



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DAS
SEMENTES DE *Vatairea guianensis* (AUBLET).**

Cléia Tereza Lamarão da Silva

BELÉM – PA
2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DAS
SEMENTES DE *Vatairea guianensis* (Aublet).**

Autora: Cléia Tereza Lamarão da Silva
ORIENTADOR: Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM – PA
2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cleia Tereza Lamarão da Silva

Avaliação biológica dos extratos obtidos das sementes de *Vatairea guianensis* (Aublet).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração Fármacos e Medicamentos

Orientador

Prof^o Dr. José Carlos Tavares Carvalho
Universidade Federal do Amapá

Banca Examinadora

Prof^a Dra. Marta Chagas Monteiro (UFPA)

Prof^oDr. Raimundo Nonato Picanço Souto (UNIFAP)

Aprovado em: 28/03/2011.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido João Milhomem, aos meus lindos filhos Flora, Isabela e João Pedro.

Aos meus pais Antonio Oliveira da Silva e Terezinha Lamarão da Silva, meus irmãos Antonio Carlos, Paulo César e Carla Tarciany.

À minha Avó materna Luzia Nobre Lamarão (93 anos) exemplo de sabedoria e extrema conhecedora dos remédios da floresta.

Ao meu Avô paterno Raimundo Oliveira da Silva (Vô sódico) 96 anos, pelas conversas ricas em sabedoria popular.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida e por me permitir alcançar o desafio de realizar este trabalho;

A minha família, pelo amor incondicional em momentos especiais quando estive ausente;

Ao Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá (IEPA), pela oportunidade para que eu pudesse me dedicar integralmente a este trabalho;

A UNIFAP, pela disponibilidade do Laboratório de Fármacos e sua equipe maravilhosa e companheira, onde foram realizados os experimentos *in vivo*;

A UNIT, Universidade Tiradentes, pelo acolhimento que tive na realização de parte deste trabalho;

Neste universo científico, sou imensamente grata ao Presidente do IEPA, Benedito Rabelo, pela sensibilidade e compreensão com a minha ausência na Farmácia de Fitoterápicos;

Ao meu orientador, Prof Dr. José Carlos Tavares Carvalho, pela confiança em mim depositada, e por insistir na realização deste trabalho, nos momentos de fragilidade me permitindo errar para acertar. Obrigada;

Ao meu co-orientador Prof Dr. Pergentino Cunha, pelo apoio e sensibilidade durante o período de curso das disciplinas;

Ao Prof Dr. Ricardo Albuquerque, obrigada pela atenção, dedicação e ensinamentos em meio a tantos compromissos e reuniões científicas;

A Prof Dra. Marta Monteiro pelo acolhimento no Laboratório de Microbiologia da UFPA, e pelos valiosos ensinamentos ao longo do curso;

As minhas tias Maria Luiza Nobre Lamarão e Maria Louze Nobre Lamarão, minha eterna gratidão pelo incentivo, pelo colo e atenção que me deram nos momentos mais difíceis durante a realização deste trabalho.

Aos amigos que ganhei e que foram extremamente importantes na realização deste trabalho, Kélem, Gisele, Benedito, Bia, Gabi, Carol e Aline, Clarissa, Hugo e William, a todos do Laboratório de Fármacos da UNIFAP, obrigada por tudo;

Ao querido Marx pelo carinho e companheirismo durante a minha estada na UNIT. E pelas longas e boas conversas. Minha eterna gratidão, amigo.

A querida Neli (Rosineli) pela sua competência técnica e carinhosa na realização dos procedimentos histológicos realizados na UNIT, em Sergipe. Obrigada pela atenção;

A Alzira Ramos, que durante a minha ausência cuidou com responsabilidade e carinho dos meus filhos e da minha casa, em Macapá. E ao Watson Jr, pelos chás de camomila oferecidos na hora certa.

A Carla (Carlinha) pela orientação e imensa contribuição nos experimentos no Laboratório de Microbiologia;

A equipe do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da UFPA, Amanda, Angélica, Kelly e Raquel pelo companheirismo na realização deste trabalho.

Aos meus colegas do mestrado que agora são meus amigos, Taysa, Andressa, Jeane, Bruno, Luis Fábio, Taís, Eliane, Josi, Sara, Heitor, Alex, Anivaldo Obrigada, queridos;

Ao Lindomar Oliveira por me orientar e acompanhar na coleta dos frutos;

Ao Edmar Junior, pela valiosa colaboração na formatação deste trabalho.

Ao Maurício Souza e Mônica Luna que souberam responder pela Divisão de Fitoterapia na minha ausência mesmo com tantas dificuldades; E a todos da Farmácia, Lurdes, Vanessa, Elizamar, Patricia, Anadir, Jean, Diego e Siulan.

A Minha amiga enfermeira Francineide Pena pelo incentivo e pelas orações.

Ao professor José Maria dos Santos Vieira, pelo incentivo na realização deste trabalho;

Ao meu colega Fernando Medeiros pelos ensinamentos a respeito de fitoquímica.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelos valiosos ensinamentos.

E a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, todo meu respeito e gratidão.

EPÍGRAFE

“O mais importante não é saber: é nunca perder a capacidade de aprender”.

Leonardo Boff

RESUMO

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DAS SEMENTES DE *Vatairea guianensis* Aublet.

As plantas medicinais são ampla e culturalmente utilizadas de forma empírica na Amazônia no tratamento de diversas doenças. Grande parte dessas plantas ainda não foi investigada cientificamente sobretudo quanto aos aspectos relacionados as atividades biológicas. A espécie selecionada neste trabalho é *Vatairea guianensis*, utilizada na medicina tradicional para tratar infecções de pele como as micoses cutâneas. Este trabalho avaliou a atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos hidroetanólico, hexânico, clorofórmico e metanólico obtidos das sementes de *Vatairea guianensis* pelo método da microdiluição em caldo para obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), frente a bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella sp*). Avaliou-se também a atividade cicatrizante sobre feridas cutâneas abertas em ratos pela aplicação tópica do extrato hidroetanólico, representados pelos grupos G1 controle positivo (fibrinase); G2 controle negativo (sol salina); e grupos experimentais, (G3 dose 500mg/kg; G4 250mg/kg; G5 100mg/kg) por sete dias e a toxicidade aguda por via oral. A análise histológica do processo cicatricial foi avaliada, por meio de técnica convencional incluindo coloração HE e Picrosírius para observação das características histomorfológicas da reação inflamatória e análise descritiva da deposição de colágeno, respectivamente. Todos os extratos demonstraram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados com CIM que variaram de 3,12µg/mL a 50µg/mL e CBM com valores 6,25µg/mL a 100µg/mL. A análise histológica mostrou que o extrato hidroetanólico diminuiu a intensidade da reação inflamatória nos grupos G3 e G1, estimulou a síntese de colágeno tipo III em G1, G3 e G4 e aumentou a síntese de colágeno em G2 e G5. O experimento com extrato hidroetanólico obtido das sementes de *Vatairea guianensis* pareceu retardar o processo cicatricial nas doses de 500 e 250mg/kg em feridas abertas o que pode ser um efeito positivo por impedir a formação de cicatriz hipertrófica, sugerindo assim um efeito modulatório por parte do extrato. A avaliação da toxicidade aguda em camundongos revelou que o extrato hidroetanólico apresentou baixa toxicidade por via oral.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana; atividade cicatrizante; plantas medicinais; *Vatairea guianensis*;

ABSTRACT

EVALUATION OF ORGANIC EXTRACTS OF SEEDS OBTAINED *Vatairea guianensis* Aubl.

