WAGNER SOARES PESSOA

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS TRATADOS COM FITOTERÁPICO DE ANGICO (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*)

RECIFE
2012

WAGNER SOARES PESSOA

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS TRATADOS COM FITOTERÁPICO DE ANGICO (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal

Orientador:
Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Co-orientadora:
Profª. Drª. Liriane Baratella Evêncio

RECIFE
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS TRATADOS COM FITOTERÁPICO DE ANGICO (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*)

Tese de Doutorado Elaborada Por

WAGNER SOARES PESSOA

Aprovada em 27 de fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto (Presidente)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

_____
Prof. Dr. Fábio de Souza Mendonça
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

_____
Profa. Dra. Ligia Reis de Moura Estevão
PNPD do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal - UFRPE

_____
Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio
Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE

_____
Prof. Dr. Juliana Pinto de Medeiros
Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE

RECIFE
2012

DEDICATÓRIA

A **Deus,**
por me dar a vida e pela presença
constante nos momentos de alegria.

Ao meu pai,
Antonio Ferreira Soares Filho (*in memoriam*)**,**
exemplo pessoal e profissional, com quem aprendi
a ter coragem, não desanimar e saborear
as vitórias.

À minha mãe,
Vitorinha Pessoa Soares,
exemplo pessoal de como viver com honestidade,
lealdade e amar a Deus e ao próximo,
sempre me apoiando e incentivando
em todos os momentos de minha vida.

À minha esposa,
Jacqueline Lúcia Machado Soares,
pelo amor, gratidão, paciência e
compreensão nos momentos
de minha ausência e pelo apoio
na realização deste Doutorado.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. **Joaquim Evêncio Neto**, meu orientador e Diretor do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela confiança, oportunidade e realização de um sonho.

A Prof[a]. Dr[a]. **Ana Lúcia Figueiredo Porto,** Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

A minha Co-orientadora Prof[a]. Dr[a]. **Liriane Baratella Evêncio**, Professora do Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, pelos ensinamentos e apoio à vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. **Haroudo Satiro Xavier**, Professor do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, pela ajuda e estímulo ao estudar os Produtos Naturais e Métodos Cromatográficos.

A Prof[a]. Dr[a]. **Ângela Maria de Miranda Freitas**, Curadora do Herbário Sérgio Tavares do Departamento de Ciência Florestal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela identificação do material botânico, como também, nas referências da planta.

A Prof[a]. Dr[a]. **Lígia Reis de Moura Estevão**, que me ajudou desde o início do experimento, como também, na revisão deste estudo.

Ao MSc. **José de Castro Souza Neto Junior**, médico veterinário do biotério do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, pelo auxilio nos procedimentos cirúrgicos.

Ao Engenheiro Agrônomo **Leonardo Rodrigues da Silva,** pelas coletas do material botânico.

As amigas, **Maria Edna Gomes de Barros** e **Keila Regina Lopes da Silva,** do programa de Pós-graduação em Biociência Animal pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os amigos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, que me acompanharam principalmente o MSc. **Antonio Pedro Soares** e MSc. **Ana Lízia Brito da Cunha** pela amizade e colaboração no transcorrer desta conquista.

Aos amigos MSc. **Gibson Gomes de Oliveira** e MSc. **José Antonio de Sousa Pereira Junior** da Universidade Federal de Pernambuco, pela amizade e convívio.

A todos da minha família, em especial ao meu irmão **João Antero Soares Pessoa,** que indiretamente contribuíram para realização deste sonho.

A **SNE - Sociedade Nordestina de Ecologia,** pelos apoios concedidos na coleta do material botânico.

Ao **Departamento de Ciências Farmacêuticas** do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, por ter concedido o biotério para o desenvolvimento do experimento.

A **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, especialmente ao **Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal** por ter me acolhido.

A **Universidade Federal do Piauí**, por ter me liberado durante todos esses anos, em especial ao **Departamento de Morfologia** e a disciplina **Histologia e Embriologia**, na qual faço parte do corpo docente.

RESUMO

A fitoterapia é uma ciência caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas. As plantas medicinais e suas formas derivadas constituíram durante séculos a base da terapêutica. O angico (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) é uma planta onde o extrato de sua casca e entrecasca é utilizada como auxílio no processo cicatrizante em medicamento popular. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da tintura hidroalcoólica (T. HA) a 5% (etanol 7:3 H_2O) da casca e entrecasca do angico, na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Vinte ratos Wistar foram submetidos a cirurgias de pele e tela subcutânea nos antímeros direito e esquerdo da região torácica. Cada falha cutânea recebeu o tratamento imediatamente após a excisão e a cada 24 horas durante 21 dias de acordo com os grupos: Grupo Controle (GC) - Feridas localizadas no antímero direito, tratadas com solução salina a 0,9%; Grupo tratado (GT) - Feridas localizadas no antímero esquerdo, tratadas com T. HA a 5%. As feridas foram mensuradas nos dias 4, 7, 14 e 21 pós cirúrgico e ao final de cada período de avaliação, foram coletados fragmentos da ferida para análise histológica. Os resultados foram analisados morfológica e morfometricamente avaliando o grau de contração cicatricial, o número de vasos sanguineos neoformados e a concentração de fibroblastos e epitelização. Todos os dados foram avaliados pela análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5% ($p < 0,05$). As análises de variância mostraram aumento significativo da concentração de vasos sanguineos neoformados aos 7 e 14 dias e fibroblastos ao 7 dias pós cirúrgico. Não houve diferença no grau de contração cicatricial entre os grupos tratado e controle nos diferentes períodos. Os dados acima indicam que a tintura hidroalcoólica a 5% (etanol 7:3 H_2O) não foi eficiente na contração cicatricial, como também na epitelização.

Palavras-chaves: angico, cicatrização, feridas, fitoterapia, pele

ABSTRACT

Phytotherapy is a science characterized by the use of medical plants in their different pharmaceutic shapes. The medicinal plants and their derivated shapes established for centuries the therapeutic base. The angico (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) is a plant which the stratum of its bark and liber is used as aid in the healing process in popular medicine. The objective of this research it was to value the effect of the hydroalcoholic tincture (T.HA) to 5% (etanol 7:3 H_2O) of the bark and the liber of the angico in skin wounds healing in rats. Twenty wistar rats were submitted in skin and subcutaneous piece surgery in the right and left antimers in the thoracic region. Each cutaneous failing received the treatment right after the extirpation at every 24 hours during 21days according to the groups: Control Group (CG) - wounds localized in the right antimer, treated with saltern solution to 0,9 %, Treated Group (TG) - wounds localized in the left antimer, treated with T. HA to 5%. The wounds were measured at 4, 7, 14 and 21 days after surgery and at the end of each period of avaluation, fragments were collected for histologic analysis. The results were analized morphologically and morphometrically appraizing the degree of cicatrization contraction. The number of newly formed vessels and the concentration of fibroblasts and epithelization. All the knowledge was valued by the analysis of variance and the average compared by the tukey test with to 5% ($p<0,05$). The analysis of variance showed a significant increase concentration of sanguineous newly vessels at 7 and 14 days and fibroblasts at 7 days after surgery. It had no difference in the degree of cicatricial contraction into the treated groups and control in the distinct periods. The informations above indicates that the hydroalcoholic tincture to 5% (etanol 7:3 H_2O) it was not efficient in the cicatricial contraction as well as in the epithelization.

Index terms: angico, phytotherapy, skin, wound healing

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 10
2. **REVISÃO DE LITERATURA** 14
2.1 PELE 15
2.2 CICATRIZAÇÃO 15
2.3 ANGICO (*Anadenanthera colubrina*) 18
2.4 SAPONINAS 22
2.5 FLAVONÓIDES 23
2.6 TANINOS 23
2.7 FITOTERÁPICOS E PRINCÍPIOS DE MANIPULAÇÃO DOS EXTRATOS E TINTURAS 25
3. **REFERÊNCIAS** 28
4. **ARTIGOS CIENTÍFICOS** 38
4.1 PRIMEIRO ARTIGO: Neoangiogênese de feridas cutâneas em ratos tratados com extrato hidroalcoólico de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* 39
4.2 SEGUNDO ARTIGO: Fibrogênese e revestimento epitelial em feridas cutâneas em ratos tratados com extrato hidroalcoólico de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*... 53

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A fitoterapia é uma ciência caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas. O Brasil dispõe de uma diversidade de plantas medicinais. Há muitos anos as plantas medicinais vêm sendo utilizadas com finalidades terapêuticas, onde os produtos fitoterápicos são amplamente comercializados.

A utilização de espécies vegetais formou os primeiros recursos terapêuticos conhecidos pela humanidade, a cerca de 60.000 anos. Aproximadamente 60% da população mundial trata-se através do uso de plantas medicinais, e cada vez mais os produtos naturais vêm sendo reconhecidos como importantes fontes de compostos terapêuticos (PENNAFORTE, 2003). Segundo Destro et al. (2006) cerca de 37% da população adulta dos Estados Unidos da América utilizam da fitoterapia.

Nos últimos dez mil anos de história da civilização agrícola do *Homo sapiens*, os produtos vegetais, fontes de alimentos glicídicos, lipídicos e protéicos, constituíram a base energética e estrutural da cadeia alimentar, o que garantiria suas migrações para caça, plantio e colheita. Originaram-se também de plantas, o emprego medicinal ou mágico por pajés e feiticeiros. Todos os estudiosos da história da Medicina são unânimes em afirmar que o primeiro terapeuta teria sido um agricultor ou um pajé, no uso tradicional ou ritual de chás, inalações e fumigações para alívio de males internos dos semelhantes ou tratamento de ferimentos adquiridos na caça cotidiana e em guerra temporária (VALE, 2002).

O Brasil é depositário de enorme flora riquíssima em matéria prima que tem despertado o interesse de pesquisadores de várias universidades e instituições dedicadas a fitoterapia. Na 1ª edição da Farmacopéia brasileira (1929), a maioria dos medicamentos era de origem vegetal, enquanto na última edição, as plantas medicinais não alcançam a taxa de 5%, apesar de o Brasil apresentar a maior diversidade biológica do mundo. Somente a Amazônia, considerada fonte inesgotável de potencialidades terapêuticas com o uso de plantas medicinais, ostenta o patrimônio de 600.000 espécies vegetais, das quais apenas 5% foram estudadas (VALE, 2002; MARTINS et al., 2006).

Aos poucos, com a evolução da química, substituíram-se os compostos naturais por produtos farmacêuticos obtidos por síntese, que têm um elevado custo até a fabricação em escala e exigem um alto nível tecnológico para sua produção. Atualmente, as plantas

medicinais passaram a ser cogitadas como recurso terapêutico viável, devido ao alto custo dos medicamentos de origem sintética. Isso tem levado ao aumento progressivo da produção e utilização de medicamentos fitoterápicos. No nordeste brasileiro, cerca de 500 espécies vegetais, cuja maioria está constituída de plantas silvestres, são usadas como medicinais, especialmente pela população do meio rural e da periferia urbana (LUZ, 2001; GUIMARÃES et al., 2006).

O uso de chás medicinais - infusões, decoctos, tisanas, tinturas - ou medicamentos de origem vegetal vêm sendo retomado de maneira sistemática e crescente na profilaxia e tratamento das doenças, ao lado da terapêutica convencional, na maioria dos países ocidentais. Pessoas em tratamento com medicamentos quimioterápicos ou potenciais pacientes cirúrgicos também têm utilizado drogas "naturais" do reino vegetal, seja como complemento alimentar, suplemento energético ou vitamínico, indo em busca de terapias alternativas diante de eventuais falhas na cura de suas doenças através da farmacologia oficial (VALE, 2002).

Estudos taxonômicos das plantas medicinais da caatinga na região central do Estado de Pernambuco foi realizado por Araújo et al. (2008). Foram identificados 30 espécies diferentes produtoras de taninos e flavonóides e relacionaram o tanino a propriedades cicatrizantes e anti- inflamatórias. As duas espécies com as maiores quantidades de taninos foram *Myracrodruon urundeuva* Allemao e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, ambas nativas da caatinga. Monteiro et al. (2006a,b) demonstraram a importância destas duas espécies listando 97 diferentes usos que lhes são atribuídos pelas populações rurais. O total fenóis e taninos dessas espécies varia em função da parte da planta e da época da coleta.

O angico é uma planta nativa da caatinga, encontrada no Brasil nas regiões do nordeste, sudeste e sul e anteriormente denominado de *Piptadenia colubrina* Benth. Pertence a família das Leguminosas e apresenta no tronco geralmente projeções cônicas da periderme (QUEIROZ, 2009).

Segundo Agra (1996), o angico é quimicamente constituído por alcalóides indólico (oxido de N, N-dimetiltriptamina), esteróides (palmitato de δ-sitosterol e δ-sitosterol), flavonóides (3,3',4',7,8-pentahidroflavona), triterpenóides (lupenona e lupeol), derivados fenólicos (3,4,5-dimethoxidalbergiona, dalbergiona e kuhlmannia). Contêm nas entrecascas aproximadamente 32% de tanino (PIO CORRÊA, 1978), também conhecidos por proantocianidinas, capazes de facilitar a cicatrização de feridas.

Sua casca tem propriedade hemostática, depurativa, adstringente e cicatrizante e é utilizada na medicina popular em infusão, xarope, maceração e tintura (CORDEIRO et al., 2003; LIMA et al., 2006). Além disso, segundo Palmeira et al. (2010) o extrato hidroalcoólico de angico possui atividade antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

O Elixir Sanativo®, produto indicado no tratamento de feridas, inflamações e tecidos lesionados vem sendo bastante estudado. Segundo Lima et al. (2006), o Elixir Sanativo® é um composto constituído a partir da associação dos extratos hidroalcoólicos de espécies vegetais, entre as quais, na sua composição está presente angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan) e possui atividade cicatrizante.

Tomando por base os resultados positivos do angico frente a cepas bacterianas, seu uso na medicina popular como cicatrizante e visando ao estudo de uma preparação hidroalcoólica em concentração suficiente para favorecer o processo de reparação tecidual, justifica-se avaliar a ação cicatrizante do extrato hidroalcoólico a 5% (etanol 7:3 H_2O) da casca e entrecascas do angico em feridas cutâneas em ratos.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PELE

A pele forma a cobertura externa do corpo e apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme, onde é constituída por duas camadas, a papilar que é superficial e a reticular que se encontra profunda. A papilar é delgada, constituída por tecido conjuntivo frouxo. A reticular é mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso, e apresenta menos células e fibras colágenas mais abundantes e espessas do que a camada papilar. Abaixo da derme há outra camada de tecido conjuntivo chamado hipoderme ou tecido celular subcutâneo, que não faz parte da pele, apenas lhe serve de união com os órgãos subjacentes (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2009).

A epiderme é uma camada de epitélio estratificado plano queratinizado e está separada da derme pela membrana basal. As células mais abundantes neste epitélio são os queratinócitos. Estão presentes ainda os melanócitos, células de Langerhans e as de Merkel. Apresenta várias camadas dependendo do local em que se encontra, sendo a camada basal, rica em células tronco, a que separa a epiderme da derme (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2009).

