C.; DO VALE, I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: Part I. The molecular basis of scar formation. **J Am Acad Dermatol**, v. 66, ed. 1, p. 01-10, 2012.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 1063–1072, 2008.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **Eur Surg Res.**, v. 49, p.35–43, 2012.

RIZZI, S.C.; UPTON, Z.; BOTT, K.; DARGAVILLE, T.R. Recent advances in dermal wound healing: biomedical device approaches. **Expert Rev Med Devices.**, v. ;7, p. 143–154, 2010.

RODERO, M. P.; KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. **Int J Clin Exp Pathol.**, v. 3, n. 7, p. 643-653, 2010.

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat. Methods**, v. 9, p. 671–675, 2012.

SCHREML, S. *et al.* Wound healing in the 21st century. **J Am Acad Dermatol.**, v. 63, ed. 5, p. 866-881, 2010.

SCHULTZ, G. S. Dynamic Reciprocity in the Wound Microenvironment. **Wound Repair Regen.**, v. 19, n. 2, p. 134–148, 2011.

SGONC, R.; GRUBER, J. Age-Related Aspects of Cutaneous Wound Healing: A Mini-Review. **Gerontology**, v. **59**, n. **2**, p.159-164, **2013**.

SHAH, J. M. Y.; OMAR, E.; PAI, D. R.; SOOD, S. Cellular events and biomarkers of wound healing. **Indian Journal of Plastic Surgery**, v. 45, n. 2, p. 220-228, 2012.

SINGER, A. J. e R. A. CLARK. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, v.341, n.10, Sep 2, p.738-46. 1999.

SINNO, H.; PRAKASH, S. Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. **Plastic Surgery International**. v. 2013, 2013.

TAN, F.; SHI, S.; ZHONG, Y.; GONG, X. & WANG, Y. Phylogenetic relationships of Combretaceae (*Combretaceae*) inferred from plastid, nuclear gene and spacer sequences. **Journal of Plant research**. v. 115 p.475-481, 2002.

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

TELES, C. B. G *et al.* Activity of the Lupane Isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* Promastigotes. **Journal of Brazilian Chemical Society** , v. 22, n. 5, p. 936- 942, 2011

TELLER, P.; WHITE, T. K. The physiology of wound healing: injury through maturation. **Surg Clin N Am.**, v. 89, p. 599–610, 2009

TELLES, C. B. G *et al.* A lupane-triterpene isolated from *Combretum leprosum Mart.* fruit extracts that interferes with the intracellular development of *Leishmania (L.) amazonensis in vitro*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.15, p.165, 2015.

THOMAS, D. W.; O'NEILL, I. D.; HARDING, K. G.; SHEPHERD, J. D. Cutaneous wound healing: A current perspective. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 53, p. 442-447, 1995.

THANGAPAZHAM, R. L., THOMAS N. D.; MEYERLE, J. Alteration of Skin Properties with Autologous Dermal Fibroblasts. **International Journal of Molecular Sciences**. v.15, n. 5, p. 8407–8427, 2014.

THEORET, C. L. Update on wound repair. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.3, n.2, p.110-122, 2004.

VAN DER VEER, W.M. *et al.* Causas celulares e moleculares potenciais de formação de cicatriz hipertrófica. **Burns**, v. 35, n.1, p. 15-29, 2009.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. *Surgery: Basic Science*, v. 28, n. 10, p. 469-472, 2010.

VIAU, C.M.; MOURA, D.J.; FACUNDO, V.A.; SAFFI, J. The natural triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihydroxy-lup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. **BMC Complement Altern Med**. v. 2014, 2014.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines (Review). **Physiological Reviews**. v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.

WERNER, S.; KRIEG, T; SMOLA, H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 998–1008, 2007.

WILGUS, T. A. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each taje of repair. **Pharmacological Research**, v. 58, p. 112–116, 2008.

YARROW, J. C. *et al.* A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC Biotechnology**, v. 4, n.21, 2004.

XU, R.; FAZIO, G.C.; MATSUDA, S.P. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry** , v.65, n.3, p.261-29, 2004.

ZHONG *et al.* Polyphenol Extracts from *Punica granatum* and *Terminalia chebula* Are Anti-inflammatory and Increase the Survival Rate of Chickens Challenged with *Escherichia coli*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 37, n. 10, p. 1575–1582, 2014.