Medicinal plants are widely used and culturally in the amazon to treat various diseases. Much of these plants has not been scientifically investigated especially on the aspects related to biological activities. The species selected in this work is *Vatairea guianensis*, used in traditional medicine to treat skin infections such as cutaneous mycoses. This study evaluated the antibacterial activity *in vitro* of hydroethanolic extract, hexane, chloroform and methanol *Vatairea guianensis* seeds by microdilution method for obtaining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against Gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) and Gram negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella sp*). The study also evaluated the healing activity on open wounds in rats by topical application of the hydroethanolic extract, represented by G1 positive control (fibrinase), G2 negative control (saline) and experimental groups (G3 dose 500mg/kg, G4 250mg/kg, G5 100mg/kg) for seven days and the acute oral toxicity. Histological analysis of the healing process was evaluated by means of conventional technique including color HE and Picrosirius for observation of the inflammatory reaction histomorphological characteristics and descriptive analysis of collagen deposition, respectively. All extracts showed antibacterial activity against all tested microorganisms with an MIC ranging from 3,12µg/mL to 50µg/mL and MBC values 6,25µg/mL to 100µg/mL. In histological analysis, the hydroethanolic extract decreased the intensity of inflammation in the groups G1 and G3, stimulates the synthesis of collagen type III in G1, G3 and G4 and increased collagen synthesis in G2 and G5. The experiment with the hydroethanolic extract obtained from seeds of *Vatairea guianensis* appeared to slow down the healing process effect by preventing the formation of hypertrophic scar, suggesting a modulatory effect by extract. The acute toxicity evaluation in mouse revealed that the hydroethanolic extract showed low toxicity by the oral proceedings.

Keywords: antimicrobial activity, wound healing activity, medicinal plants, *Vatairea guianensis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Vatairea guianensis</i> : Aspectos da árvore (A), fruto (B), folhas (C), sementes secas (D), flor (E), excicata (F) da espécie vegetal <i>Vatairea guianensis</i> . (A), (B), (C), (E) Arquivo pessoal; (D) (SANTOS,2003), (E) Disponível em < http://www.mel.cpatu.embrapa.br/plantas > acesso em 01.06.10.....	29
Figura 2	Fluxograma geral do processo de obtenção dos extratos obtidos das sementes de <i>Vatairea guianensis</i>	52
Figura 3	Representação esquemática do método de microdiluição em placas de Elisa para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM). Fonte Adaptado de Oliveira, 2005.	57
Figura 4	Animais condicionados nas gaiolas individuais	59
Figura 5	Procedimentos de tricotomia nos animais (A); demarcação da ferida (B); retirada do fragmento circular de pele da área demarcada (C)	61
Figura 6	Procedimento de medida crânio caudal	62
Figura 7	Procedimento de medida látero lateral	62
Figura 8	Aplicação do tratamento com extrato no animal	63
Figura 9	Ensaio da CIM do extrato bruto hidroetanólico de <i>Vatairea guianensis</i> frente a <i>S. aureus</i> (A). Concentração bactericida mínima do extrato bruto hidroetanólico de <i>Vatairea guianensis</i> frente a <i>S. aureus</i> (B).....	70
Figura 10	Ensaio de CIM do extrato hexânico de <i>Vatairea guianensis</i> frente a <i>S. aureus</i> (A). Concentração bactericida mínima do extrato hexânico de <i>Vatairea guianensis</i> frente a <i>S. aureus</i> (B).....	71
Figura 11	Ensaio de CIM do extrato clorofórmico de <i>Vatairea guianensis</i> frente a <i>S. aureus</i> (A). Concentração bactericida mínima do extrato clorofórmico de <i>Vatairea guianensis</i> frente a <i>S. aureus</i> (B).....	71
Figura 12	Ensaio de CIM do extrato metanólico de <i>Vatairea guianensis</i> frente a <i>S. aureus</i> (A).Concentração bactericida mínima do extrato metanólico de <i>Vatairea guianensis</i> frente a <i>S. aureus</i> (B).....	72
Figura 13	Ensaio de CIM do extrato bruto de <i>Vatairea guianensis</i> frente a <i>E. faecalis</i> (A). Concentração bactericida mínima do extrato bruto	72

hidroetanólico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis* (B).

- Figura 14 Ensaio de CIM do extrato hexânico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis* (A). Concentração bactericida mínima do extrato hexânico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis*(B)..... 73
- Figura 15 Ensaio de CIM do extrato clorofórmico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis* (A). Concentração bactericida mínima do extrato clorofórmico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis* (B)..... 73
- Figura 16 Ensaio de CIM do extrato metanólico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis* (A). Concentração bactericida mínima do extrato metanólico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis* (B)..... 74
- Figura 17 Ensaio de CIM dos extratos bruto hidroetanólico, hexânico, clorofórmico e metanólico de *Vatairea guianensis* frente a *Pseudomonas aeruginosa*..... 74
- Figura 18 Concentração bactericida mínima dos extratos bruto hidroetanólico(A),hexânico(B),clorofórmico (C) e (D) metanólico de *Vatairea guianensis* frente a *P.aeruginosa*..... 75
- Figura 19 Ensaio de CIM dos extratos clorofórmico e metanólico de *Vatairea* frente a *Salmonella sp* (A). Concentração bactericida mínima do extrato metanólico de *Vatairea guianensis* frente a *Salmonella sp*(B) 75
- Figura 20 Concentração bactericida mínima do extrato clorofórmico de *Vatairea guianensis* frente a *Salmonella sp*..... 76
- Figura 21 Avaliação macroscópica da contração das feridas no grupo controle positivo-fibrinase, no dia do procedimento (A) e ao sétimo dia de pós-operatório (B) 77
- Figura 22 Avaliação macroscópica da contração das feridas no grupo controle negativo - solução salina, no dia do procedimento (A) e ao sétimo dia de pós operatório (B)..... 78
- Figura 23 Avaliação macroscópica da contração das feridas no grupo experimental G3 500mg/kg, no dia do procedimento cirúrgico e ao sétimo dia de pós- operatório..... 78
- Figura 24 Avaliação macroscópica da contração das feridas no grupo experimental G4 250mg/kg, no dia do procedimento cirúrgico e ao sétimo dia de pós- operatório 78
- Figura 25 Avaliação macroscópica da contração das feridas no grupo experimental G5 100mg/kg, no dia do procedimento cirúrgico (A) e ao sétimo dia de pós- operatório (B)..... 79
- Figura 26 Efeito do tratamento tópico do extrato hidroetanólico bruto de

- Vatairea guianensis* (500mg/kg,250mg/kg,100mg/kg), Fibrinase (36,88mg/kg), Solução salina (0,5ml/animal) sobre feridas em ratos wistar durante 7 dias de tratamento (n=5/grupo). Teste de Student-Newman keuls para múltiplas comparações $p^* < 0,05$ 80
- Figura 27 Percentual médio de contração das feridas de cada grupo, solução salina,100mg/kg, 250mg/kg, 500mg/kg e Fibrinase, desde o procedimento cirúrgico até ao 7ºdia de tratamento de evolução pós-cirúrgica 81
- Figura 28 Moderada infiltração leucocitária com predomínio de monucleares ao 7º dia em G1 na zona superficial da ferida (Zs) e reação de granulação evidente na zona profunda (Zp) da ferida(A) .(HE,10x)..... 82
- Figura 29 Reação inflamatória crônica com maior expressão de leucócitos monucleares (linfócitos) (setas), presença de vasos repletos de hemáceas e fibrilas delicadas de colágeno em G1, (B) e (C) (HE, 40x)..... 83
- Figura 30 Reação de granulação predominantemente vascular em G1,(HE,10x) ao sétimo dia com pouca infiltração na zona superficial da ferida e presença de vasos e fibras delicadas e paralelas de colágeno ; vasos sanguíneos congestionados repletos de hemáceas (setas) (D)..... 83
- Figura 31 Infiltração leucocitária neutrofilica na superfície, linfocítica na profundidade e edema em G2 ao 7º dia caracterizando inflamação subaguda (A). (HE 10x). Neutrófilos na superfície (setas) (B) (HE 40x)..... 84
- Figura 32 Reação de granulação ao 7º dia em G2, apresentando fase predominante endotelial, exibindo tecido conjuntivo com densidade frouxa , fibras reticulares de aspecto delgado e delicado mas com tendência ao paralelismo . Presença de células fusiformes sugerindo fibroblastos (setas) (C) (HE, 40x)..... 85
- Figura 33 Pouca infiltração leucocitária em G3 (A) (HE,10x) mas com evidente infiltração linfocítica (B e C) (HE, 40x) (HE, 100x)..... 86
- Figura 34 Reação de granulação ao 7º dia em G3, apresentando fase predominante vascular exibindo feixes de fibras colágenas com disposição reticulada e aparência delgada e delicada. Presença de células fusiformes sugerindo fibroblastos (D) (HE, 40x)..... 86
- Figura 35 Infiltração leucocitária neutrofílica e linfocítica ao 7º dia em G4 caracterizando reação inflamatória subaguda (A) (HE,10x) e (B) (HE, 100x). 87
- Figura 36 Reação de granulação em G4 com proliferação de células com núcleos ovóides compatíveis com células endoteliais na superfície 88