A derme é constituída de tecido conjuntivo denso, não modelado, vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas, glândulas sudoríparas e sebáceas, folículos pilosos e músculos piloeretores. Contém fibras colágenas e redes de fibras elásticas, que sustentam a epiderme e ligam a pele à hipoderme. A hipoderme é uma camada fibrogordurosa que proporciona reserva de energia, isolamento térmico e um coxim protetor (GARTNER e HIATT, 1999).

2.2. CICATRIZAÇÃO

A cicatrização de feridas consiste em regeneração de tecido ou órgãos. A cicatrização de uma ferida pode ser feita logo de início, sem complicação ou lentamente, entravada por diversos fatores, tais como: infecção, necrose e perda de substâncias (MANUILA et al., 1997). Tal evento é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos

que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular (MANDELBAUM et al., 2003).

De acordo com Mandelbaum et al. (2003), a perda tecidual pode atingir a derme completa ou incompletamente, ou mesmo atingir todo o órgão, chegando ao tecido celular subcutâneo. Em ferida de espessura parcial (derme incompleta) a reparação faz-se pela reepitelização dos anexos epiteliais ou epitélio derivado da pele adjacente não acometida. Como resultado final tem-se uma cicatriz praticamente imperceptível. Já as feridas de espessura total (derme completa ou estendida ao tecido celular subcutâneo) necessitam da formação de um novo tecido, o tecido de granulação; nesse caso, a cicatriz é totalmente perceptível e, muitas vezes, pronunciada (MANDELBAUM et al., 2003).

A cicatrização das feridas divide-se em três séries de eventos: inflamação, formação de novos tecidos e remodelação da matriz. Logo a lesão começa a cicatrizar por volta de cinco a oito dias, com restabelecimento da continuidade da epiderme e proliferação de tecido conjuntivo (SCOTT et al., 1996).

Segundo Scott et al. (1996), em toda a sua espessura num processo natural durante o estágio inflamatório de perda de pele, desenvolve uma reação imediata, que é caracterizada por uma elasticidade cutânea e tensão muscular para aumentar e distorcer o defeito. Os vasos contraem-se e constringem-se por cinco a 10 minutos. Os neutrófilos infiltrados tentam limpar esta área retirando partículas estranhas. Os monócitos do sangue periférico são progressivamente atraídos, são ativados e tornam-se macrófagos. Estes últimos, como as plaquetas, produzem fatores de crescimento críticos para o início da formação do tecido de granulação. A ruptura do vaso sangüíneo leva a extravasamento dos constituintes do sangue. No início ocorre uma complexa liberação de produtos. Substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases são liberadas (MANDELBAUM et al., 2003). A agregação plaquetária e a coagulação do sangue iniciam a fase precoce da inflamação (SCOTT et al., 1996). Além disso, segundo Mandelbaum et al. (2003) a formação do coágulo serve para coaptar as bordas das feridas, como também para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida. Além de inúmeros mediadores químicos a fase da inflamação depende das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos (MANDELBAUM et al., 2003). Também nesta etapa a fibronectina, produzida pelos fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, atua aderindo simultaneamente a fibrina ao colágeno e a outros tipos de células, para consolidar o coágulo de fibrina. Este coágulo além

de formar base para a matriz extracelular tem propriedades quimiotáticas e promove a opsonização e fagocitose de corpos estranhos e bactérias (MANDELBAUM et al., 2003).

O estágio de formação do novo tecido prossegue quando o coágulo, tecido e outras barreiras à cicatrização são removidos da ferida. Nas feridas simples, a proliferação fibroblástica e infiltração capilar começam do terceiro ao quinto dia. Nas feridas abertas, a evidência destes processos é identificada pelo tecido de granulação (SCOTT et al.,1996). Segundo Mandelbaum et al. (2003), a angiogênese é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização. Os fibroblastos são mais ativos em uma ferida por volta dos 14 a 21 dias e avançam ao longo das linhas de fibrina dentro de um coágulo e ao longo dos capilares que estão crescendo dentro de uma ferida (SCOTT et al., 1996). A fase da proliferação inclui a fibroplasia e formação da matriz, que é extremamente importante na formação do tecido de granulação. A formação do tecido de granulação depende do fibroblasto, célula crítica na formação da matriz. Longe de ser apenas produtor de colágeno, o fibroblasto produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico. A síntese do colágeno pelos fibroblastos começa no quarto ou quinto dia, e as fibrilas menores ligam-se juntas em fibras maiores, que se tornam ainda mais forte e menos solúveis. À medida que colágeno vai se tornando suficiente o número de fibroblastos na ferida diminui, marcando o fim do estágio de reparação (SCOTT et al.,1996; MANDELBAUM et al., 2003).

De acordo com Mandelbaum et al. (2003), as células endoteliais migram para a área da ferida, a seguir ocorre proliferação das células endoteliais. É o movimento das células endoteliais do interior de capilares intactos nas margens da ferida que seguem em direção à região da lesão. Estas células endoteliais formam no exterior do vaso um broto capilar que em seguida une-se ao capilar de onde eram originárias para o restabelecimento do fluxo sanguíneo (BALBINO et al., 2005).

A proliferação e migração epitelial são os primeiros sinais de reconstrução e reparação das feridas cutâneas. A reepitelização da epiderme inicia em torno de 24 horas após a lesão e continua durante a formação do tecido de granulação (SCOTT et al., 1996). No início da proliferação, faz-se a migração de queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais, quando a ferida é de espessura parcial, e apenas das margens se a ferida e de espessura total. Fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio (MANDELBAUM et al., 2003).

De acordo com Scott et al. (1996), o estágio de remodelação da matriz extracelular é um período de consolidação, reforço e remodelação da ferida. O reforço inicial é devido ao coágulo de fibrina, forças adesivas de epitelização, coagulação da proteína na ferida, aumento no número de capilares (neovascularização), fibroblasto e fibrilas colágenas. A quantidade de colágeno aumenta rapidamente durante as três primeiras semanas da cicatrização e então alcança um estado de equilíbrio neste local (SCOTT et al., 1996). A remodelação do colágeno e da matriz dura meses, e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. O processo de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno, melhoria nos componentes das fibras colágenas, reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura. A neovasculatura diminui, e tardiamente a cicatriz é considerada avascular (MANDELBAUM et al., 2003).

2.3. ANGICO (*Anadenanthera colubrina*)

Anadenanthera é um gênero neotropical, reconhecido pela combinação de flores diplostêmones, folhas com nectário peciolar, inflorescência em glomérulo, fruto do tipo folículo e sementes compressas com ala estreita e marginal. O gênero possui apenas duas espécies, que ocorrem em matas ciliares e florestas estacionais. As espécies desse gênero têm uma tradição de uso como alucinógenas em rituais indígenas, especialmente na forma de rapé, pela presença de triptaminas (DMT e bufotenina) e β-carbolinas (QUEIROZ, 2009).

A *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan é uma árvore natural de alguas regiões do Brasil, estando difundido desde o Maranhão até o Paraná e Goiás, (PIO CORRÊA, 1978). Ocorre principalmente em florestas estacionais, distribuindo-se do nordeste do Brasil (Maranhão a Minas Gerais), na caatinga e em florestas estacionais, ao longo das bacias dos rios Paraguai e Paraná no sul do Brasil, nordeste da Argentina e sudeste da Bolívia, e florestas subandinas do noroeste da Argentina e sudoeste da Bolívia até o sul do Equador (QUEIROZ, 2009).

Com relação as suas características morfológicas *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan apresenta-se como um vegetal com casca grossa, rugosa, aberta, pardo-escuro, tronco como diâmetro entre 30-50 cm e 5 a 20 metros de altura. Suas folhas são compostas bipinadas, com 15 a 20 jugas, folíolos opostos, de 4-6 mm de comprimento, com 20-80 jugos.

Suas flores são aproximadamente brancas e pequenas. Os frutos são de vargem comprida e estreita, entretanto a maturação ocorre durante os meses de julho-agosto. A árvore é constituída por madeira avermelhada ou pardo-escura, bastante dura e pesada. A espécie é popularmente conhecida como: angico, angico branco, angico-vermelho e cambuí-angico, (PIO CORRÊA, 1978; LORENZI, 1998). É largamente utilizado em construções rurais, como uma fonte de energia, bem como em medicamentos populares (MONTEIRO et al., 2006b).

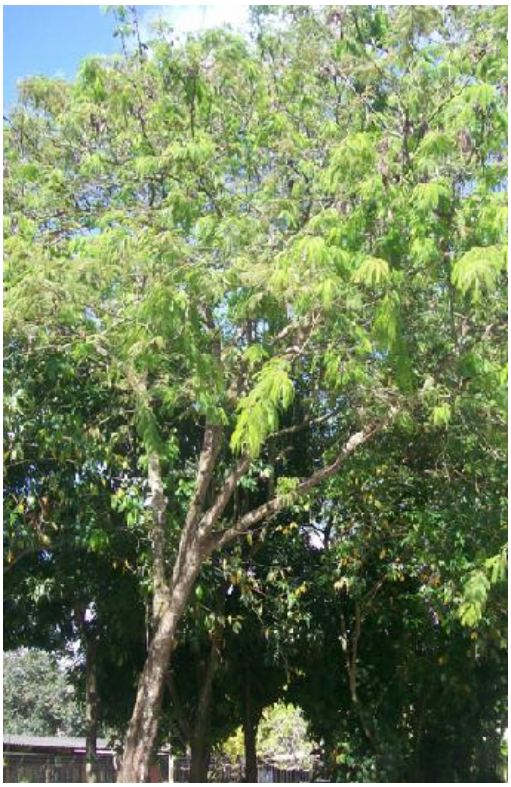

Fig. 1 (Foto do Autor) - Fotografia da planta Angico. *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschlul. UFPE Recife – Pernambuco.

Em sua revisão do gênero *Anadenanthera*, Alstchul (1964) relata a presença de duas variedades para esta espécie, na caatinga: *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschlul e *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan var. *colubrina.*

A variedade *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschlul é a mais comumente encontrada na caatinga, em altitudes que variam de 300 a 800 m, sendo dominante na caatinga arbórea. Entre as características diferenciais da variedade encontra-se a saliência da nervura principal dos folíolos mais saliente, a inflorescência em panícula terminal e margens do fruto regularmente contraídas entre as sementes. Apresenta uma tendência a ter

frutos relativamente mais largos do que a variedade *colubrina* e as margens do fruto com constrições mais irregulares. A variedade é popularmente conhecida como angico-verdadeiro, angico-jacaré, angico-de-caroço, angico-preto e angico-de-casca (QUEIROZ, 2009).

Segundo Pio Corrêa (1978), o angico é uma planta que apresenta casca amarga, adstringente, contendo nas entrecascas aproximadamente 32% de tanino. É muito empregado na indústria de cortume. Segundo este mesmo autor esta planta também é utilizada contra infecções pulmonares e das vias respiratórias. Lima (2006) relata que algumas atividades medicinais são atribuídas ao angico, sendo a sua entrecasca parte mais empregada para esses fins. Segundo este mesmo autor, o decócto produzido com esta parte da planta apresenta propriedade hemostática, depurativa e cicatrizante. Relata também que, devido a sua ação adstringente, o angico vem sendo aplicado no tratamento de anginas, diarréias, leucorréia, gonorréia e ulcerações.

Em trabalho realizado por Sarsur Neto et al. (1989) sobre avaliação farmacológica do extrato liofilizado do angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan), observou-se que doses variáveis do extrato provocaram sinais de depressão do sistema nervoso central e insuficiência respiratória. Também foi observado que o extrato acarretou um efeito sinérgico quando associado a doses sub-hipnóticas de pentobarbital sódico e a doses sedativas de clorpromazina e diazepam. Quanto a propriedades antiepilépticas não demonstraram ação anticonvulsivante em relação ao pentetrazol. Observou-se que o extrato não possui ação analgésica e nem altera a ação analgésica do cloridrato de morfina (SARSUR NETO et al., 1989).

Araújo et al. (2008) realizou um trabalho sobre a abordagem de plantas medicinais com taninos e flavonóides, na área rural do município de Altinho localizado na região central do Estado de Pernambuco. Um levantamento foi feito com especialistas locais sobre o uso e conhecimento na comunidade de plantas medicinais utilizadas como anti-inflamatório e cicatrização de feridas. Os extratos foram obtidos de partes das plantas indicadas pelos informantes e as coletas foram feitas na companhia de especialistas locais. As extrações foram utilizadas para análise quantitativa de taninos, fenóis totais e flavonóides. Na pesquisa de *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan observou-se uma forte associação entre o alto teor de tanino e os efeitos popularmente atribuídos a cicatrização de feridas e ação anti-inflamatórias da planta.

Estudos feito por Monteiro et al. (2006a) sobre concentração de tanino presente na entrecasca e nas folhas *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan, os dados experimentais demonstraram que as concentrações de tanino podem variar em diferentes épocas do ano. Na

estação mais seca do ano foi verificado que a entrecasca e as folhas apresentaram maiores teores de taninos (7,2 e 15,3%, respectivamente).

Segundo Lima (2006) o Elixir Sanativo® é um composto constituído a partir da associação dos extratos hidroalcoólicos de espécies vegetais. Na sua composição estão presentes 20% do angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan, 20% da aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Raddi), 1,7% do camapu (*Physalis angulata*, Linné) e 1,7% do mandacaru (*Cereus peruvianus*, Miller). O Elixir Sanativo® é um produto indicado no tratamento de feridas, inflamações e tecidos lesionados. Em pesquisa realizada com o Elixir Sanativo® em alveolite dental induzida em ratos foi observado que o processo de cicatrização mostrou-se mais evidente aos 15 dias de pós-operatório principalmente no terço médio nos animais do grupo tratado, acentuando-se significativamente aos 21 dias de tratamento, período no qual o terço médio mostra-se quase totalmente obliterado pela ossificação. Desta forma o Elixir Sanativo® contribuiu para que o processo de cicatrização fosse o mais próximo possível dos padrões de normalidade (PESSOA, 2008).

Desta espécie de vegetal é retirado um exsudado gomoso, conhecido como ”goma arábica”, empregado na indústria (PIO CORRÊA, 1978). Este exsudado gomoso produzido pela *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan é formado por um complexo heteropolissacarídeo, ácido constituído principalmente por moléculas de arabinose e galactose, denominado de ARAGAL por Delgobo et al. (1998). Delgobo et al. (1999) encontrou ainda a presença de mono e oligossacarídeos como arabinose, galactose, manose, ramose, e ácido glicorônico. Moretão et al. (2003) demonstrou o efeito do ARAGAL sobre o sistema imunológico, como potencial modificador da resposta biológica. A existência de macrófagos ativados com núcleos grandes, citoplasma aumentado, projeções citoplasmáticas e com maior capacidade de expansão foram vistos tanto em células obtidas de animais tratados quanto em células *in vitro* expostas ao ARAGAL. No teste *in vitro*, 82% das células foram ativadas na presença de 300 mg/mL de ARAGAL após 24 h de incubação e de 91% depois de 48 h. A presença de macrófagos ativados também ficou indubitável em preparações de células de ratos tratados com ARAGAL nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg proporcionando um acréscimo de 60, 75 e 75% respectivamente na ativação de macrófagos, caracterizando assim, uma relação tempo e dose dependente (MORETÃO et al., 2003).

O tratamento de camundongos com 50, 100 ou 200 mg/Kg de ARAGAL aumentou o número de células fagocitárias presentes no exsudado de peritônio em 18, 44 e 88%, respectivamente (MORETÃO et al., 2004). O ARAGAL também promoveu um

desenvolvimento na formação do α-fator de necrose tumoral (α-TNF) por parte dos macrófagos. Macrófagos tratados *in vitro* por 18 h com ARAGAL foram capazes de extinguir 180 células de Sarcoma (S-180). Na concentração de 100 mg/Kg, o ARAGAL mostrou ação antitumoral contra S-180 em ascites ou tumores sólidos com inibição tumoral de 63 e 38%, respectivamente (MORETÃO et al., 2004).

A eficácia do processo de cicatrização dos fitoterápicos está relacionada a ação de flavonóides (PERUCHI et al., 2001; PÉREZ-CARREÓN et al., 2002; SIMÕES et al., 2010), taninos (LAKS, 1991; KHANNA, et al., 2002) e as saponinas (SIMÕES et al., 2010). Há várias espécies de plantas produtoras de taninos, no Nordeste do Brasil, utilizam o angico como uma das fontes para o uso do tanino (PAES et al., 2006).

2.4. SAPONINAS

As saponinas são compostos originários do metabolismo secundário das plantas, geralmente encontrados nos tecidos de maior vulnerabilidade ao ataque fúngico, bacteriano ou predatório dos insetos. Consequentemente, um de seus papéis é atuar como uma barreira química ou como um protetor do sistema de defesa da planta (WINA et al., 2005). As saponinas podem ser classificadas em 2 grupos: as esteroidais e triterpenóides (FRANCIS et al., 2002). As saponinas esteroidais normalmente estão presentes em angiospermas monocotiledôneas e são caracterizadas por uma estrutura de 27 carbonos, geralmente arranjadas em 6 anéis. Os triterpenóides são estruturas pentacíclicas formadas por 30 carbonos e que além da ligação glicosídica no carbono 3 podem ou não apresentar a ligação glicosídica no carbono 28 (SPARG et al., 2004). Muitos dos saponósidos tem propriedades hemolíticas ao desorganizarem a membrana dos glóbulos vermelhos do sangue. (CUNHA e ROQUE, 2005). Uma propriedade característica destas substâncias é a formação de espuma em contato com a água. A importância destes produtos naturais está baseada em suas inúmeras atividades biológicas, destacando-se as atividades anti-inflamatória, analgésica, expectorante, antioxidante, antiviral, antimicrobiana e antifúngica. Estas aplicações estão diretamente ligadas aos tipos de saponinas que podem ser encontrados, sendo muitos estudos realizados atualmente no sentido de verificar novos potenciais de usos (SANTOS et al., 2011). Dentre as aplicações mais importantes destes compostos podem ser citados a redução nas taxas de colesterol e triglicerídeos sanguíneos, o efeito imunogênico, a redução na produção de amônia, o controle de parasitas e o efeito citostático sobre células malignas (FRANCIS et al.,

2002). Outras aplicações consistem na sua utilização em indústrias farmacêuticas, sendo precursores na síntese de compostos esteroidais como hormônios, contraceptivos, diuréticos, entre outros (SANTOS et al., 2011).

2.5. FLAVONÓIDES

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides, sendo que ambos são compostos de baixo peso molecular, denominados metabólitos secundários. Os flavonóides englobam uma classe muito importante de pigmentos naturais e têm a estrutura química C6-C3-C6, sendo que as duas partes da molécula com seis carbonos são anéis aromáticos (VOLP et al., 2008). Flavonóides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos dentre outros. Eles participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais e estão presentes na maioria das plantas, concentrados em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores. São os responsáveis pelo aspecto colorido das folhas e flores (DORNAS al., 2007). Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuarem sobre sistemas biológicos (PETERSON al., 1998). Segundo Beecher (2003) já foram identificados mais de 8000 componentes da família dos flavonóides, sendo suas maiores classes os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, diidroflavonóis e chalconas (COOK e SAMMAN, 1996). Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Entre elas, pode-se citar a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática (HARBORNE e WILLIAMS, 2000; HEIM at al., 2002).

2.6. TANINOS

O termo taninos é muito antigo, tendo sido inicialmente introduzido por Seguin em 1796, para definir o princípio adstringente de casca de carvalho (COSTA, 2002). De acordo com Ribéreau-Gayon (1972), os taninos são os constituintes químicos de tecidos vegetais

responsáveis pela transformação de pele animal fresca em couro (curtimento; tanning em inglês).

Os taninos são amplamente distribuídos dentro do reino vegetal, sendo comuns tanto em espécies gimnospermas como angiospermas. Dentro das angiospermas, os taninos são mais comuns nas dicotiledôneas do que nas monocotiledôneas. Algumas famílias de dicotiledôneas ricas em taninos são as leguminosae, anacardiaceas, combretaceas, rhizoporaceae, mirtacea, e polinaceae (NOZELLA, 2001).

Os taninos pertencem a um grupo de compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas (BUTLER et al., 1984) e ocorrem em uma ampla variedade de plantas. Atuam na defesa da planta contra fungos patogênicos, bactérias, vírus (TAKECHI et al., 1985) e contra ataques de insetos e herbívoros (PRINCE e BUTLER, 1980; KATOH et al., 1989; TEMMINK et al., 1989).

Os taninos não se definem propriamente pela sua composição química, demasiadamente variável, mas por um conjunto de propriedades devidas, em grande parte, à presença de hidroxilos fenólicos nas suas moléculas (COSTA, 2002). Segundo Costa (2002), em cada planta existem diversos taninos e a composição varia de acordo com as regiões onde se localizam na planta.

Na forma não oxidada, os taninos reagem com as proteínas através de pontes de hidrogênio e/ou ligações hidrofóbicas. Quando oxidados, os taninos se transformam em quinonas, as quais formam ligações covalentes com alguns grupos funcionais das proteínas, principalmente os grupos sulfídricos da cisteína e ε-amido da lisina (SGARBIERI, 1996).

Podem ser divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados ou não hidrolisáveis. A diferenciação das classes de taninos hidrolisáveis se dá pelo monômero responsável pela sua formação (EDAGI e KLUGE, 2009). Devido à natureza diversa do poliol central e dos radicais fenólicos a ele ligados, é possível distinguir vários tipos de taninos hidrolizáveis. Os dois principais são os galotaninos e os elagitaninos (JORGE et al., 2001). Os taninos galotaninos são polímeros do ácido gálico. Já os taninos elagitaninos são formados por ácido elágico (EDAGI e KLUGE, 2009).

Os taninos condensados ou proantocianidinas são os mais frequentes na natureza (COSTA, 2002). Podem ser encontrados nas cascas e folhas de diversas árvores (KHANBABAEE e VAN REE, 2001). Quando extraídos dos vegetais, apresentam-se em massas coradas de tons castanhos ou vermelhos, amorfas e bastante solúveis no álcool

(COSTA, 2002). Suas moléculas são constituídas por oligômeros ou polímeros baseados em unidades monoméricas do tipo flavonóide (LAKS, 1991). Os flavonóides são um grupo de compostos distribuído pelo reino vegetal, com moléculas formadas por unidades tricíclicas e hidroxiladas de 15 carbonos (JORGE et al., 2001).

Entre os vários tipos de monoflavonóides que se manifestam na natureza, os taninos condensados ou proantocianidinas são constituídos por unidades flavanol: flavan-3-óis (catequina) ou flavan-3,4-dióis (leucoantocianidina) que participam nas formações dos taninos, pois são os únicos com capacidade de sofrerem reações de polimerização, apresentando-se assim como os precursores dos taninos condensados (PIZZI, 1983).

De acordo com Jorge et al. (2001), os polímeros de proantocianidinas podem conter desde duas até mais de cinquenta unidades flavonóides, dependendo da sua estrutura química e do seu grau de polimerização podem ou não ser solúveis em solventes orgânicos ou aquosos. Os taninos constituem-se como uma classe de substâncias extremamente complexa e variada que partilham as propriedades químicas semelhantes. As classes e subclasses, não representam a totalidade dos taninos existentes na natureza, não esgotando de forma alguma a variedade de estruturas detectadas (JORGE et al., 2001).

Khanna et al. (2001) realizaram pesquisas sobre regulação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) induzido por oxidante em cultura de queratinócitos com extrato de semente de uva com proantocianidina. Os resultados sugeriram que o extrato de semente de uva contendo proantocianidinas pode ter efeitos terapêuticos benéficos em promover a cicatrização de feridas cutâneas e outras doenças de pele relacionadas. Segundo Khanna et al. (2002) as proantocianidinas e os demais taninos são conhecidos por facilitar a cicatrização de feridas. Observaram que no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos, o extrato natural pode ter efeitos tão específicos na indução e sobre regulação da transcrição de um gene angiogênico.

2.7. FITOTERÁPICOS E PRINCÍPIOS DE MANIPULAÇÃO DOS EXTRATOS E TINTURAS

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. A diferença

entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

De acordo com a Secretaria de Vigilância Sanitária em sua portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é "todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com beneficio para o usuário". É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente.

A legislação brasileira da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 16 de março de 2004 - Resolução-RDC nº 48 considera preparações à base de espécies medicinais como medicamentos, já que a composição química da planta é a responsável por seus efeitos terapêuticos e, por isso, devem passar pelos crivos de eficácia, segurança e qualidade (BORELLA et al., 2010). Segundo Borella et al. (2010), há necessidade de se desenvolver metodologias analíticas específicas para tais produtos, desde a matéria-prima até a forma farmacêutica.

De acordo com o formulário nacional do ministério da saúde (BRASIL, 2005), os extratos são preparações de consistência líquida, sólida ou intermediária, obtidas a partir de material vegetal ou animal. O material utilizado na preparação de extratos pode sofrer tratamento preliminar, tais como, inativação de enzimas, moagem ou desengorduramento. Os extratos são preparados por percolação, maceração ou outro método adequado e validado, utilizando como solvente álcool etílico, água ou outro solvente adequado. Após a extração, materiais indesejáveis podem ser eliminados. Extratos secos são preparações sólidas obtidas pela evaporação do solvente utilizado na sua preparação. Apresentam, no mínimo, 95% de resíduo seco, calculados como percentagem de massa. Os extratos secos podem ser adicionados de materiais inertes adequados. Os extratos secos padronizados têm o teor de seus constituintes ajustados pela adição de materiais inertes adequados ou pela adição de extratos secos obtidos com a mesma droga utilizada na preparação. Extratos fluidos são preparações líquidas nas quais, exceto quando especificado diferentemente, uma parte do extrato, em massa ou volume, corresponde a uma parte, em massa, da droga seca utilizada na sua preparação. Os extratos fluídos podem ser padronizados, em termos de concentração do solvente, do teor dos constituintes ou do resíduo seco. Se necessário, podem ser adicionados de conservantes inibidores do crescimento microbiano.

Existem várias metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos. Um dos métodos que considera ser o mais adequado para a análise químico-farmacológica é a preparação de extrato hidroalcoólico. Este extrato é análogo às tinturas realizadas na cultura popular, onde se misturam as partes ativas das plantas com bebidas alcoólicas (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Contudo, no formulário nacional do ministério da saúde (BRASIL, 2005), as tinturas são preparações líquidas obtidas, normalmente, de substâncias de origem vegetal ou animal. Segundo Borella et al. (2010), as soluções extrativas mais comumente utilizadas para veicular estes princípios ativos são as tinturas (extratos hidroalcoólicos preparados com uma parte da droga que é extraída com mais de duas partes e menos de dez partes de líquido extrator. Normalmente, usa-se a proporção 1:5), preparadas conforme descrito na 2ª edição da Farmacopéia Brasileira (1959). Ainda no formulário nacional do ministério da saúde (BRASIL, 2005) as tinturas são normalmente límpidas. Um pequeno sedimento pode se formar por deposição e é aceitável desde que não haja modificação da composição. São baseadas na ação solubilizante do álcool etílico ou da glicerina sobre o pó seco da droga (planta), ao qual se pode agregar água em quantidade necessária para diminuir a concentração alcoólica. A graduação alcoólica da tintura varia de acordo com a solubilidade dos princípios ativos extraídos normalmente entre 30 ºGL e 90 ºGL. Atualmente, a glicerina, o propilenoglicol e o polietilenoglicol também têm sido empregados em misturas com água substituindo o álcool etílico.

No campo da pesquisa o uso do extrato hidroalcoólico tem sido aplicado no auxílio de processo cicatriciais. Castelo Branco Neto et al. (2006), avaliou o extrato hidroalcoólico de aroeira no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos e observou retardo na reepitelização. Segundo (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998), a avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais.

REFERÊNCIAS

3. REFERÊNCIAS

AGRA, M. de F. - Plantas da medicina popular dos cariris velhos (Paraíba – Brasil): espécies mais comuns. João Pessoa: União, 1996.

ALSTCHUL, S. V. R. A Taxonomic study of the genus Anadenanthera. **The Gray Herbarium of Harvard University Cambridge**, Mass., U.S.A june, 1964.

ARAÚJO, T. A. de S.; ALENCARA, N. L.; AMORIM, E. L. C. de; ALBUQUERQUE, U. P. de. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 72-80, 2008.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, jan./mar. 2005.

BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Jornal de Nutrição**, v. 133, n.10, p. 3248S-54S, 2003.

BORELLA, J. C.; RIBEIRO, N. S.; TEIXEIRA, J. C. L.; CARVALHO, D. M. A. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 193-197, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário Nacional.** – Brasília : Ministério da Saúde; 2005. 174p.

BUTLER, L. G.; RIEDL, D. J.; LEBRYK, D. G.; BLYTT, H. J. Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 61, n. 5, p. 916-920, 1984.

CASTELO BRANCO NETO, M. L.; RIBAS FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA FILHO, M. A.; CZECZKO, N. G.; AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V. R.; TEIXEIRA, H. M.; AGUIAR, L. R. F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira,** v. 21, supl., p. 17-22, São Paulo 2006.

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, p. 99-105,1998.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources – review. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 7, n. 1, p. 66-76, 1996.

CORDEIRO, S; GAMARRA, C; GAMARRA, G; LIMA, M; GALLINDO, F. Recife: Centro Nordestino de Informações sobre Plantas - CNIP; Associação Plantas do Nordeste - APNE, Plantas Úteis do Nordeste do Brasil. p. 91-93, 2003.

COSTA, A. F. Fármacos com taninos. In: ____. **Farmacognosia.** 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. cap. 6, v. 1, p. 906-959.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. Esteróis e triterpenos: ácidos biliares, precursores da vitamina D e fitosteróides, cardiotónicos, hormonas esteróides, matérias-primas de núcleo esteróide usadas em sínteses parciais e saponósidos. In: CUNHA, A. P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 432-482, 2005.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharide of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1207-1214, 1998.

DELGOBO, C. L.; Gorin, P. A. J.; Tischer, C. A; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 320, p. 167-175, 1999.