- com tecido conjuntivo frouxo e fibras colágenas de aspecto reticular e delicadas (C).
- Figura 37 Infiltração leucocitária neutrofílica e linfocítica ao 7º dia em G5 caracterizando reação inflamatória subaguda (HE,10x) (A), observa-se o equilíbrio de linfócitos e neutrófilos (B) (HE, 100x)..... 89
- Figura 38 Reação de granulação caracterizada como endotelial em G5, apresentando tecido com fibras frouxamente arranjadas e reticulares mas com tendência ao paralelismo (C) (HE,40x) 89
- Figura 39 Grupos G1, G3 e G4, exibem predominância de fibras de colágeno predominantemente tipo III (Amarelo esverdeada), frouxamente arranjadas e disposição reticular. Nos grupos G2 e G5, são observadas fibras predominantemente do tipo III, mas com clara deposição de fibras de colágeno do tipo I (ouro), com arranjo paralelos de fibras colágenas 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos obtidos das sementes de <i>Vatairea guianensis</i> , determinadas pelo método de microdiluição em caldo..	76
Tabela 2	Área das feridas (mm ²), logo após o procedimento cirúrgico imediato (T ₀), 7º dia e percentual de contração da ferida no grupo controle positivo Fibrinase.....	105
Tabela 3	Área das feridas (mm ²), logo após o procedimento cirúrgico imediato (T ₀), sétimo dia e percentual de contração da ferida no grupo controle negativo (solução salina 0,9%)	105
Tabela 4	Área das feridas (mm ²), logo após o procedimento cirúrgico imediato (T ₀), sétimo dia e percentual de contração da ferida no grupo G3 500mg/kg	105
Tabela 5	Área das feridas (mm ²), logo após o procedimento cirúrgico imediato (T ₀), sétimo dia e percentual de contração da ferida no grupo G4 250mg/kg	106
Tabela 6	Área das feridas (mm ²), logo após o procedimento cirúrgico imediato (T ₀), sétimo dia e percentual de contração da ferida no grupo G5 100mg/kg	106
Tabela 7	Área média das feridas (mm ²) no pós-operatório imediato, 7º dia e percentual de contração nos diferentes grupos experimentais.....	80
Tabela 8	Análise morfológica ao sétimo dia após o procedimento cirúrgico, da intensidade inflamatória e reação de granulação no grupo controle positivo (G1), tratado com fibrinase	82
Tabela 9	Análise morfológica ao sétimo dia após o procedimento cirúrgico, da intensidade inflamatória e reação de granulação no grupo controle negativo (G2), tratado com solução salina 0,9%.....	84
Tabela 10	Análise morfológica ao sétimo dia após o procedimento cirúrgico, da intensidade inflamatória e reação de granulação no grupo (G3) tratado com a dose 500mg/kg	85
Tabela 11	Análise morfológica ao sétimo dia após o procedimento cirúrgico, da intensidade inflamatória e reação de granulação no grupo (G4) tratado com a dose 250mg/kg.....	87
Tabela 12	Análise morfológica ao sétimo dia após o procedimento cirúrgico, da intensidade inflamatória e reação de granulação no grupo (G5) tratado com a dose 100mg/kg	88

Tabela 13	Descrição resumida das diferenças morfológicas quanto ao padrão de inflamação, expressão celular e reação de granulação dos diferentes grupos experimentais.....	90
-----------	--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Ocorrências de constituintes químicos isolados do gênero <i>Vatairea</i>	31
Quadro 2	Atividades biológicas do gênero <i>Vatairea</i> descritas na literatura.....	33
Quadro 3	Relação das cepas bacterianas usadas, sua origem e histórico	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfoxido
HE	Hematoxilina Eosina
IEPA	Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá
IV	Infra Vermelho
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NCCLS	National Committee for Laboratory Standards
OMS	Organização Mundial da Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
R1,2,3,4,5	Rato 1,2,3,4,5
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPA	Universidade Federal do Pará
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
UNIT	Universidade Tiradentes
UV	Ultra Violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS.....	25
2.1.1 Classificação Botânica.....	25
2.1.2 Família Leguminosae	25
2.1.3 Sub família Faboideae	25
2.1.4 Gênero <i>Vatairea</i>	26
2.1.5 Espécie <i>Vatairea Guianensis</i>	26
2.2 Estudos químicos relatados sobre o gênero <i>Vatairea</i>.....	30
2.3 Estudos biológicos relatados sobre o gênero <i>Vatairea</i>	31
2.4 O processo de cicatrização.....	34
2.5 Atividade antimicrobiana de plantas medicinais.....	38
2.6 Ensaio de atividade antimicrobiana- Método de diluição	40
2.7 Considerações gerais sobre as plantas medicinais.....	40
2.8 Considerações sobre o uso de plantas medicinais na Amazônia.....	43
2.9 Considerações gerais sobre Fitoterapia.....	45
3 OBJETIVOS	49
3.1 Objetivo geral	49
3.2 Objetivos específicos	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Coleta e obtenção do material botânico	50
4.2 Preparação do material vegetal e obtenção dos extratos	50
4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos hidroetanólico, hexânico, clorofórmico e metanólico de <i>Vatairea guianensis</i>	53
4.3.1 Diluição dos extratos	53
4.3.2 Obtenção e manutenção das cepas	53
4.3.3 Preparo dos meios de cultura	54
4.3.4 Preparo dos inóculos bacterianos	54
4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroetanólico, hexânico, clorofórmico e metanólico de <i>Vatairea guianensis Aublet</i> pelo	

método da microdiluição em placas de Elisa.....	55
4.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	55
4.5 Avaliação da atividade cicatrizante do extrato hidroetanólico de <i>Vatairea guianensis</i> em feridas cutâneas abertas de segunda intenção no dorso de ratos.....	58
4.5.1 Animais	58
4.5.2 Procedimentos para o ensaio <i>in vivo</i>	60
4.5.3 Avaliação histológica do processo cicatricial por segunda intenção em ratos tratados com o extrato hidroetanólico das sementes de <i>Vatairea guianensis</i>	63
4.5.3.1 Processo de montagem das lâminas	64
4.5.3.2 Análise histomorfológica da reação inflamatória	67
4.5.3.3 Avaliação do padrão de deposição de fibras colágenas durante a cicatrização de feridas tratadas com o extrato hidroetanólico bruto das sementes de <i>Vatairea guianensis</i>	68
4.6 Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroetanólico obtido das sementes de <i>Vatairea guianensis</i> (Aublet).....	69
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
6 RESULTADOS.....	70
6.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos bruto hidroetanólico, hexânico, metanólico e clorofórmico das sementes de <i>Vatairea guianensis</i> Aublet	70
6.2 Avaliação da atividade cicatrizante do extrato hidroetanólico de <i>Vatairea guianensis</i> em feridas cutâneas de segunda intenção no dorso de ratos	76
6.2.1 Avaliação macroscópica da contração da ferida.....	77
6.3 Avaliação do processo cicatricial por segunda intenção em ratos tratados com o extrato hidroetanólico de <i>Vatairea guianensis</i>.....	81
6.3.1 Análise histomorfológica da reação inflamatória.....	81
6.3.2 Avaliação do padrão de deposição de fibras colágenas na cicatrização de feridas por segunda intenção em ratos tratados com o extrato hidroetanólico das obtido das sementes de <i>Vatairea guianensis</i>	92
6.4 Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroetanólico obtido das	