DESTRO, M. W. B.; SPERANZINI, M. B.; DESTRO, C.; GUERRA, C.; RECCO, G. C.; ROMAGNOLO, L. G. C. Estudo da utilização no pré-operatório de medicamentos ou drogas fitoterápicas que alteram a coagulação sangüínea. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 2, Rio de Janeiro mar./abr.2006

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,** v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

EDAGI, F. K.; KLUGE, R. A. Remoção de adstringência de caqui: um enfoque bioquímico, fisiológico e tecnológico. **Ciência Rural,** v. 39, n. 2, p. 585-594, mar.-abr. 2009.

FRANCIS, G; KEREM, Z; MAKKAR, H.P.S; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v.88, p. 587-605, 2002.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tegumento. In: ____. **Tratado de Histologia**. Tradução: Leila Francisco de Souza e Maria das Graças Fernandes Sales. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c1999. cap. 14, p. 253-266.

GUIMARÃES, J.; VIEIRA, L. A.; MEDEIROS, J. C. Programa fitoterálico Farmácia Viva no SUS-Betim, Minas Gerais. **Divulgação saúde debate**, v. 36, p. 41-47, ago. 2006.

HARBORNE, B. J.; WILLIAMS, A. C. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**. v. 55, p. 481-504, 2000.

HEIM, E. K.; TAGLIAFERRO, R. A.; BOBILYA, J. D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 13, n.1, p. 572-584, 2002.

JORGE, F. C.; BRITO, P.; PEPINO, L.; PORTUGAL, A.; GIL, H.; COSTA, R. P. da. Aplicações para as Cascas de Árvores e para os Extractos Taninosos: Uma Revisão. **Silva Lusitana**, v. 9, n. 2, p. 225-236, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. In: ____. **Histologia básica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c2009. cap. 18, p. 359-370.

KATOH, T.; KASUYA, M.; KAGAMIMORI, S.; KOZUKA, H.; KAWANO, S. Effects of air-pollution on tannin biosynthesis and predation damage in crypotomeria-japonica. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 439-445, 1989.

KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: classification and definition. **Natural Product Reports Articles**, v. 18, p. 641-649, 2001.

KHANNA, S.; ROY, S.; BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; SEN, C. K. Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 1, p. 38-42, 2001.

KHANNA, S.; VENOJARVI, M.; ROY, S.; SHARMA, N.; TRIKHA, P.; BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; SEN, C. K. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 8, p. 1089-1096, 2002.

LAKS, P.E. Chemistry of bark. In: ____. ***Wood and Cellulosic Chemistry*, Hon, D.N.S., Shiraishi, N.,** New York: Marcel Dekker Inc., 1991. cap. 7, p. 257-330.

LIMA, C. R. de. **Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.** 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

LIMA, C. R. de; COSTA SILVA, J. H. da; LYRA, M. M. A.; ARAÚJO, A. V.; ARRUDA, V. M.; DIMECH, G. S.; BARATELLA EVÊNCIO, L.; FRAGA, M. do C. C. A.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Atividade Cicatrizante e Estudo Toxicológico Pré-Clínico do Fitoterápico Sanativo®. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, V. 25, n. 4, p. 544-549, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, 2 ed. Nova Odessa, SP: Platarum, 1998.

LUZ, F. J. F. Plantas medicinais de uso popular em Boa Vista, Roraima, Brasil **Horticultura Brasileira**, v.19, n.1, Brasília mar. 2001.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P. D.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia,** v. 78, n. 4, p. 393-408, Rio de Janeiro July/Aug. 2003.

MANUILA, L.; MANUILA, A.; NICOULIN, M. **Dicionário Médico Andrei**. Tradução: Cláudio Roitman. São Paulo: Organização Andrei Editora LTDA, 1997. 860 p.

MARTINS, N. L. P.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J. M.; HEIBEl, M.; BALDEZ, R. N.; VASCONCELOS, P. R. L.; MOREIRA, H.; MAZZA, M.; NASSIF, P. A. N.; WALLBACH, T. Z. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos **Acta Cirúrgica Brasileira,** v.21, supl.3, São Paulo 2006

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E. M. F.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural

communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 173-183, 2006a.

MONTEIRO, J. M.; ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; FLORENTINO, A. T. N.; OLIVEIRA, R. L. C.. Use and traditional management of *Anadenanthera colubrine* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine,** v. 2, n. 6, 2006b.

MORETÃO, M. P.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA M. B. M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, v. 89, p. 175–185, 2003.

MORETÃO, M. P.; ZAMPRONIO, A. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA M. B. M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, v. 93, p. 189-197, 2004.

NOZELLA, E. F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes.** 2001. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; MARINHO, I. V.; LIMA, C. R. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro. **Cerne, Lavras** v.12, n.3, p.232-38, 2006.

PALMEIRA, J. D; FERREIRA, S. B; SOUZA, J. H; ALMEIDA, J. M; FIGUEIREDO, M. C; PEQUENO, A. S. ARRUDA, T. A; ANTUNES, R. M. P; CATÃO, R. M. R. Avaliacao da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentracao inibitoria minima (CIM) de extratos hidroalcoolico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus.* **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 1, p. 33-37, 2010.

PENNAFORTE, R. J. **Estudo da atividade antiinflamatória de duas espécies de plantas amazônicas.** 2003. 70f. Dissertação (grau de Mestre) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

PÉREZ-CARREÓN, J. I.; CRUZ-JIMENEZ, G.; LICEA-VEGA, J. A.; POPOCA, E. A.; FAZENDA, S. F.; Villa-Trevino, S. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with Diethynitrosamine. **Toxicology in Vitro**. v.16, n.3, p.253-8. 2002.

PERUCHI, C. M. S.; SILVA, E. B.; ANDRADE, R. A.; FRANCO, S. L.; RAMALHO, L. Efecto del propóleos en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso de ratones: estudio histológico. **Revista da Faculdade Odontología da Universidade do Chile.** V.19; n.2; p23-34 2001.

PESSOA, W. S. **Avaliação do Elixir Sanativo® sobre o processo de alveolite dental induzida em ratos (Rattus norvegicus albinus).** 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

PETERSON, J.; DWYER J. Flavonoids: Dietary occurence anb biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p.1995-2018, 1998.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1926-1978. v. 1, p. 125-126.

PIZZI, A. Tannin-based wood adhesives. In: ____. ***Wood Adhesives: Chemistry and Technology*.** New York: Marcel Dekker Inc., 1983. Cap. 4, p. 177-248.

PRINCE, M.; BUTLER, L. G. **Tannins and nutrition.** West Lafayette, Indiana, 1980. 37p. (Indi Report, 272).

QUEIROZ, L. P de. Leguminosas da caatinga. **Universidade Estadual de Feira de Santana**. Feira de Santana: Editora Multimídia; 2009. 467 p.

RIBÉREAU-GAYON, P. ***Plant Phenolics***. Edinburgh: Oliver & Boyd, c1972. cap. 7, p.169-197.

SANTOS, F. M. DOS.; SIMÕES, J. C.; SILVA, J. R. A.; BARTHUS, R. C.; POPPI, R. J.; AMARAL, A. C. F. Otimização das condições de extração de saponinas em *Ampelozizyphus amazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. **Quimica Nova**, v. 34, n. 9, p. 1629-1633, 2011.

SARSUR NETO, J. M.; LISBOA, S. M.; BRANDÄO, M. G. L.; COELHO, M. M. Avaliação farmacológica preliminar do extrato liofilizado de angico (Piptadenia colubrina Bth) **Revista de farmácia e bioquímica**, v.10, supl.1/2, p. 31 - 42, 1989.

SCOTT, D. W.; MILLER, JR., W. H.; GRIFFIN, C E. Tratamento dermatológico. In: ____. **Muller & Kirk, dermatologia de Pequenos Animais.** Tradução: Cid Figueiredo. 5. ed. Rio de Janeiro: Interlivros, c1996. cap. 3, p. 158-255.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades – degradações-modificações. São Paulo: Varela, 1996. Cap.5: Deterioração e modificações químicas, fízicas e enzimáticas de proteínas.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ed. Porto Alegre, Florianópolis: Editora UFRGS, UFSC; 2010.

SPARG, S.G; LIGHT, M.E; VAN STADEN, J. Biological activities distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219-243, 2004.

TAKECHI, M.; TANAKA, Y.; TAKEHARA, M.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Structure and antiherpetic activity among the tannins. **Phytochemistry**, v.24, p.2245-2250, 1985.

TEMMINK, J. H. M.; FIELD, J. A.; VANHAASTRECHT, J. C.; MERKELBACH, R. C. M. Acute and sub-acute toxicity of bark tannins in carp (*Cyprinus carpio* L). **Water Research**, v. 23, p. 341-344, 1989.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, supl 2, p. 289-306, abr.-jun. 2006.

VALE, N. B. A farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 3, Campinas maio/jun. 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F; PINTO, A. C; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **QUÍMICA NOVA**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clinica**, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponincontaining plant materials on ruminant productions: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 8093-8105, 2005.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Neoangiogênese de feridas cutâneas em ratos tratados com extrato hidroalcoólico de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*

Wagner Soares Pessoa & Joaquim Evêncio Neto

Resumo

OBJETIVO: Avaliar a neoangiogênese de feridas cutâneas subdérmicas em ratos tratados com extrato hidroalcoólico (E.HA) a 5% da casca e entrecasca do angico (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschlna).

MÉTODOS: Utilizou-se 20 ratos Wistar, machos que foram submetidos a cirurgias de pele e tela subcutânea nos antímeros direito e esquerdo da região torácica. Cada ferida cirúrgica recebeu tratamento tópico imediatamente após a cirurgia e diariamente por mais vinte e um dias de acordo com o grupo experimental. As feridas do grupo controle, localizadas no antímero direito, foram tratadas com solução de cloreto de sódio a 0,9%; as do grupo tratado, antímero esquerdo, foram tratadas com E.HA a 5% da casca e entrecasca do angico, nos dias 4, 7, 14 e 21 de pós-cirúrgico. No final de cada período experimental foram coletados fragmentos da área da ferida para análise histológica. Foi avaliado o número de vasos neoformados.

RESULTADOS: As análises de variância mostraram aumento significativo no número de vasos sanguíneos ($p<0,05$) no sétimo e 14º dias de Pós-operatório.

CONCLUSÃO: O Extrato hidroalcoólico a 5% da casca e entrecasca do angico (*Anadenanthera colubrina v*ar. *cebil*) aumenta a neoangiogênese em feridas cutâneas de ratos.

Termos para indexação: cicatrização, fitoterapia, neovascularização

Neoangiogenesis of skin wounds in rats treated with hydroalcoholic extract of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*

Abstract

OBJECTIVE: Evaluate the neoangiogenesis of skin wounds in rats treated with hydroalcoholic extract of to 5% of the bark and angico liber (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil)*.

METHODS: We used 20 male wistar rats that were submitted surgery of skin and subcutaneous tissue in right and left antimeres of the thoracic region. Each sugical wound received a topic treatment immediately after the surgery and daily for more twenty one days according with the experimental group. The wounds of the control group, localized in the

right antimer, were treated with solution of sodium chloride 0.9%, the wounds of the treated group, left antimer, received as treatment, E. HA to 5%, at 4,7, 14 and 21 days after-surgical. At the end of each experimental period were collected fragments the wound area for histological analysis. We evaluated the number of newly formed vessels.

RESULTS: The analysis of variance showed a significant increase in the number of blood vessels ($p < 0.05$) at 7^{th} and 14^{th} days after-surgical.

CONCLUSION: The hydroalcoholic extract in concentration of 5%5% (etanol 7:3 H_2O) of angico (*Anadenanthera colubrina v*ar. *cebil*) increases neoangiogenesis in skin wounds of rats

Index terms: healing, phytotherapy, neovascularization

Introdução

Desde a antiguidade as plantas medicinais são utilizadas com fins curativos ou preventivos. Os povos primitivos já utilizavam as plantas medicinais para o tratamento de algumas patologias. Acredita-se que o descobrimento das propriedades curativas das plantas ocorreu através de observações de animais que se esfregavam em troncos de árvores para aliviarem suas feridas[1].

O angico é uma planta nativa da caatinga, encontrada no Brasil nas regiões do nordeste, sudeste e sul, contêm nas entrecascas tanino[2]. Sua casca tem propriedade hemostática, depurativa, adstringente e cicatrizante e é utilizada na medicina popular em infusão, xarope, maceração e tintura[3,4]. Os taninos condensados também podem ser designados por proantocianidinas e são conhecidos por facilitar a cicatrização de feridas[5,6]. O extrato hidroalcoólico de angico possui atividade antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*[7].

A cicatrização consiste em uma serie de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido. Em condições normais, o processo cicatricial segue um padrão, podendo ser dividido em três fases específicas: inflamatória, fase fibroblástica e de deposição de matriz extracelular e fase de remodelamento[8]. As características assumidas pela lesão durante sua evolução resultam da sucessão ou sobreposição de eventos celulares e tissulares provocados pela ativação celular por mediadores químicos[8,9].

A ruptura do vaso sangüíneo leva a extravasamento dos constituintes do sangue. Substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases são liberadas[10].

A angiogênese é um mecanismo biológico de formação de novos capilares. Ela envolve a ativação, migração, e proliferação de células endoteliais a partir de vasos pré-existentes[11]. Fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio[10]. O estágio de remodelação da matriz extracelular é um período de consolidação, reforço e remodelação da ferida. O reforço inicial é a deposição, agrupamento e remodelação do colágeno, e é responsável pelo aumento da força de tensão e diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema[10,12]. Nessa fase ocorre uma diminuição progressiva dos vasos de neoformação, bem como dos elementos celulares, inclusive fibroblastos. O epitélio monoestratificado transforma-se em pluriestratificado [12].

O Elixir Sanativo®, medicamento fitoterápico de uso tradicional na região Nordeste do Brasil, é um composto constituído a partir da associação dos extratos hidroalcoólicos de espécies vegetais, entre as quais, na sua composição está presente o angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan). Tem indicação no tratamento de cicatrização de ferida e processo inflamatório. A presença do angico está relacionada a uma ação hemostática e cicatrizante[4]. Lima *et al.*[4] estudou a atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico sanativo® e observou que este apresenta uma significativa propriedade cicatrizante em tecidos epiteliais lesionados.

Diferentes pesquisas vêm demonstrando efeitos cicatriciais de plantas. Parente *et al.*[13] estudou o efeito do extrato etanólico das flores da *Calendula officinalis* L. em feridas cutâneas em ratos e observou atividade cicatrizante com indução da neovascularização. O óleo de copaíba foi avaliado morfológica e morfometricamente em cicatrização de feridas cutâneas em ratos e demonstrou se capaz de aumentar o tecido de granulação e o número de vasos sanguíneos[14,15].

Tomando por base os resultados positivos do angico frente a cepas bacterianas, seu uso na medicina popular como cicatrizante e visando ao estudo de uma preparação hidroalcoólica em concentração suficiente para favorecer o processo de reparação tecidual, este trabalho visa avaliar morfometricamente a neoangiogênese de feridas cutâneos subdérmicos em ratos tratados com extrato hidroalcoolico a 5% (etanol 7:3 H_2O) da casca e entrecasca do angico (*Anadenanthera colubrina v*ar. *cebil*).

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Biotério do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Este trabalho foi submetido à Comissão de

Ética no Uso Animal da UFRPE. Após a ortotanásia, os animais foram preparados, segundo as exigências dos princípios éticos para trabalhos experimentais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), São Paulo, Brasil, 1991.