sementes de <i>Vatairea guianensis</i> (Aublet).....	92
7 DISCUSSÃO.....	94
8 CONCLUSÃO.....	104
9 REFERÊNCIAS	105
APÊNDICE (Tabelas sobre a evolução da área das feridas e percentual de contração de cada grupo).....	118

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo amplamente utilizadas empiricamente pela humanidade como recurso terapêutico desde as civilizações mais antigas até os tempos atuais. O conhecimento gerado com o uso desse recurso natural foi transmitido ao longo dos tempos de geração para geração, tornando-se reconhecidamente pela comunidade científica mundial como uma das principais estratégias na seleção de espécies para as pesquisas de novas drogas e substâncias de origem natural (YUNES, CALIXTO 2001; MIGUEL, 2000).

Nos últimos anos, no Brasil, as pesquisas com plantas medicinais envolvendo as diversas áreas como a fitoquímica, a etnobotânica, etnofarmacologia e farmacologia, têm sido realizadas de forma bastante promissora, apresentando contribuições relevantes no que diz respeito aos aspectos relacionados ao isolamento de princípios ativos e principalmente à atividade biológica de plantas que ocorrem nos diferentes biomas brasileiros. (DESMARCHELIER *et al.*, 1999; MACIEL *et al.*, 2002; DUARTE *et al.*, 2004; HIRUMA- LIMA *et al.*, 2006, PERAZZO *et al.*, 2007).

Considerando que as plantas medicinais existentes no planeta são estimadas em 250.000 a 500.000 espécies, ressalta-se que apenas uma pequena percentagem foi investigada quanto o isolamento de seus princípios ativos e uma fração ainda menor foi avaliada quanto à atividade biológica. Mesmo entre aquelas de uso na medicina tradicional, ainda há um grande percentual que não foi objeto de investigação quanto à comprovação da eficácia e segurança do seu uso. Por outro lado, esses fatores reforçam o potencial das plantas como fontes de novos medicamentos e um grande campo para a investigação científica (FERREIRA, 1998; RATES, 2001; RUIZ, 2008).

Na Amazônia Legal, existem aproximadamente 650 espécies vegetais de valor econômico com atividade farmacológica. O estado do Amapá – local da coleta de matéria-prima deste estudo - ocupa o quarto lugar nessa escala com 380 espécies vegetais (BRASIL-MMA/SCA, 1998), merecendo destaque espécies como andiroba (*Carapa guianensis*) e copaíba (*Copaifera spp*), bastante difundidas em âmbito regional, nacional e internacional.

Este fato indica que há muito a se fazer no sentido de investigar, sobretudo, no âmbito das nossas plantas amazônicas, em razão da rica biodiversidade como fonte de novos medicamentos.

Muitas plantas utilizadas no Brasil são empregadas na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos para o tratamento de infecções comuns, sem qualquer evidência científica decorrentes de estudos do potencial biológico e tóxico para o homem (HOLETZ *et al.*, 2002). Além do uso por tradição desses recursos a utilização é favorecida pela ausência de políticas públicas de acesso a medicamentos e a inexistência de serviços básicos de saúde em muitas comunidades isoladas da Amazônia.

A Organização Mundial de Saúde (OMS), desde 1978, vem alertando para o fato de que a maior parte da população mundial, principalmente África, Ásia e América Latina extraem diretamente da natureza sua fonte de matéria-prima para a saúde. No Brasil, a rica biodiversidade, a miscigenação das culturas (indígena, negra e europeia), aliada ao alto custo de medicamentos industrializados favorecem o emprego da fitoterapia para tratar a saúde. De acordo com a OMS, 80% da população dos países em desenvolvimento dependem da medicina popular como fonte primária de atenção a saúde (WHO, 2002).

Nos países desenvolvidos, a chamada medicina complementar e alternativa tem sido utilizada com frequência, de forma concomitante à medicina convencional. Nos Estados Unidos, por exemplo, o crescimento da fitoterapia foi superior a 50% no período de 1997 a 2002 (RIBEIRO; MOURA, 2009).

No Brasil, com a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais em 2006 pelo Governo Federal, o Ministério da Saúde reassumiu uma das suas principais aptidões nesse campo na área da Assistência Farmacêutica, desde a extinção da Central de Medicamentos (CEME) em 1995. Essa política visa garantir o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006).

Neste contexto, o estado do Amapá é um dos poucos da Federação a possuir, em sua estrutura organizacional, uma instituição de pesquisa, o Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá IEPA, vinculado a Secretaria de Ciência Tecnologia do Estado do Amapá SETEC-AP, que tem como missão dar suporte as políticas estaduais de ciência e tecnologia, com várias linhas

de atuação, merecendo destaque a área de plantas medicinais, na qual o IEPA desenvolve pesquisas na área de botânica, etnofarmacologia, fitoquímica e farmacologia pré-clínica. Além disso, possui um laboratório de produção artesanal de produtos à base de extratos de plantas nativas popularmente utilizadas em diversas comunidades do Amapá.

Com base na indicação popular, dentre os produtos intermediários produzidos, destaca-se a tintura das sementes de *Vatairea guianensis*, conhecida popularmente como faveira, empregada no Amapá para problemas de infecções na pele causadas por fungos e bactérias. O uso das sementes é atribuído a indicação popular de riberinhos e comunidades tradicionais.

Poucas referências científicas quanto as atividades biológicas sobre esta espécie foram encontradas na literatura, motivo principal que nos estimulou a escolhê-la para a realização deste estudo. O levantamento bibliográfico revelou a existência de apenas um estudo de atividade antimicrobiana *in vitro* com resultados positivos (MATOS,1988) no entanto com outra espécie do gênero *Vatairea*, a *Vatairea macrocarpa* (OLIVEIRA,2008). Essas evidências já reforçam o potencial do gênero para a atividade antimicrobiana, tendo em vista a grande resistência dos microrganismos aos antimicrobianos convencionais.

Diversas plantas brasileiras são empregadas no tratamento de infecções causadas por bactérias e fungos, porém carecem de estudos científicos que possam comprovar tais atividades (ALVES *et al*, 2000; HOLETZ *et al* 2002; SARTORI *et al.*, 2003; PRETTO *et al.*, 2004; DE CAMPOS *et al.*, 2005). Por outro lado, as plantas devem ser investigadas não apenas para confirmar a propriedade indicada pelo uso popular, mas no sentido de descobrir outras atividades biológicas desconhecidas com base, por exemplo, na constituição química.

Nenhum registro de estudo *in vivo* foi encontrado em levantamento bibliográfico sobre a espécie *Vatairea guianensis*, o que nos motivou a realizar também o estudo da interferência sobre o processo cicatricial através da aplicação tópica do extrato hidroetanólico em feridas abertas cutâneas de segunda intenção no dorso de ratos, embora não haja relatos do uso popular desta espécie para a atividade cicatrizante. Esse estudo *in vivo* levou em consideração a constituição química do gênero, rico em compostos fenólicos, principalmente antraquinonas, substâncias já descritas na literatura de relevantes atividades biológicas, o que torna

esta classe de metabólitos secundários bastante interessantes na busca de novos compostos bioativos potencialmente úteis (MONTEIRO *et al.*,2009).