O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso (DIC), composto pelos tratamentos extrato hidroalcoólico a 5% e solução de cloreto de sódio a 0,9%, avaliados nos períodos pós-operatórios de 4, 7, 14 e 21 dias. Foram utilizados 5 repetições para cada tempo farmacológico, sendo considerado cada animal uma unidade experimental.

Casca e entrecasca de angico (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) foram coletadas, no período da manhã, em 02 de novembro de 2009, no município de Pombos, Pernambuco. A planta foi identificada por comparação de um exemplar já identificado e depositado no Herbário Sérgio Tavares do Departamento de Ciência Florestal da UFRPE sob o número 17242.

O Extrato Hidroalcoólico foi preparado a partir do tronco de uma árvore adulta no Departamento de Farmácia no laboratório de Farmacognosia da UFPE. Inicialmente, este material foi submetido a processo de pulverização em moinho de faca. O pó obtido foi pesado e, junto com 500 mL de metanol, foram adicionados ao aparelho de Soxhlet[16]. Após 12 horas a mistura foi retirada do Soxhlet, filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida[17] com temperatura entre 40 ºC e 45 ºC para obtenção do extrato seco de *A. colubrina* var. *cebil*. Uma alíquota equivalente a 5g deste extrato foi diluída em etanol a 70%, obtendo-se o extrato hidroalcoólico a 5% (etanol 7:3 H_2O). Este foi mantido em recipiente de vidro âmbar em temperatura ambiente até a realização do experimento.

Preparou-se infusões metanólicas (15% p/v) usando cascas e entrecascas do caule do angico *(Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschlna). Alíquotas do extrato (15 μL) foram comparativamente analisados por cromatografia em camada delgada (placas pontas de gel de sílica MercK. Art. 105553), desenvolvendo-se os cromatogramas com fases móveis de polaridades diversas e seus componentes revelados segundo a classe de metabólitos a investigar[18,19]. Pesquisou-se a presença de polifenóis (cumarinas, antraquinonas, derivados cinâmicos, fenilpropanoglicosídeos, flavonóides, proantocianidinas e taninos gálicos), alcalóides e terpenóides (iridóides, mono e sesquiterpenos, triterpenos, esteróides e saponósidos).

Foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), wistar, machos, com 120 dias de idade e peso médio de 350 gramas, provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os ratos foram agrupados aleatoriamente em quatros grupos de cinco animais e mantidos em caixas

individuais, em ambiente com temperatura de 23 a 25^{o} C e ciclo claro/escuro controlados de 12 em 12 horas. Receberam ração comercial para roedores (Presence®, Purina) e água à vontade.

Após anestesiados com anestesia dissociativa com xilazina na dose de 3mg kg^{-1} e cetamina, 10 mg kg^{-1}, por via intramuscular, segundo Estevão [15], os animais foram posicionados em decúbito ventral e submetidos a tricotomia bilateral e antissepsia com clorexidine tópica alcoólica a 0,5%. A área foi demarcada utilizando um demarcador metálico cilíndrico com 1,3 cm de diâmetro. Com lâminas de bisturi número15 e tesoura de ponta romba foram realizadas incisões de pele e tela subcutânea no antímero direito e esquerdo da região torácica, separadas por uma distância mínima de 2 cm. O tecido foi dissecado e retirado ficando exposta a fáscia muscular adjacente.

Cada falha cutânea recebeu o tratamento imediatamente após a excisão cirúrgica e seguindo a metodologia estabelecida: Grupo controle (GC) – Feridas localizadas no antímero direito, recebendo uma aplicação tópica diária durante 21 dias de solução de cloreto de sódio a 0,9%; Grupo tratado (GT) – Feridas localizadas no antímero esquerdo, recebendo uma aplicação tópica diária durante 21 dias de extrato hidroalcoólico a 5% (etanol 7:3 H_2O) de angico.

Nos tempos 4, 7, 14 e 21 dias pós-operatório os animais dos respectivos grupos foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano e ortotanasiados para coleta dos fragmentos. Cada ferida cirúrgica foi dissecada com margem de 0,5 cm de pele íntegra em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do animal. Os fragmentos foram fixados em formol a 10% por 48 horas e transferidos para álcool a 70%. Em seguida, foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol, processados para inclusão em parafina pelos métodos de rotina, cortados em micrótomo tipo Minot ajustado para 5 μm e colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer. Após secagem, os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina (HE) para as análises morfológica e morfométrica. O material foi analisado e fotografado em Microscópio Biológico Trinocular NIKON 50i acoplado a um sistema de captura de imagem microscópica.

Para cada região do retalho cutâneo foram obtidas seis imagens, que foram analisadas em um software analisador de imagens (Imagelab 2000), pelo qual foi possível quantificar o número de vasos sanguíneos neoformados. Os dados obtidos para a variável de número de vasos sanguíneos e contração da ferida foram submetidos à análise de variância, e as médias

foram comparadas pelo teste de Tukey, $p<0,05$ de probabilidade. As análises foram feitas usando o software Assistat, versão 7.6 beta[20].

Resultados e Discussão

Na análise morfológica da derme, em ambos os grupos no 4º dia, foram observados estroma conjuntivo com células inflamatórias, presença de fibroblastos e vasos sanguíneos, característicos da fase de fibroplasia da cicatrização, na qual a migração dos fibroblastos é sempre acompanhada de proliferação[21]. Juntamente com crosta fibrino leucocitária, alta concentração de células polimorfonucleares foram identificadas em ambos os grupos no 4º dia de pós-operatório (PO). Estes achados coincidem com os observados por Castelo Branco Neto *et al.*[22], ao trabalharem com extrato hidroalcoólico de aroeira. Os leucócitos polimorfonucleares chegam no momento da injúria tissular e permanecem por um período de três a cinco dias, com a função principal de eliminação de possíveis microorganismos pela fagocitose[10].

A fibroplasia é extremamente importante na formação do tecido de granulação. Segundo Balbino *et al.*[8], com o aumento dos fibroblastos ativados para produção de colágeno, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Neste experimento os fibroblastos presentes na derme e subderme nas feridas do grupo tratado (GT) no 7º dia de PO apresentavam-se em maior concentração quando comparados ao grupo controle (GC), onde também foram observadas áreas de desestruturação das fibras colágenas e poucos vasos sanguíneos.

Na avaliação morfométrica dos vasos sanguíneos, observou-se que as feridas do grupo tratado apresentaram maiores médias de número de vasos sanguíneos no 7º e 14º dias de pós-operatório quando comparadas ao grupo controle. Nos tempos 4º e 21º dias de pós-operatório não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 1).

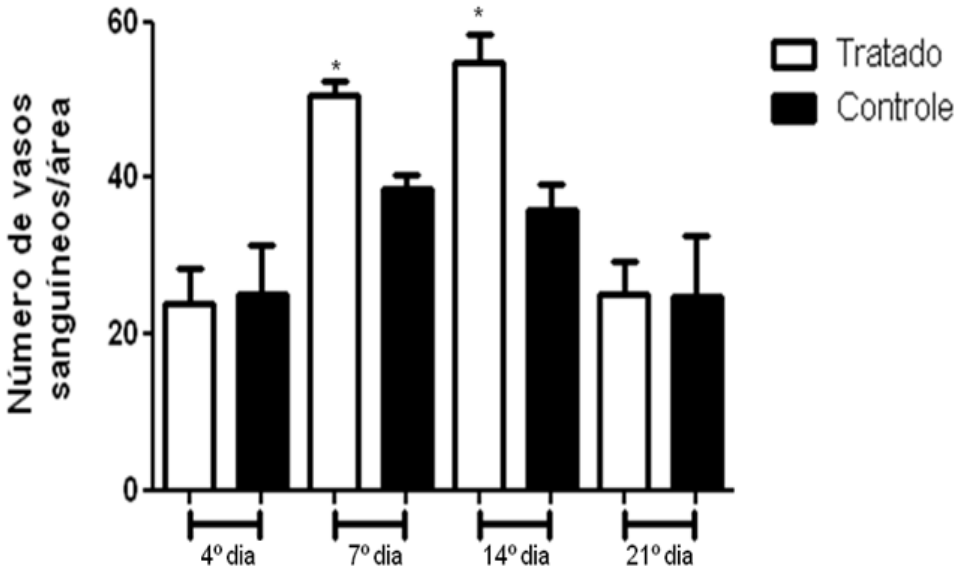

Figura 1. Valores médios e erros-padrão do número de vasos sanguíneos para os lados controle e tratado com extrato hidroalcoólico a 5% de angico durante 4, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório. Teste t de Student.

Morfologicamente observou-se no 4º dia de PO no GT, vasos sanguíneos com lumens variados, crosta fibrino leucocitária com concentrações elevadas de neutrófilos e presença de fibroblastos e colágeno. No GC os vasos sanguíneos encontravam-se com lumens reduzidos e em menor concentração. Os fibroblastos em sua maioria estavam fusiformes e o colágeno mostrou-se reduzido.

No 7º dia de PO os vasos apresentavam-se mais dilatados, presença de crosta fibrino leucocitária e alta concentração de fibroblastos no GT. No GC os vasos sanguíneos apresentavam-se delgados e as fibras colágenas delgadas e curtas.

No 14º dia de PO os vasos apresentavam-se numerosos, crosta fibrino leucocitária reduzida no GT. No GC observou-se numerosos vasos sanguíneos com lumens reduzidos e concentrações menores de fibroblastos.

No 21º dia de PO os vasos mostravam-se em menor concentração com lumens reduzidos, epitélio quase reconstituído, concentração moderada de fibroblastos e colágeno mais desenvolvido no GT. No GC os vasos sanguíneos apresentavam-se mais reduzidos com lumens de vários tamanhos. O epitélio de revestimento encontrava-se todo reconstruído, e fibroblasto em menor quantidade e o colágeno mostrou-se mais espesso.

Na fase inicial do processo da cicatrização de feridas, ocorrem alterações celulares e microcirculatórias, apresentando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, edema e migração de neutrófilos e monócitos[21,23]. Segundo Khanna *et al.*[6], a angiogênese desempenha um papel central na cicatrização de feridas. Entre muitos fatores de crescimento conhecidos (EGF, alfa-TGF, PDGF (plaquetas), FGF, VEGF (vasculogênese) e beta-TGF), o fator de

crescimento vascular endotelial (VEGF) possui papel importante, na estimulação da angiogênese em feridas[6,24], induz a migração e proliferação das células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular[25] coerente com a suposta capacidade para promover a angiogênese[6].

Pesquisas desenvolvidas com óleo de copaíba em diferentes modelos experimentais de cicatrização em ratos têm demonstrado ser este capaz de aumentar a neoangiogênese na segunda fase cicatricial. Brito[14] e Estevão[15] relatam a evidência de vasos sanguíneos mais numerosos e dilatados no 7º dia pós operatório em feridas cutâneas, corroborando com os achados desta pesquisa. Parente[3] em estudo sobre atividade angiogênese do extrato etanólico e frações diclorometano e hexânica das flores de *Calendula officinalis* L. em feridas cutâneas em ratos demonstrou ter efeito positivo na angiogênese favorecendo a cicatrização, corroborando com os nossos achados.

Lima *et al.*[4] trabalhou com Elixir Sanativo®, composto constituído a partir da associação dos extratos hidroalcoólicos de espécies vegetais, entre as quais, na sua composição está presente o angico. Relatou uma significativa propriedade cicatrizante com o mais próximo possível dos padrões de normalidade.

Na cromatografia de camada delgada realizada para pesquisa de metabólitos no extrato hidroalcoólico de Angico do nosso estudo, foram identificados os seguintes constituintes: flavonóides (glicosídeos quercetinicos), saponinas (saponosídos), triterpenos e esteróides mostravam-se fracamente positivos, açúcares redutores, leucoantocianidinas, apresentaram-se moderadamente positivos e as proantocianidinas condensadas foram fortemente positivos. Já os alcalóides, ácido gálico e ácido elágico não foram identificados (Tabela 1).

Segundo Agra[26] o angico é quimicamente constituído por alcalóides indólico (oxido de N, N-dimetiltriptamina), esteróides (palmitato de δ-sitosterol e δ-sitosterol), flavonóides (3,3',4',7,8-pentahidroflavona), triterpenóides (lupenona e lupeol), derivados fenólicos (3,4,5-dimethoxidalbergiona, dalbergiona e kuhlmannia). Contêm nas entrecascas tanino[2], também conhecidos por proantocianidinas. As proantocianidinas e os demais taninos são conhecidos por facilitar a cicatrização de feridas[5,6]. Khanna et al.[6], estudaram aplicação tópica de extrato de semente de uva com proantocianidina no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos, e relataram ter este efeito específico na indução e regulação alta na transcrição de gene angiogênico, sugerindo ação sobre o fator de crescimento endotelial vascular. Neste estudo foram identificados grande quantidade de proantocianidinas no extrato hidroalcoolico a 5% (etanol 7:3 H_2O) da casca e entrecasca do angico (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*).

Tabela 1: Metabólitos encontrados na cascas e entrecascas do caule do angico.

Metabólitos	*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*
Açúcares redutores	++
Alcalóides	-
Flavonóides (glicosídeos quercetinicos)	+
Ácido gálico	-
Ácido elágico	-
Proantocianidinas condensadas	+++
Leucoantocianidinas	++
Saponinas (saponosídos)	+
Triterpenos e Esteróides	+

Legenda: + = fracamente positivo; ++ = moderadamente positivo;
+++ = fortemente positivo; - = negativo

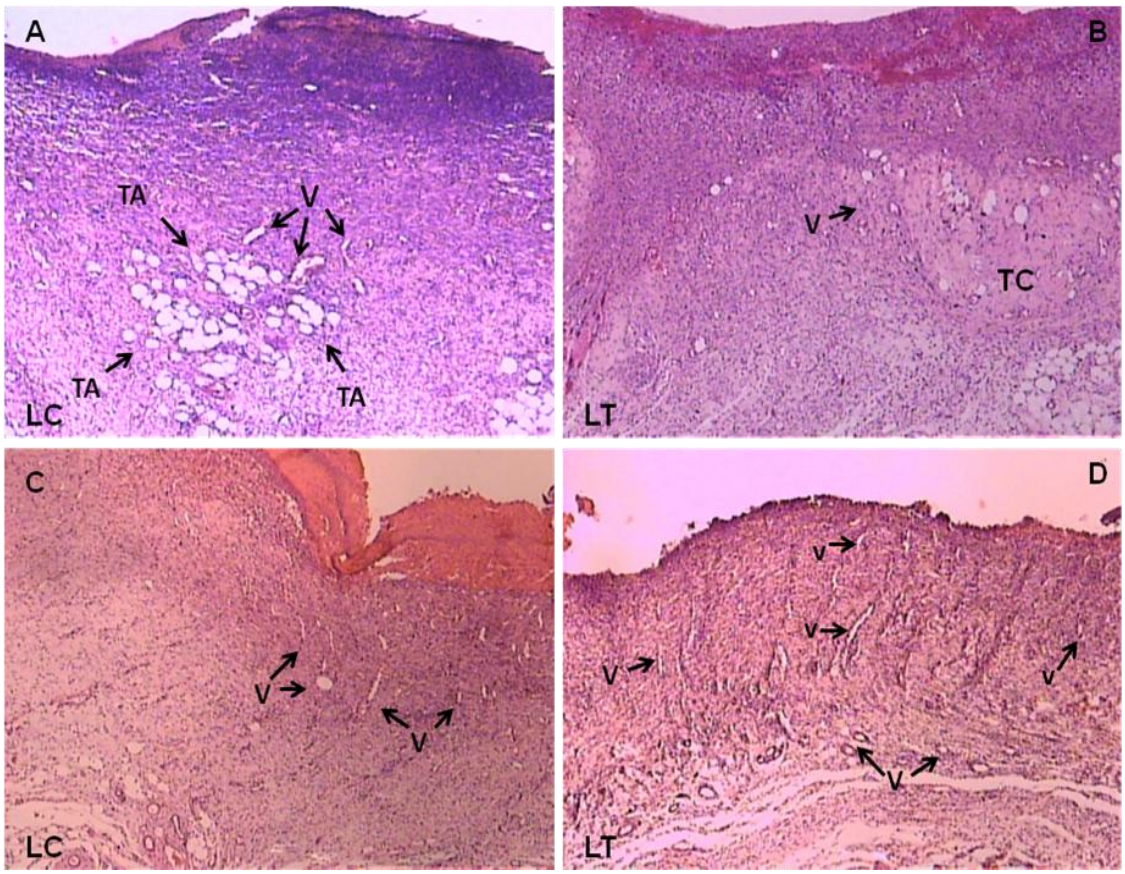

Figura 2. Fotomicrografias de fragmentos de pele dos ratos Wistar aos 7 (A e B) e 14 (C e D) dias de pós-operatório. Nos lados tratados (LT) a presença de vasos sanguíneos (v) e nos lados controles (LC) também com vasos sanguíneos (v), porém, em menor numeroso em comparação com os observados nas figuras dos lados tratados (LT). Na foto (A) tecido adiposo (TA); foto (B) tecido conjuntivo (TC) e na foto (D) do lado tratado (LT) observam-se numerosos vasos sanguíneos perpendicularmente. Coloração H.E. Aumento: ± 40x.

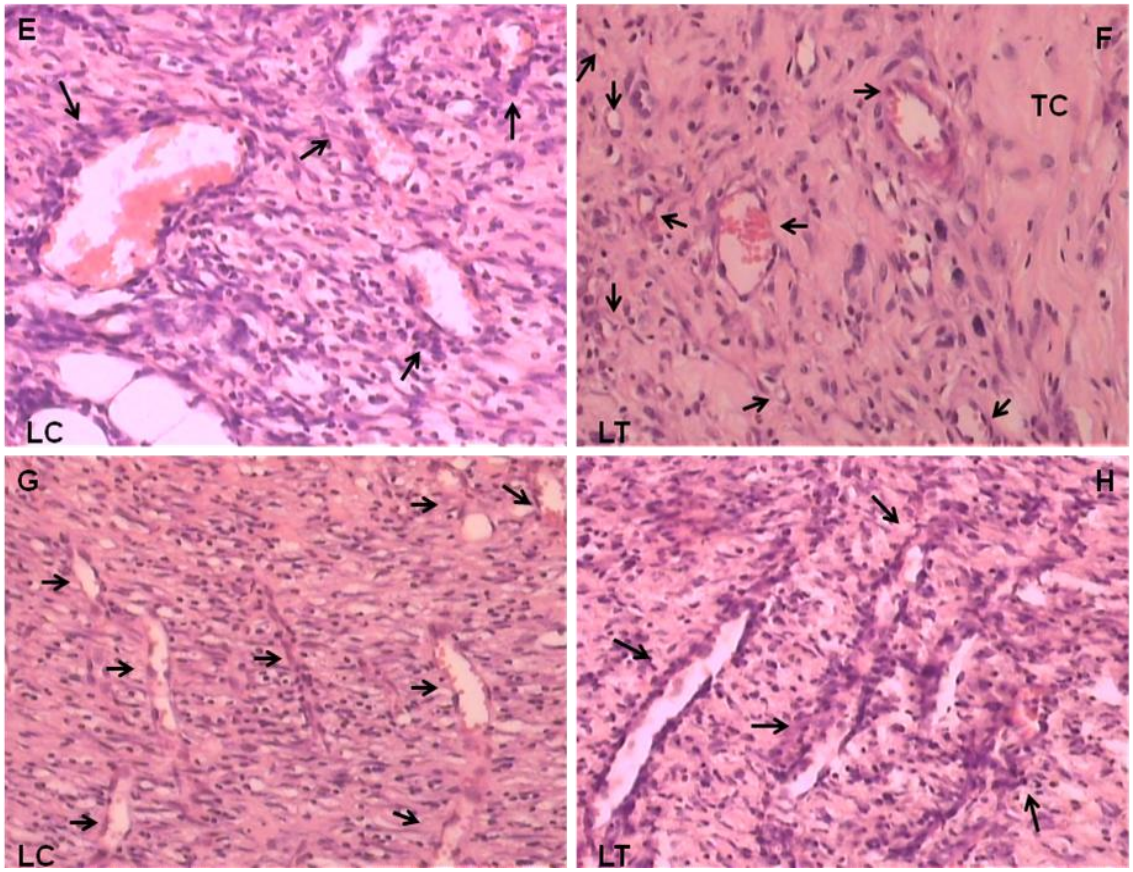

Figura 3. Fotomicrografias em maior aumento de fragmentos de pele dos ratos Wistar aos 7(E e F) e 14(G e H) dias de pós-operatório. Na foto (E) do lado tratado (LC) vasos sanguíneos (➞) com lumens bem desenvolvidos. Na foto (F) do lado tratado (LT) com área de tecido conjuntivo com o colágeno evoluído (TC) e vasos sanguíneos (➞). Foto (G) no lado controle (LC) com fibras de colágenas delgadas e curtas, alguns vasos sanguíneos (➞) com lumens desenvolvidos e outros com lumens reduzidos. Foto (H) no lado tratado (LT) vasos sanguíneos (➞). Coloração H.E. Aumento: ± 200x.

Conclusão

O extrato hidroalcoólico a 5% (etanol 7:3 H_2O) da casca e entrecasca do angico (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) mostrou-se eficiente no aumento da neoangiogênese em feridas cutâneos de ratos.

Agradecimentos:
Sociedade Nordestina de Ecologia, Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Piauí.

Referências

1. Sampaio PTB, Copaíba. In: Clay W, Sampaio PT, Clement CR. Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização. Manaus: INPA. 2000;207-15.

2. Paes JB, Diniz CEF, Marinho IV, Lima CR. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro. Cerne, Lavras 2006;12(3)232-38.

3. Cordeiro S, Gamarra C, Gamarra G, Lima M, Gallindo F. Recife: Centro Nordestino de Informações sobre Plantas - CNIP; Associação Plantas do Nordeste - APNE, Plantas Úteis do Nordeste do Brasil. 2003:91-3.

4. Lima CR, Costa-Silva JH, Lyra MMA, Araújo AV, Arruda VM, Dimech GS, Baratella-Evêncio L, Fraga MCCA, Lafayette SSL, Wanderley AG. Atividade Cicatrizante e Estudo Toxicológico Pré-Clínico do Fitoterápico Sanativo®. Acta Farm. Bonaerense. 2006;25(4):544-9.

5. Laks PE. Chemistry of bark, In *Wood and Cellulosic Chemistry*, Hon, D.N.S., Shiraishi, N. New York: Publishing house Marcel Dekker; 1991.

6. Khanna S, Venojarvi M, Roy S, Sharma N, Trikha P, Bagchi D, Bagchi M, Sen CK. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. Free Radic Biol Med. 2002;33(8)1089-96.

7. Palmeira JD, Ferreira SB, Souza JH, Almeida JM, Figueiredo MC, Pequeno AS, Arruda TA, Antunes RMP, Catão RMR. Avaliacao da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentracao inibitoria minima (CIM) de extratos hidroalcoolico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus.* RBAC. 2010;42(1):33-7.

8. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Revista brasileira de ciências farmacêuticas. 2005;41(1):27-51.

9. NG MFY. The role of mast cells in wound healing. International wound journal. 2010;7(1):55-61.

10. Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2003;78(4):1-16.

11. Liapakis I, Anagnostoulis S, Karayiannakis A, Korkolis D, Lambropoulou M, Matarasso A, Simopoulos C. Burn wound angiogenesis is increased by exogenously administered recombinant leptin in rats. Acta Cir Bras. 2008;23(2):118-24.

12. Corsi RCC, Corsi PR, Pirana S, Muraco FAE, Jorge D. Wound healing - A review. Revista Brasileira de Cirurgia. 1994;84(1):17-24.

13. Parente LML, Andrade MA, Brito LAB, Moura VMBD, Miguel MP, Lino-Júnior RS, Tresvenzol LFM, Paula JR, Paulo NM. Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. Acta Cir Bras. 2011;26(1):19-24.

14. Brito, NMB, Simöes MJ, Gomes PO, Pessoa AF, Melo MCF. Aspectos microscópicos da cicatrizaçäo de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. Revista Paraense de Medicina. 1999;13(1):12-17.

15. Estevão LRM, Medeiros JP, Scognomillo-Zsabó MVR, Baratella-Evêncio L, Guimarães EC, Câmara CAG, Evêncio-Neto J. Neoangiogênese de retalhos cutáneos em ratos tratados com óleo de copaíba. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2009;44(4):406-12.

16. Pansera MR, Iob GA, Atti-Santos AC, Rossato M, Atti-Serafini L, Cassel E. Extraction of Tannin by *Acacia mearnsii* with Supercritical Fluids. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2004;47(6):995-8.

17. Ferrari RA, Colussi F, Ayub RA. Characterization of by-products of passion fruit industrialization utilization of seeds. Rev. Bras. Frutic. 2004;26(1):101-2.

18. Lopes ES. Revisões de Conjunto. Aplicações da Cromatografia em Camada Fina à Análise Farmacêutica. Revista portuguesa farmacêutica. 1965;15:105-27.

19. Markham KR. Techiniques of flavonoid identification. London: Acad. Press; 1982.

20. Souza MD, Peres Filho O, Dorval A. Efeito de extratos naturais de folhas vegetais em *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer, (Agaricales: Agaricaceae). Ambiência. 2011;7(3):461-71.

21. Mondolin M, Bevilacqua RG. Cicatrização das feridas. Síntese das aquisições recentes. Rev. Bras. Clin. Terap. 1985;14(6):208-13.

22. Castelo Branco Neto MLC, Ribas Filho JM, Malafaia O, Oliveira Filho MA, Czeczko NG, Aoki S, Cunha R, Fonseca M, Aguiar LRF. Avaliação do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) no processo de cicatrização de feridas de pele em ratos. Acta Cirúrgica Brasileira. 2006;21(sup2):17-22.

23. Simões MJ, Cabral ACV, Boyaciyan K, Kulay Júnior L, Sasso WS. Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. Ver. Paul. Med. 1986;104(3):132-5.

24. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am. J. Pathol.* 1998;152:1445-52.

25. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, Dói K, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, Yamashita J, Chun TH, Masatsugu K, Becker AE, Nakao K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis [in process citation]. *Circulalion.* 1998;98:2108-16.

26. Agra MF. - Plantas da medicina popular dos cariris velhos (Paraíba – Brasil): espécies mais comuns. João Pessoa: União, 1996.

Fibrogênese e revestimento epitelial em feridas cutâneas em ratos tratados com extrato hidroalcoólico de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*

Wagner Soares Pessoa & Joaquim Evêncio Neto

Resumo

OBJETIVO: Avaliar a fibrogênese e o revestimento epitelial de feridas cutâneas em ratos tratados com extrato hidroalcoólico (E. HA) a 5% da casca e entrecasca do angico (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*).

MÉTODOS: Foram utilizados 20 ratos machos, wistar, submetidos a cirurgias de pele e tela subcutânea na região torácica. Imediatamente após a cirurgia cada ferida recebeu tratamento uma vez por dia durante 21 dias de acordo com o grupo experimental: GT (grupo tratado) feridas do antímero esquerdo, tratadas com extrato hidroalcoólico a 5% da casca e entrecasca do angico, e GC (grupo controle) feridas do antímero direito, tratadas com solução de cloreto de sódio a 0,9%. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatros grupos de cinco animais, que foram ortotanasiados aos 4, 7, 14 e 21 dias de pós-operatórios. Foram coletados fragmentos para análises morfológicas e morfométrica de fibroblastos e grau de contração epitelial.

RESULTADOS: A análise de variância dos resultados mostrou aumento significativo no número de fibroblastos (grupo tratado $p< 0,01$ e grupo controle $p< 0,05$) no sétimo dia de pós-operatório (PO). Os achados microscópicos demonstraram que os ratos do grupo controle apresentaram, nas lesões, epitelização mais evoluídas do que os ratos do grupo tratado no 14º dia de PO.

CONCLUSÃO: O extrato hidroalcoólico a 5% aumentou o número de fibroblasto aos sete dias de pós-operatório e retardou porém retardou a reepitelização das feridas cutâneas dos ratos.

Termos para indexação: cicatrização, fitoterapia, fibroblastos

Fibrogenesis and epithelial revetment of skin wounds in rats treated with hydroalcoholic extract of of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*

Abstract

OBJECTIVE: To value the fibrogenesis and epithelial revetment of cutaneous wounds subdermal in rats treated with hydroalcoholic extract to 5% of bark and angico`s liber (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*).

METHODS: 20 male Wistar rats were used, from which animal it was removed two fragments of skin, one in the right and the other in the left side of the thoracic region.

The wounds of the control group, localized in the right antimer, were treated with solution of sodium chloride 0.9%, the wounds of the treated group, left antimer, were treated with hydroalcoholic extract to 5% of bark and angico`s liber at 4, 7, 14 and 21 days after-surgical The animals were divided eventually in four groups of five animals, which were ortotanasiados at 4, 7, 14 and 21 days after-surgical, fragments were collected for morphological and morphometrical analysis of fibroblasts in the grade of epithelial contraction.

RESULTS: The results of analysis of variance showed a significant increase in the number of fibroblasts (treated group $p < 0.01$ and control group $p < 0.05$) in the 7^{th} of day after-surgical. Microscopic findings showed that control rats showed, epithelialization more evolved than the rats in the treated group in the 14^{th} of day after-surgical.

CONCLUSION: The hydroalcoholic extract 5% proves efficient in increasing the fibroblasts at 7 days postoperatively but delayed the reepithelialization of skin wounds in rats.

Index terms: healing, phytotherapy, fibroblasts

Introdução

O angico é uma árvore muito utilizada em medicamentos populares[1]. Lima *et al.*[2] relata que a entrecasca é a parte mais empregada para esses fins. Segundo este mesmo autor, o Elixir Sanativo® é um composto constituído a partir da associação dos extratos hidroalcoólicos de espécies vegetais, entre as quais, na sua composição está presente angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan) e apresenta propriedades hemostática, depurativa e cicatrizante.