Assim, diante da existência de poucos estudos de atividade biológica sobre *Vatairea guianensis* e do seu emprego na medicina tradicional, além de ser uma espécie já usada na elaboração de produtos intermediários no IEPA, propôs-se então a realização do estudo *in vitro* antimicrobiano preliminar dos extratos brutos etanólico, hexânico, clorofórmico e metanólico das sementes de *Vatairea guianensis* e o estudo *in vivo* da possível interferência do extrato hidroetanólico no processo de cicatrização de feridas.

E por fim, considerando as exigências preconizadas pela legislação específica para plantas medicinais e fitoterápicos, avaliou-se também a toxicidade aguda por via oral do extrato hidroetanólico das sementes de *Vatairea guianensis in vivo* em ensaios preliminares, pois apenas um único estudo de toxicidade aguda *in vivo* foi encontrado na literatura para o gênero *Vatairea* no qual foi utilizado uma outra espécie de ocorrência no cerrado do centro oeste do Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

2.1.1 Classificação Botânica (BARROSO *et al.*, 1991; LIMA, 1982)

DIVISÃO: Magnoliophyta (Angiospermae)

CLASSE: Magnoliatae (Dycotiledonae)

SUB CLASSE: Rosidae

ORDEM: Rosales

FAMÍLIA: Leguminosae

SUB FAMÍLIA: Faboideae

TRIBO: Dalbergieae

GÊNERO: *Vatairea*

ESPÉCIE: *Vatairea guianensis* Aubl.

2.1.2 Família Leguminosae

A família Leguminosae é considerada uma das mais importantes famílias botânicas pelo grande número de espécies vegetais que possui. Essa família inclui 642 gêneros que estão distribuídos em dezoito mil espécies. Compreende três subfamílias descritas como Caesalpinioideae, Mimosoideae, Faboideae (Papillinodeae) (BARROSO, 1991; DI STASI E LIMA, 2002).

2.1.3 Sub-família Faboideae

A sub família Faboideae possui 482 gêneros e cerca de doze mil espécies, sendo sua distribuição ampla em regiões de clima temperado e tropical (BARROSO *et al.*, 1991).

2.1.4 Gênero *Vatairea*

O gênero *Vatairea*, pertencente à família Leguminosae - Faboideae, é exclusivo da faixa neotropical, incluindo apenas 7 espécies de leguminosas arbóreas, as quais encontram-se distribuídas desde o sul do México até o sudeste do Brasil, abrangendo o México, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Peru e Brasil. O centro de concentração da maior variedade desse gênero está situado nas regiões florestais da Amazônia Central. O nome do gênero refere-se a um nome popular utilizado na Guiana (CAVADA, *et al.*, 1998; BARROSO *et al.*, 1991; LIMA, 1982).

Quanto as espécies florestais amazônicas pertencentes a esse gênero destacam-se, a *Vatairea guianensis*, *Vatairea fusca*, *Vatairea erythrocarpa*, *Vatairea paraensis* e *Vatairea sericeae*. Outras espécies do gênero habitam as matas de encosta como *Vatairea heteroptera*. Já no sul do México e América Central destaca-se a espécie *Vatairea lundelli* (LIMA, 1982)

As publicações existentes sobre esse gênero concentram-se em sua maioria nas espécies *Vatairea guianensis* Aubl, *Vatairea heteroptera* Ducke, *Vatairea macrocarpa* Benth, *Vatairea sericea* Ducke, e *Vatairea paraensis* Ducke.

2.1.5 Espécie *Vatairea guianensis* (Aublet)

A espécie *Vatairea guianensis* é popularmente conhecida na Amazônia como faveira, fava de empigem, faveira de empigem, fava bolacha, fava mutum, faveiro e Angelim do igapó (PIEIDADE; FILHO, 1988).

Dentre a população indígena dos Palikur, na Amazônia setentrional, na fronteira Brasil e Guiana Francesa, extremo norte do estado do Amapá a *Vatairea*

guianensis é chamada de waru. No Suriname, é conhecida por “gales habbes”, no Peru de “anacapi” e “marupa del bajo”; na Guiana Francesa é chamada de “graine i dartres”, “bois dartre” e maria congo e na Venezuela de “guaboa” (GRENAND, *et al.*, 1987).

É uma espécie nativa da Amazônia, comum em áreas de florestas sazonalmente inundáveis, como as matas de igapó e várzea da Amazônia, encontrada raramente em terra firme, ocorrendo em toda região banhada pelo Rio Amazonas e seus afluentes. Alcança a fronteira da Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Peru e Suriname. (CORRÊA, 1982).

A *Vatairea guianensis* é uma árvore mediana, raramente de grande porte, possuindo de 8 a 25 metros de altura, as vezes com grandes sapopemas na base do tronco, casca lisa ou levemente fissurada, cerne de castanho-amarelado a castanho escuro. Trata-se de uma árvore vistosa e com característica bastante ornamental por apresentar inflorescências em panículas terminais curtas de 15 a 40cm de comprimento com flores violáceas (REVILLA, 2000; LIMA, 1982) (Figura1A). As folhas são bipinadas e cada pina contém 9 a 17 folíolos alternos ou subopostos, oblongos, cartáceos e ligeiramente pubescentes na face inferior (Figura1C) (CORRÊA, 1982; PIEDADE; FILHO, 1988; FERREIRA, *et al.*, 2004). O fruto é do tipo drupáceo, suborbicular, estreitamente alado na margem ventral, unispermo, de cor verde (Figura 1B) (CORRÊA, 1982).

A semente seca é descrita na literatura como exalbuminada, com superfície externa marrom claro, com tegumento delgado e quebradiço. Apresenta as reservas acumuladas nos cotilédones (simples); radícula pequena na comissura dos cotilédones; gêmula amarelo brilhante; sua consistência é dura e quebradiça; forma sub circular, achatada, (semi globosa); odor agradável e levemente achocolatado; sabor amargo suave na superfície. A retirada do tegumento revela superfície lisa, apresentando coloração escura, tendendo ao preto (Figura 1D). Em relação ao tamanho, possui cotilédones grandes, medindo em média 3,96cm de comprimento por 3,83cm de largura (média de 44 cotilédones); em seção transversal apresenta gêmula amarelo brilhante; em seção longitudinal mostra eixo hipocótilo – radicular reto e radícula pequena na comissura dos cotilédones (CORRÊA, 1982; PIEDADE, 1988; SANTOS, *et al.*, 2006).

Especialmente no Amapá, a ocorrência dessa espécie é maior no Município de Mazagão, sendo também encontrada em outros municípios do estado como Porto Grande e Arquipélago do Bailique (SANTOS, *et al.*, 2006).

A madeira dessa árvore é forte e resistente sendo útil para construção civil, marcenaria, carpintaria e caixas industriais (LOUREIRO; SILVA, 1968; LIMA, 1982).

Informações etnofarmacológicas na literatura relatam que o suco do fruto é empregado na medicina tradicional amazônica na cura da empigem e no tratamento de certas dermatoses no Brasil, Venezuela, Colômbia e Guiana Francesa. (LIMA, 1982).

No médio e baixo Amazonas a população utiliza as sementes de *Vatairea guianensis* Aubl contra diversos tipos de micoses superficiais, sob a forma de tintura alcoólica ou por aplicação direta na pele de suas sementes maceradas. A literatura relata também que as cascas do caule e das raízes são utilizadas pela população contra fungos, no período em que esta espécie não está em fase de frutificação. (PIEIDADE; FILHO, 1988; REVILLA, 2000). A frutificação ocorre no período de junho a janeiro (LIMA, 1982).

O óleo extraído das sementes é usado topicamente contra manchas, sardas e pano de rosto (CORRÊA, 1982).

A espécie ainda é utilizada como fonte de alimento para quelônios na natureza (*Podocnemis unifilis*) mais conhecido como tracajá (PORTAL, *et al.*, 2002) o que pode indicar que esta planta não seja venenosa.



Figura 1 – *Vatairea guianensis*: Aspectos da árvore (A), fruto (B), folhas (C), sementes secas (D), flor (E), excicata (F) da espécie vegetal *Vatairea guianensis*. (A), (B), (C), (F) Arquivo pessoal; (D) (SANTOS, 2003). (E) Disponível em <<http://www.mel.cpatu.embrapa.br/plantas>> acesso em 01.06.10.

2.2 Estudos químicos relatados sobre o Gênero *Vatairea*

Na literatura, foram encontrados poucos estudos com relatos sobre a constituição química do gênero *Vatairea*, sendo que esses relatos reportavam-se principalmente ao isolamento de antraquinonas. Entretanto além desses metabólitos outras classes também foram isoladas como esteróides, catequinas, epicatequinas e triterpenos da espécie *Vatairea macrocarpa*. Em outro estudo de triagem fitoquímica de *Vatairea guianensis*, foi detectada a presença de classes bioativas no extrato etanólico das sementes de *Vatairea guianensis*, do tipo: tanino, antocianinas e antocianidinas, flavonóides, xantonas, esteróides, triterpenóides, saponinas e quinonas, bem como a ausência de alcalóides (FERREIRA *et al.*, 2004). No Quadro 1 estão apresentados, de forma resumida, os compostos químicos isolados do gênero *Vatairea*.

Estudos realizados por Formiga, *et al* (1975), revelaram que a partir do extrato benzênico do tronco de *Vatairea heteroptera*, foram registrados o isolamento de compostos antraquinônicos crisofanol, emodina, e formonometina, ácidos graxos saturados em C₁₆ e C₂₄, 7- hidroxiflavona, sitosterol e stigmasterol. Além disso, verificou-se a ocorrência de crisofanol nos extratos benzênicos de *Vatairea guianensis* Aubl; *Vatairea macrocarpa* Benth e *Vatairea paraensis* Ducke (PIEDADE ;FILHO,1988), sugerindo que o crisofanol pode ser uma das substâncias responsáveis pelas atividades biológicas do gênero.

Do cerne de *Vatairea macrocarpa*, o principal constituinte químico isolado foi identificado como ácido crisofânico (1,8- dihidroxi-3-metil-antraquinona), baseado em dados espectrais de RMN¹H de UV e IV (MATOS *et al.*, 1988).

Do extrato metanólico das cascas do caule de *Vatairea macrocarpa* foram isoladas uma catequina e seu isômero epicatequina, substâncias precursoras de taninos. (STRADA,*et al.*,2007).

Do cerne de *Vatairea guianensis* foram isolados o ácido 9-antronacrisofânico, 9- antronafisciona e 10- antronafisciona e os autores sugeriram que essas substâncias poderiam ser as responsáveis pelas propriedades irritantes à pele das pessoas que manuseavam a madeira importada pela Alemanha dos países Latino americanos (SIMATUPANG *et al.*,1967apud PIEDADE; FILHO 1988).

A partir do extrato metanólico obtido das cascas do caule da espécie *Vatairea guianensis* foram isolados as antraquinonas crisofanol, fisciona, emodina e os triterpenos conhecidos como ácido oleanólico e a lactona do ácido diidromacaerinico (PIEADA; FILHO 1988).

Das cascas do fruto de *Vatairea guianensis* foi obtido o extrato hexânico sendo isoladas duas substâncias com fórmulas moleculares $C_{15}H_{10}O_4$ m/c=254,1 e $C_{16}H_{12}O_4$ m/c=284 (OTOBELLI *et al.*, 2009).

Quadro 01 – Ocorrências de constituintes químicos isolados do gênero *Vatairea*

Subst.	Nome	Espécie	Parte da Planta	Referências
1	Crisofanol	<i>V. heteroptera</i>	Tronco	Formiga, 1975
		<i>V. guianensis</i>		Formiga, 1975
		<i>V. macrocarpa</i>		Formiga, 1975
2	Emodina	<i>V. paraensis</i>	Tronco	Formiga, 1975
		<i>V. heteroptera</i>		Formiga, 1975
3	Formonometina	<i>V. guianensis</i>	Tronco	Piedade, 1988
		<i>V. heteroptera</i>		Formiga, 1975
4	7-hidroxiflavona	<i>V. heteroptera</i>	Tronco	Formiga, 1975
5	sitosterol	<i>V. heteroptera</i>	Tronco	Formiga, 1975
6	stigmasterol	<i>V. heteroptera</i>	Tronco	Formiga, 1975
7	Ácido crisofânico (1,8-diidroxi-3-metil-antraquinona)	<i>V. macrocarpa</i>	Tronco	Matos, 1988
8	Catequina	<i>V. macrocarpa</i>	Caule	Strada, 2007
9	Epicatequina	<i>V. macrocarpa</i>	Caule	Strada, 2007
10	Ácido 9-antronacrisofânico	<i>V. guianensis</i>	Tronco	Simatupang, 1967
11	9-antronafisciona	<i>V. guianensis</i>	Tronco	Simatupang, 1967
12	10-antronafisciona	<i>V. guianensis</i>	Tronco	Simatupang, 1967
13	Fisciona	<i>V. guianensis</i>	Cascas do caule	Piedade & Filho, 1988
14	Ácido oleanólico	<i>V. guianensis</i>	Cascas do caule	Piedade & Filho, 1988
15	Lactona do ácido diidromacaerinico	<i>V. guianensis</i>	Cascas do caule	Piedade & Filho, 1988
*	FAB-05; FAB-07	<i>V. guianensis</i>	Cascas do fruto	Otobelli, 2009.

* Sustâncias em processo de patenteamento.

2.3 Estudos biológicos relatados sobre o gênero *Vatairea*

As atividades biológicas reportadas para o gênero *Vatairea* incluem anti-diabética, antimicrobiana, antiparasitária e toxicidade. O resumo das atividades biológicas descritas na literatura estão apresentadas no Quadro 2.

O extrato etanólico obtido das cascas do tronco de *Vatairea macrocarpa* foi submetido ao ensaio farmacológico da atividade anti diabética, onde observou-se efeito hipoglicemiante e os autores do estudo sugeriram que o uso a longo prazo do

extrato de *Vatairea macrocarpa* pode ser utilizado no controle de diabetes (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Além da avaliação do efeito hipoglicemiante da espécie *Vatairea macrocarpa*, o extrato etanólico foi submetido ao ensaio de toxicidade para a avaliação dos efeitos indesejáveis e tóxicos importantes para a validação do uso do extrato como agente terapêutico. Observou-se que o extrato etanólico de *Vatairea macrocarpa* apresentou baixa toxicidade conferindo segurança no seu uso como agente terapêutico. No estudo de toxicidade aguda nenhuma alteração foi observada nos animais tratados com as doses de 250, 500 e 2000mg/kg. Nas doses de 1000mg/kg foi observado aumento da frequência cardíaca em um dos animais e na dose de 5000mg/kg dois animais apresentaram perda de reflexos e de apreensão na pata, aumento de motilidade e anestesia que perduraram por 1 hora. Nenhuma das doses levou os animais a óbito.

Na literatura foram encontradas publicações relatando a purificação e algumas propriedades da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* sendo este o primeiro relatório de purificação de uma lectina de uma espécie do gênero *Vatairea*. (CAVADA, 2006).