A eficácia do processo de cicatrização dos fitoterápicos está relacionada a ação de flavonóides[3,4] e taninos[5,6]. Há várias espécies de plantas produtoras de taninos, no Nordeste do Brasil, utilizam o angico como uma das fontes para o uso do tanino[7].

Lima *et al.*[2] estudou a atividade cicatrizante e a toxicologia pré-clínica com o Elixir Sanativo® e observou uma significativa propriedade cicatrizante em tecidos epiteliais lesionados.

A cicatrização consiste em uma serie de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido. Em condições normais, o processo cicatricial segue um padrão, podendo ser dividido em três fases específicas: inflamatória, fase fibroblástica e de deposição de matriz extracelular e fase de remodelamento[7]. As características assumidas pela lesão durante sua evolução resultam da sucessão ou sobreposição de eventos celulares e tissulares provocados pela ativação celular por mediadores químicos[8,9].

A ruptura do vaso sanguíneo leva a extravasamento dos constituintes do sangue. Substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases são liberadas[10]. Fatores subendoteliais são expostos a uma superfície em que as plaquetas se aderem e agregam formando um coágulo, que serve para auxiliar coaptar as bordas lesadas, mas também para cruzar a fibronectina e na formação de uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida[10,11]. Sobre esse suporte os fibroblastos e o endotélio neoformado edificam o tecido de granulação[11]. A angiogênese é um mecanismo biológico de formação de novos capilares. Ela envolve a ativação, migração, e proliferação de células endoteliais a partir de vasos pré-existentes[12]. Fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio[10]. O estágio de remodelação da matriz extracelular é um período de consolidação, reforço e remodelação da ferida. O reforço inicial é a deposição, agrupamento e remodelação do colágeno, e é responsável pelo aumento da força de tensão e diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema[10,11]. Nessa fase ocorre uma diminuição progressiva dos vasos de neoformação, bem como dos elementos celulares, inclusive fibroblastos. O epitélio monoestratificado transforma-se em pluriestratificado[11].

Estudos feitos por Uzunian[13] e Simões *et al.*[14] em processo de reparação de feridas de pele de ratos albinos sem qualquer tratamento demonstraram aumento na quantidade de fibroblastos com grande quantidade de vesículas intracitoplasmáticas contendo fibras colágenas aos sete dias de pós-operatório.

Tomando por base os resultados positivos obtidos onde algumas atividades medicinais são atribuídas ao angico, sendo a sua entrecasca parte mais empregada para esses fins, e visando ao estudo de uma preparação hidroalcoólica em concentração suficiente para favorecer o processo de reparação tecidual, este trabalho visa avaliar morfológica e

morfometricamente os fibroblastos e o revestimento epitelial de feridas cutâneos em ratos tratados com extrato hidroalcoólico a 5% (etanol 7:3 H_2O) da casca e entrecasca do angico.

Materiais e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Biotério do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Este trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso Animal da UFRPE. Após a ortotanásia, os animais foram preparados, segundo as exigências dos princípios éticos para trabalhos experimentais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), São Paulo, Brasil, 1991.

O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso (DIC), composto pelos tratamentos extrato hidroalcoólico a 5% e solução salina, avaliados nos períodos pós-operatórios de 4, 7, 14 e 21 dias. Foram utilizados 5 repetições para cada recurso farmacológico, sendo considerado cada animal uma unidade experimental.

Casca e entrecasca de angico (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) foram coletadas, no período da manhã, em 02 de novembro de 2009, no município de Pombos, Pernambuco. A planta foi identificada por comparação de um exemplar já identificado e depositado no Herbário Sérgio Tavares do Departamento de Ciência Florestal da UFRPE sob o número 17242.

O extrato hidroalcoólico foi preparada a partir do tronco de uma árvore adulta no Departamento de Farmácia no laboratório de Farmacognosia da UFPE. Inicialmente, este material foi submetido a processo de pulverização em moinho de faca. O pó obtido foi pesado e, junto com 500 mL de metanol, foram adicionados ao aparelho de Soxhlet[15]. Após 12 horas a mistura foi retirada do Soxhlet, filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida[16] com temperatura entre 40 ºC e 45 ºC para obtenção do extrato seco de *A. colubrina* var. *cebil*. Uma alíquota equivalente a 5g deste extrato foi diluída em etanol a 70%, obtendo-se a tintura hidroalcoólica a 5% (etanol 7:3 H_2O). Esta foi mantida em recipiente de vidro âmbar em temperatura ambiente até a realização do experimento.

Preparou-se infusões metanólicas (15% p/v) usando cascas e entrecascas do caule do angico *(Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschlna). Alíquotas do extrato (15 μL) foram comparativamente analisados por cromatografia em camada delgada (placas pontas de gel de sílica MercK. Art. 105553), desenvolvendo-se os cromatogramas com fases móveis de polaridades diversas e seus componentes revelados segundo a classe de metabólitos a investigar[17,18]. Pesquisou-se a presença de polifenóis (cumarinas, antraquinonas, derivados cinâmicos, fenilpropanoglicosídeos, flavonóides, proantocianidinas e taninos gálicos),

alcalóides e terpenóides (iridóides, mono e sesquiterpenos, triterpenos, esteróides e saponósidos).

Foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), Wistar, machos, com 120 dias de idade e peso médio de 350 gramas, provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os ratos foram agrupados aleatoriamente em quatros grupos de cinco animais e mantidos em caixas individuais, em ambiente com temperatura de 23 a 25^{o} C e ciclo claro/escuro controlados de 12 em 12 horas. Receberam ração comercial para roedores (Presence®, Purina) e água à vontade.

Após anestesiados com anestesia dissociativa com xilazina na dose de 3mg kg^{-1} e cetamina, 10 mg kg^{-1}, por via intramuscular, segundo Estevão[19], os animais foram posicionados em decúbito ventral e submetidos a tricotomia bilateral e antissepsia com clorexidina tópica alcoólica a 0,5%. A área foi demarcada utilizando um demarcador metálico cilíndrico com 1,3 cm de diâmetro. Com lâminas de bisturi número15 e tesoura de ponta romba foram realizadas incisões de pele e tela subcutânea no antímero direito e esquerdo da região torácica, separadas por uma distância mínima de 2 cm. O tecido foi dissecado e retirado ficando exposta a fáscia muscular adjacente.

Cada falha cutânea recebeu o tratamento imediatamente após a excisão cirúrgica e seguindo a metodologia estabelecida: Grupo controle (GC) – Feridas localizadas no antímero direito, recebendo uma aplicação tópica diária durante 21 dias de solução salina a 0,9%; Grupo tratado (GT) – Feridas localizadas no antímero esquerdo, recebendo uma aplicação tópica diária de extrato hidroalcoólico a 5% (etanol 7:3 H_2O).

No dia da cirurgia e nos dias 4, 7, 14 e 21 de pós-operatório, as feridas de cada grupo foram mensuradas com auxílio de um paquímetro digital milimetrado (King Tools). Para o cálculo das áreas das feridas controle e tratado foram observados os diâmetros maiores e menores. A partir destes dados a área da ferida foi calculada, utilizando-se a equação matemática: $A = \pi.R.r$, onde A representa a área , R o raio maior e r o raio menor da ferida.

O cálculo do grau médio de contração foi expresso em percentual, utilizando-se a equação matemática: $100 \times (Ao - Ai) \div Ao$, onde Ao é a área inicial da ferida (dia 0) e Ai é a área da ferida no 4º, 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório.

Nos tempos 4, 7, 14 e 21 dias pós-operatório os animais dos respectivos grupos foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano e ortotanasiados para coleta do fragmento. Cada ferida cirúrgica foi dissecada com margem de 0,5 cm de pele íntegra em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do animal. Os fragmentos foram fixados em

formol a 10% por 48 horas e transferidos para álcool a 70%. Em seguida, foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol, processados para inclusão em parafina pelos métodos de rotina, cortados em micrótomo tipo Minot ajustado para 5 μm e colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer. Após secagem, os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina (HE) para as análises morfológica e morfométrica do tecido. O material foi analisado e fotografado em Microscópio Biológico Trinocular NIKON 50i acoplado a um sistema de captura de imagem microscópica.

Para cada região do retalho cutâneo foram obtidas seis imagens, que foram analisadas em um software analisador de imagens (Imagelab 2000), pelo qual foi possível quantificar o número de fibroblastos. Os dados obtidos para a variável de número de vasos sanguíneos e contração da ferida foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, $p<0,05$ de probabilidade. As análises foram feitas usando o software Assistat, versão 7.6 beta[20].

Resultados

Cromatografia

Na cromatografia de camada delgada realizada para pesquisa de metabólitos na tintura hidroalcoólica de Angico, foram identificados os seguintes constituintes: flavonóides (glicosídeos quercetinicos), saponinas (saponosídos), triterpenos e esteróides mostravam-se fracamente positivos, açúcares redutores, leucoantocianidinas, apresentaram-se moderadamente positivos e as proantocianidinas condensadas foram fortemente positivo. Já os alcalóides, ácido gálico e ácido elágico não foram identificados (Tabela 1).

Tabela 1: Metabólitos encontrados na cascas e entrecascas do caule do angico.

Metabólitos	*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*
Açúcares redutores	++
Alcalóides	-
Flavonóides (glicosídeos quercetinicos)	+
Ácido gálico	-
Ácido elágico	-
Proantocianidinas condensadas	+++
Leucoantocianidinas	++
Saponinas (saponosídos)	+
Triterpenos e Esteróides	+

Legenda: + = fracamente positivo; ++ = moderadamente positivo;
+++ = fortemente positivo; - = negativo

Avaliação microscópica

Os resultados histológicos comparados das feridas cutâneas, entre grupo tratado (GT) e grupo controle (GC) aos 7 dias de pós-operatório (PO) estão demonstrados na figura 1, na qual observa-se aumento significante dos fibroblastos no GT em relação ao GC. Na figura 3 pode ser observada uma formação recente de colágeno com maior intensidade no GT. Aos 14 dias de PO, não há diferença significativa de fibroblastos e fibras colágenas no GT. Já o revestimento epitelial demonstrava mais evoluído no GC. No GT a epitelização não ocorreu nas feridas em dois ratos, porém, nos outros animais apresentou-se epitélio somente nas bordas das feridas. Aos 21 dias de PO, os fibroblastos e as fibras colágenas e a reepitelização também não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

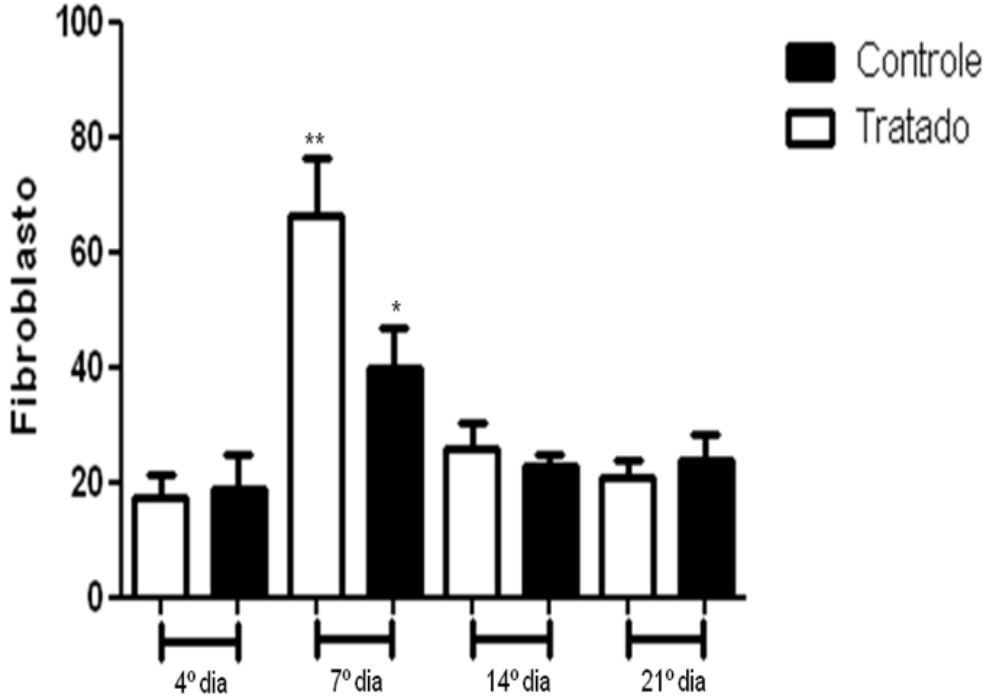

Figura 1. Valores médios e erros-padrão do número de fibroblasto para os lados tratado e controle com extrato hidroalcoólico de angico a 5% durante 4, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório. Teste t de Student.

Na análise histológica foi observado aumento progressivo do número de capilares nos dias 4, 7, 14 de PO. O GC apresentou no 4º dia de PO, mais capilares sanguíneos neoformados congestos e dilatados em relação ao GT. No 21º dia de PO ocorreu diminuição no número de vasos sanguíneos. Neste experimento não foi identificado diferença nos neutrófilos entre os grupos GT e GC, entretanto, verificou-se diminuição progressiva dos neutrófilos nos dias 7, 14 e 21 de PO.

Grau de contração

Na figura 2, observa-se que aos 4º, 7º, 14º e 21º dias de pós-operatório, as feridas dos grupos GC e GT não apresentaram diferenças significantes do grau de contração.

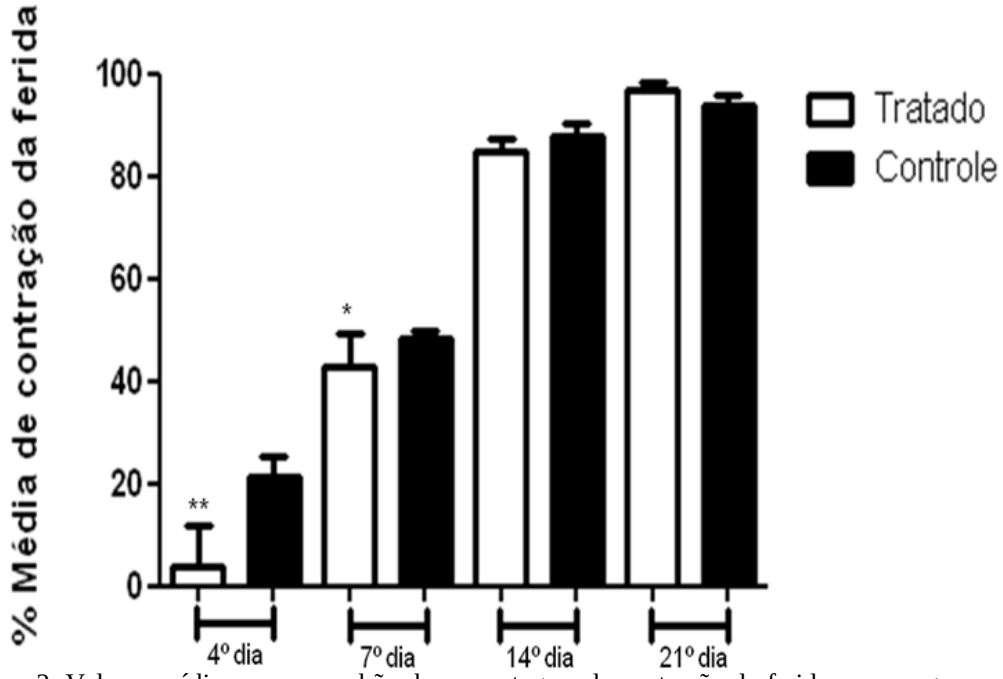

Figura 2. Valores médios e erros-padrão da percentagem da contração da ferida para os grupos controle e tratado com aos 4, 7, 14 e 21 dias pós-operatório. Teste t de Student.