O extrato acetônico obtido de *Vatairea macrocarpa*, foi submetido ao ensaio de atividade antimicrobiana no qual observou-se acentuada atividade antibacteriana sobre cepas de *Klebsiella sp* e *Staphilococcus aureus* e inatividade frente as bactérias *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* e fungos *Aspergillus Níger* e *Saccharomyces cerevisiae* (MATOS *et al.*, 1988).

A espécie *Vatairea guianensis* é quase que desprovida de estudos científicos para atividade biológica, reportando-se apenas a uma única publicação na qual foram relatados na literatura um estudo *in vitro* para avaliação da atividade antiparasitária de duas substâncias isoladas do extrato hexânico das cascas do fruto de *Vatairea guianensis* sobre a *Leishmania amazonensis*, parasita causador da leishmaniose tegumentar onde observou-se resultados positivos destes constituintes que exibiram ação leishmanicida inibindo a proliferação de formas promastigotas de *L. amazonensis* o que levou os autores a sugerirem que esta espécie tem relevância no desenvolvimento de novas drogas com atividade leishmanicida (OTOBELLI *et al.*, 2009)

As poucas evidências científicas sobre *Vatairea guianensis* na literatura foi a principal razão para investigar esta espécie do ponto de vista biológico.

Quadro 02 – Atividades biológicas do gênero *Vatairea* descritas na literatura.

Espécie	Parte Usada	Atividades Biológicas	Organismos usados	Formulação	Dose	Resposta	Referência
<i>V. macrocarpa</i>	Cascas do tronco	Anti-diabética	ratos	Extrato etanólico	250mg/kg, 500mg/kg	ativo	Oliveira, 2008
	Cascas do tronco	Toxicidade	ratos	Extrato etanólico	250mg/kg, 500mg/kg, 2000mg/kg, 5000mg/kg	Baixa toxicidade	Oliveira, 2008
	Cascas do tronco	Antimicrobiana	<i>Klebsiella SP</i> , <i>Staphilococcus aureus</i>	Extrato acetônico	-	ativo	Matos, 1988
	Cascas do tronco	Antimicrobiana	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Aspergillus Níger</i> , <i>saccharomyces cerevisiae</i>	Extrato acetônico		inativo	Matos, 1988
<i>V. guianensis</i>	Cascas do fruto	Antiparasitária	Leishmania amazonensis	Compostos FAB05 * FAB07 * isolados do extrato hexânico	-	ativo	Otobelli, 2009

* Sustâncias em processo de patenteamento

2.4 O processo de cicatrização

A capacidade do organismo de substituir células lesadas ou mortas é um fenômeno observado nos seres vivos de grande importância para a sua sobrevivência (COTRAN *et al.*, 2000; SANCHES NETO *et al.*, 1993).

A cicatrização é uma série de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que envolvem alterações teciduais importantes para a manutenção da integridade do organismo. Esse processo, dinâmico e complexo, inicia com a inflamação, seguida pela quimiotaxia, isto é, atração de células para o local da ferida. Na sequência, ocorre a proliferação celular, diferenciação e remodelação que é o processo final de cicatrização. Em um organismo saudável e sem a presença de agentes infecciosos, esse processo ocorre de maneira harmônica no organismo como forma de garantir a regeneração do tecido lesado. Assim, podemos dizer que a cicatrização por primeira intenção é aquela no qual há aproximação das bordas, com maior probabilidade de que o processo de cicatrização ocorra de forma natural. O processo de cicatrização por segunda intenção tal qual foi utilizado nesse estudo, é aquele no qual a ferida encontra-se aberta, exposta, com perda maior de células e tecidos, diferenciando-se do processo por primeira intenção por exibir o fenômeno fisiopatológico de contração da ferida (MANDELBAUM, 2003).

O processo de reparo cicatricial pode ser dividido em fases distintas que se sobrepõem de forma contínua e temporal envolvendo inflamação, proliferação celular, diferenciação e remodelação (MENDONÇA *et al.*, 2009; CLARCK, 1996; SANCHES NETO, 1993). Uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido lesado (ORTONE; CLÉVY, 1994).

O fator desencadeante no processo de cicatrização consiste inicialmente na perda tecidual, ou seja, a ocorrência de lesão (MANDELBAUM *et al.*, 2003). Posteriormente, inicia-se a fase inflamatória caracterizada por extravasamento sanguíneo, que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares principalmente plaquetas, além de vasodilatação, permeabilidade vascular e acúmulo de plasma no local da ferida, caracterizando um exsudato inflamatório. Essa fase também é caracterizada pela presença de dor, calor, rubor e tumor (CORSI, 1995). A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea geram um

tampão, rico em fibrina, que permite restabelecer a hemostasia, que se traduz em vasoconstrição e formação de coágulo, além de formar uma barreira de proteção contra a invasão de microrganismos, ou seja, uma crosta que isola a ferida do meio ambiente quase que imediatamente e organiza a matriz provisória necessária para a migração celular (MENDONÇA; NETTO, 2009; EURIDES, 1996; COTRAN, 2000). Essa matriz tem a função de armazenar citocinas e fatores de crescimento liberados nas fases seguintes do processo cicatricial (EMING, *et al.*, 2007; WERNER, *et al.*, 2003).

A ativação da cascata de coagulação, juntamente com a liberação de fatores de crescimento e ativação de células parenquimatosas pela lesão, produz numerosos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos que auxiliam o recrutamento das células inflamatórias para o local da ferida (CLARK, 1996).

Os neutrófilos e monócitos são as primeiras células inflamatórias a migrarem para a região lesada em resposta aos agentes quimiotáticos (CLARK, 1996) e permanecem por um período de três a cinco dias. Essas células são as responsáveis pela fagocitose das bactérias atuando no controle da infecção (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

Além da função de fagocitose de bactérias, fragmentos celulares e corpos estranhos, essas células inflamatórias produzem fatores de crescimento, que preparam a ferida para a fase proliferativa, quando são recrutados também os fibroblastos e células endoteliais (SINGER, 1999).

Os monócitos do sangue periférico, tanto no início quanto durante o transcorrer do processo cicatricial, continuam a infiltrar-se no local da ferida em resposta a agentes quimiotáticos para monócitos. A liberação dos fatores provenientes das plaquetas, a fagocitose dos componentes celulares, como fibronectina ou colágeno, contribuem para a ativação dos monócitos diferenciando-os em macrófagos, que representam as principais células envolvidas no controle do processo de reparação (SINGER, 1999; CLARK, 1996). Essas células permanecem do terceiro ao décimo dia, degradando e removendo corpos estranhos e componentes do tecido conjuntivo danificado, colágeno, elastina e proteoglicanas, direcionando o desenvolvimento do tecido de granulação (MANDELBAUM *et al.*, 2003, CLARK, 1996).

A fase proliferativa ou fibroblástica caracteriza-se por intensa neoformação vâsculo-capilar e proliferação fibroblástica. Essa fase é a responsável pelo

fechamento da lesão propriamente dita com reparação do tecido conjuntivo e do epitélio. O número de capilares aumenta e são mais numerosos entre 32 horas até 8º dia após a execução da ferida. Simultaneamente, o número de vasos linfáticos também aumenta e o tecido de granulação preenche a ferida gradualmente. Essa fase desenvolve-se 24 horas após a lesão e no máximo até 14º dia (FONTANA, 1996).

A fase proliferativa compreende três subfases: reepitelização, que se inicia horas após a lesão com a migração de células epiteliais tanto das bordas da ferida como dos anexos epiteliais, localizados no centro da lesão; a fibroplasia e angiogênese, que fazem parte do chamado tecido de granulação, responsável pela ocupação de tecido lesionado, cerca de quatro dias após a lesão (SINGER, 1999).