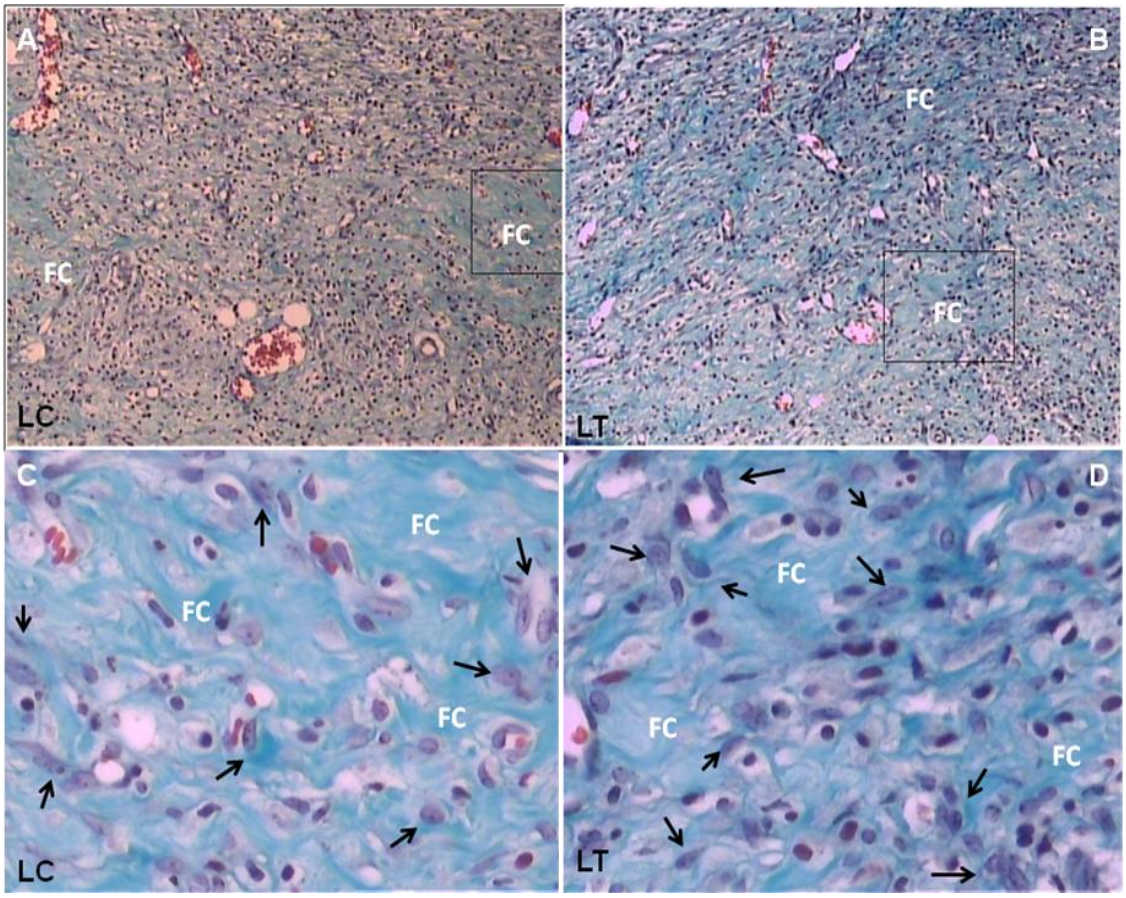

Figura 3. Fotomicrografias de fragmentos de pele de rato wistar aos 7 dias de pós-operatório do lado controle (LC) e lado tratado (LT). Nas fotos A e B formações de fibras colágenas (FC), aumento: ± 100x. Nas fotos C e D, destaque dos retângulos das fotos A e B, fibroblastos (setas), aumento: ± 400x.

Discussão

A cicatrização das feridas que envolvem fenômenos bioquímicos e fisiológicos, divide-se em três séries de eventos: inflamação, a fase fibroblástica e de deposição de matriz extracelular, e remodelação da matriz. Substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases são liberadas[8]. A formação do coágulo serve para coaptar as bordas das feridas, como também para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida. Além de inúmeros mediadores químicos a fase da inflamação depende das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos[10]. A fase da proliferação inclui a fibroplasia e formação da matriz, que é importante na formação do tecido de granulação. A angiogênese é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização. A síntese do colágeno pelos fibroblastos começa no quarto ou quinto dia. À medida que colágeno vai se tornando suficiente o número de fibroblastos na ferida diminui, marcando o fim do estágio de reparação[10]. Na fase de remodelamento o tecido de granulação vai sendo

enriquecido com mais fibras de colágeno e começa a adquirir a aparência de massa fibrótica, característica da cicatriz. Com a evolução do processo, acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células desaparecem (observa-se a apoptose de fibroblastos e células endoteliais). O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno é feita a princípio de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido[8].

Baseado nas experiências populares o angico é uma árvore muito utilizada como agente cicatrizante para feridas cutâneas sendo, a entrecasca, a parte mais empregada para esses fins[1,2].

Os resultados favoráveis dos fitoterápicos no processo de cicatrização estão relacionados, principalmente, aos flavonóides[4] e taninos[5,6]. Segundo Paes *et al.*[7], o angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan var. cebil) é uma planta onde são encontrados taninos condensados. Os taninos condensados, conhecidos por proantocianidinas, são conhecidos por facilitar a cicatrização de feridas[5,6].

Teves *et al.*[21] descreveram os fatores humorais liberados após uma lesão tecidual, bem como todos os componentes celulares envolvidos no processo de reparação tecidual. Segundo estes autores o fibroblasto tem ação reguladora na cicatrização devido à função de síntese e reabsorção do colágeno.

Esta pesquisa revelou no 4º dia a presença de numerosos neutrófilos e também macrófagos e alguns fibroblasto no local da lesão, o que corrobora como os achados de Simões *et al.*[22] que identificaram no 3º dia a presença destas células.

Segundo Simões *et al.*[22], a solução de continuidade formada pela retirada do fragmento da pele é inicialmente preenchida por sangue coagulado, fibrina e exsudato inflamatório. Por volta do quarto dia após a lesão, sobre esse suporte, a fibroplasia tem inicio pela formação de tecido de granulação, sendo constituído por colágeno tipo I e II, fibronectina e ácido hialurônico contendo macrófagos, fibroblasto e vasos recém-formados[8]. O fenômeno da angiogênese é essencial para a dispersão do oxigênio para o tecido isquêmico ou neoformado na cicatrização[10,23]. Neste experimento foi observado aumento progressivo no número de capilares nos dias 4, 7, 14. A lesão inicial e a coagulação, mediada por plaquetas para a formação do trombo, liberam fatores (serotonina, histamina, bradicinina, prostaglandinas, neurotransmissores e outros) que promovem a liberação e migração dos leucócitos, macrófagos, células mesenquimais e fibroblastos para a área afetada[22].

Sanchez Neto *et al.*[23], estudaram os aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas em ratos com e sem tratamento com solução de papaína. Avaliaram os resultados aos 3, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório. Não encontraram diferenças significantes entre os dois grupos aos 3 dias de pós-operatório, porém, após este período observaram que o grupo tratado com papaína apresentava maior quantidade de fibroblastos e fibras colágenas. Nossos resultados divergem dos relatos desses autores, uma vez que aos 7 dias de pós-operatório a diferença entre GC e GT foi significativa na contagem fibroblástica onde as fibras colágenas mostraram-se mais desenvolvidas no GT.

Os achados deste experimento vão de encontro às pesquisas feita por Simões *et al.*[14], que observaram que a quantidade de fibroblastos era maior aos 7 dias de pós-operatório. Os polifibroblastos tiveram efeitos significativos positivos, já não ocorrendo o mesmo com a reepitelização no GT. Neste experimento, aos 7 dias as feridas cutâneas dos animais do GC apresentaram revestimento epitelial mais precoce que as dos animais do GT. No 14º dia de PO não apresentaram diferenças significativas nos fibroblastos no GT em relação ao GC. Segundo Gabbiani[24] ocorre exsudação inflamatória, neoformação vascular, proliferação celular, migração celular e epitelização a partir das bordas no processo de cicatrização das feridas abertas, após as lesões. Os ratos do GC mostraram as lesões com epitelização mais evoluída aos 14 dias de PO, enquanto no GT esta epitelização não ocorreu nas feridas em dois ratos. Nos demais animais dos grupos GT e GC apresentaram epitélio somente nas bordas das feridas. Simões *et al.*[14], observaram que aos 21 dias a concentração de fibroblastos foi menor e os feixes de colágenos era mais maduras e organizados. Neste experimento na avaliação histométrica não apresentaram médias significantes dos fibroblastos do GT em relação GC nos 21 dias de PO. No entanto na avaliação morfológica das fibras colágenas podemos observar no GT uma discreta organização e evolução das fibras colágenas em relação ao GC. Contudo, todo revestimento epitelial dos animais do GC já estavam completado, enquanto que, no GT, um animal não apresentou revestimento epitelial completo. Tais fatos semelhantes foram obtidos em nossos achados de uso tópico com outros fitoterápicos, como aroeira[25] e copaíba[19,26] ao contrário da utilização de papaína[23] e rosa mosqueta[27] que favoreceram a reepitelização.

Na avaliação morfométrica do grau de contração das feridas observou-se que as feridas dos grupos GT e GC não apresentaram diferenças significantes aos 4º, 7º, 14º e 21º de pós-operatório.

Conclusão:

O Extrato hidroalcoólico a 5% (etanol 7:3 H_2O) aumentou o número de fibroblastos aos 7 dias de pós-operatório e retardou a reepitelização das feridas da pele dos ratos.

Agradecimentos:
Sociedade Nordestina de Ecologia, Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Piauí.

Referências

1. Monteiro JM, Almeida CFCBR, Albuquerque UP, Lucena RFP, Florentino ATN, Oliveira RLC. Use and traditional management of *Anadenanthera colubrine* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 2006;2(6).

2. Lima CR, Costa-Silva JH, Lyra MMA, Araújo AV, Arruda VM, Dimech GS, Baratella-Evêncio L, Fraga MCCA, Lafayette SSL, Wanderley AG. Atividade Cicatrizante e Estudo Toxicológico Pré-Clínico do Fitoterápico Sanativo®. Acta Farm. Bonaerense. 2006;25(4):544-9.

3. Pérez-Carreón JI, Cruz-Jimenez G, Licea-Vega JA, Popoca EA, Fazenda SF, Villa-Trevino S. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with Diethynitrosamine. Toxicology in Vitro. 2002;16(3): 253-8.

4. Peruchi CMS, Silva EB, Andrade RA, Franco SL, Ramalho L. Efecto del propóleos en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso de ratones: estudio histológico. Rev Fac Odontol Univ Chile. 2001;19(2):23-34.

5. Laks PE. Chemistry of bark, In *Wood and Cellulosic Chemistry*, Hon, D.N.S., Shiraishi, N. New York: Publishing house Marcel Dekker; 1991.

6. Khanna S, Venojarvi M, Roy S, Sharma N, Trikha P, Bagchi D, Bagchi M, Sen CK. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. Free Radic Biol Med. 2002;33(8)1089-96.

7. Paes JB, Diniz CEF, Marinho IV, Lima CR. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro. Cerne, Lavras 2006;12(3)232-38.

8. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Revista brasileira de ciências farmacêuticas. 2005;41(1):27-51.

9. NG MFY. The role of mast cells in wound healing. International wound journal. 2010;7(1):55-61.

10. Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2003;78(4):1-16.

11. Corsi RCC, Corsi PR, Pirana S, Muraco FAE, Jorge D. Wound healing - A review. Revista Brasileira de Cirurgia. 1994;84(1):17-24.

12. Liapakis I, Anagnostoulis S, Karayiannakis A, Korkolis D, Lambropoulou M, Matarasso A, Simopoulos C. Burn wound angiogenesis is increased by exogenously administered recombinant leptin in rats. Acta Cir Bras. 2008;23(2):118-24.

13. Uzunian A. Electron microscopy of collagen resorption by fibroblasts in wound repair of the albino rat skin. Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol. 1979;12:347-50.

14. Simões MJ, Uzunian A, Sasso WS. Aspectos ultra-estruturais do processo de reparação da pele de ratos albinos. Rev Paul Med. 1985;103:123-6.

15. Pansera MR, Iob GA, Atti-Santos AC, Rossato M, Atti-Serafini L, Cassel E. Extraction of Tannin by *Acacia mearnsii* with Supercritical Fluids. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2004;47(6):995-8.

16. Ferrari RA, Colussi F, Ayub RA. Characterization of by-products of passion fruit industrialization utilization of seeds. Rev. Bras. Frutic. 2004;26(1):101-2.

17. Lopes ES. Revisões de Conjunto. Aplicações da Cromatografia em Camada Fina à Análise Farmacêutica. Revista portuguesa farmacêutica. 1965;15:105-27.

18. Markham KR. Techiniques of flavonoid identification. London: Acad. Press; 1982.

19. Estevão LRM, Medeiros JP, Scognomillo-Zsabó MVR, Baratella-Evêncio L, Guimarães EC, Câmara CAG, Evêncio-Neto J. Neoangiogênese de retalhos cutáneos em ratos tratados com óleo de copaíba. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2009;44,(4):406-12.

20. Souza MD, Peres Filho O, Dorval A. Efeito de extratos naturais de folhas vegetais em *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer, (Agaricales: Agaricaceae). Ambiência. 2011;7(3):461-71.

21. Teves DC, Cabral ACV, Simões MJ, Kulay Jr. L. Biologia da reparação tecidual. J. Bras. Med. 1986;50:39-44.

22. Simões MJ, Cabral ACV, Boyaciyan K, Kulay Jr. L, Sasso WS. Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. Rev Paul Med. 1986;104:132-5.

23. Sanchez- Neto R. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. Acta Cir Bras. 1993;8:18-23.

24. Gabbiani G, Majno G. Dupuytren's contracture: fibroblast contraction ? A ultrastructural study. Am J Pathol. 1972;66:131-8.

25. Castelo Branco Neto MLC, Ribas Filho JM, Malafaia O, Oliveira Filho MA, Czeczko NG, Aoki S, Cunha R, Fonseca M, Aguiar LRF. Avaliação do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) no processo de cicatrização de feridas de pele em ratos. Acta Cirúrgica Brasileira. 2006;21(sup2):17-22.

26 . Brito, NMB, Simöes MJ, Gomes PO, Pessoa AF, Melo MCF. Aspectos microscópicos da cicatrizaçäo de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. Revista Paraense de Medicina. 1999;13(1):12-17.

27. Marchini FB, Martins DMFS, Teves DC, Simões MJS. Efeito do óleo de rosa mosqueta na cicatrização de feridas abertas. Revista paulista de medicina. 1988;106(6):356