A reepitelização ocorre pela ação de fatores de crescimento sobre os queratinócitos estimulados por mitoses e quimiotaxia (MENDONÇA, *et al.*, 2009).

A fibroplasia e a formação da matriz são extremamente importantes na formação do tecido de granulação, cuja composição é em sua maioria composta de elementos celulares principalmente fibroblastos, vasos sanguíneos neoformados, células inflamatórias e componentes da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno (MANDELBAUM *et al.*, 2003,).

Os fibroblastos são considerados células fundamentais no processo de reparação tecidual por secretarem fibras colágenas, elásticas e reticulares, bem como a substância fundamental amorfa constituída de água, sais, glicoproteínas e proteoglicanas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Simões e col. e Sanches Neto e col. afirmam que os fibroblastos alcançam seu maior número no 7º dia, ocorrendo uma diminuição a partir deste tempo (SIMÕES, 1986 ; SANCHES, 1993).

O tecido de granulação constitui-se por fibroblastos que proliferam e adquirem maior quantidade de retículo endoplasmático rugoso e surgem nos cortes histológicos na forma de células grandes e agrupadas, adicionados por vasos neoformados e células inflamatórias residuais. Macroscopicamente, caracteriza-se como um tecido mole de aspecto carnoso de um vermelho intenso, apresentando superfície irregular, assumindo um aspecto granuloso, o que determina o nome deste tecido (CHANDRASOMA, 1993). Alguns dos fibroblastos são ativos na síntese do colágeno, outros adquirem características de células musculares lisas denominados de miofibroblastos, que confere capacidade contrátil ao tecido de granulação, reduzindo a área cruenta da ferida nos processos de cicatrização.

O colágeno é a proteína mais comum encontrada nos animais, sendo muito importante no processo de reparação tecidual, sua produção pelos fibroblastos inicia-se entre o quarto e o quinto dia após a lesão, o que resulta em um significativo ganho na resistência da ferida (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Qualquer substância com potencial para melhorar essa etapa contribuirá de maneira significativa no processo de cicatrização (TEVES, 1989).

A angiogênese é a última etapa da fase proliferativa e fundamental no processo de cicatrização, na qual novos vasos são formados a partir de vasos pré-existentes, sendo essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para o tecido de granulação em crescimento. Ocorre na matriz extracelular do leito da ferida com a migração e estimulação mitogênica das células endoteliais (FOLKMAN, 1992).

Na fase de remodelagem do processo de cicatrização, ocorre numa tentativa de recuperar a estrutura do tecido normal, caracterizada pela maturação dos elementos e alterações da matriz extracelular com deposição do colágeno e proteoglicanas. Os fibroblastos do tecido de granulação nessa fase diferenciam-se em miofibroblastos comportando-se como um tecido contrátil. Essas células são dotadas de grande quantidade de filamentos de actina (microfilamentos) e miosina, que migram para a lesão após dois ou três dias promovendo uma retração da ferida que pode atingir de 50 a 70% do tamanho inicial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MONTENEGRO, 1999).

A contração da ferida pode ser considerada um indicativo do potencial de cicatrização, isto é, quanto melhor a cicatrização maior é a percentagem da contração (PRATA, 1998; BRITO, 2001).

Uma ferida cirúrgica sofre contração no seu tamanho de forma centrípeta, guiada pelos seus bordos (MONTADON *et al.*, 1977), embora sua forma possa ter influência no tamanho da contração, as feridas redondas, por exemplo, não se contraem tão rapidamente quanto as retangulares, estelares ou retilíneas (POLLACK, 1979). Esse evento é uma etapa importante do fechamento das lesões que cicatrizam por segunda intenção, caracterizada por perda excessiva de tecido.

A completa reparação do tecido lesionado caracteriza-se quando não há mais filamentos de actina e miosina no citoplasma dos miofibroblastos (RUNGGRE-BRANDLER ;GABBIANI, 1983). Ao longo dos anos as pesquisas buscam esclarecer os possíveis efeitos de novos medicamentos tópicos capazes de interferir no processo de cicatrização.

Nesse contexto, os produtos naturais, especialmente as plantas medicinais, continuam sendo uma das principais fontes de medicamentos para tratamento de diversas condições patológicas dentre as quais se destaca a cicatrização de feridas cutâneas. Diversas plantas empregadas na medicina popular e ou derivados e princípios ativos isolados, foram investigadas quanto a sua atividade cicatrizante com destaque para tintura de confrei (*Symphyntum officinale*) (CARVALHO *et al.*, 1991); a babosa *Aloe vera* (CHITHRA *et al.*, 1998); a papaína (SANCHES NETO *et al.*, 1993), a copaíba (EURIDES *et al.*, 1998), jucá - *Caesalpinia ferrea* (OLIVEIRA, 2008; PENA, 2009).

2.5 Atividade antimicrobiana de plantas medicinais

Na medicina popular, as plantas adquiriram importância fundamental sobretudo pela observação de suas propriedades terapêuticas e tóxicas. (MARTINS, *et al.*, 1998). No entanto, essas observações populares, apesar de serem norteadores das pesquisas, requerem, em sua maioria, dados científicos que comprovem a eficácia e a segurança do seu uso (FERREIRA, *et al.*, 1998; MACIEL, *et al.*, 2002).

Muitas plantas utilizadas no Brasil são empregadas na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos para o tratamento de infecções comuns, sem qualquer evidência científica sobre estudos relacionados ao potencial biológico e tóxico para o homem (HOLETZ *et al.*, 2002).

As pesquisas relacionadas à atividade antimicrobiana de plantas medicinais iniciaram por volta de 1943. Tratava-se de estudos para investigar a atividade de 2.300 plantas superiores contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados desses estudos mostraram que plantas pertencentes a 63 gêneros continham princípios ativos que causavam inibição do crescimento de um ou de ambos os microrganismos (PEDERSON; FISHER, 1984). Por outro lado, no Brasil, as pesquisas relacionadas à atividade de substâncias antimicrobianas de origem vegetal, tiveram início cinco anos depois, com Cardoso e Santos (1948) que investigaram extratos de 100 plantas indicadas em terapêutica como antiinflamatórias e cicatrizantes. Destas, apenas cinco apresentaram resultados positivos com atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

A partir da década de 50, os primeiros compostos de plantas foram isolados como o diterpeno biflorinina, e o triterpeno maitenina. Da mesma forma, outros flavonóides com efetivas propriedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina foram isolados, como a primina, a miconidina, lapachol e derivados, a plumbagina, luteolina e mircetina (ZACCHINO *et al.*, 2001).

Diversas linhas de pesquisas têm sido desenvolvidas apresentando resultados positivos, baseados exclusivamente nas propriedades anti-infecciosas e anti-inflamatórias de várias plantas de utilização na medicina popular, que poderão contribuir sobremaneira na terapêutica antimicrobiana dessas espécies (HOLETZ *et al.*, 2002; ZACCHINO *et al.*, 2003). Vale ressaltar que algumas plantas tem se mostrado efetivas e seguras quanto ao uso terapêutico, com a vantagem de serem mais eficazes em comparação com os fármacos convencionais (SOUZA, *et al.*, 2004).

O estudo de plantas com atividade antimicrobiana no Brasil vem se intensificando ao longo do tempo, em decorrência de vários fatores, dentre os quais destacamos: a) a grande diversidade de espécies existentes não estudadas nos diversos biomas brasileiros como a floresta Amazônica, Cerrado e mata Atlântica; b) a necessidade pela busca por novos agentes antimicrobianos de origem natural capazes de combater a resistência dos microrganismos afetados por doenças causadas por bactérias e fungos patogênicos, causadores de micoses superficiais e sistêmicas; c) o uso indiscriminado dos atuais antimicrobianos que, em médio prazo, podem causar resistência (MIGUEL *et al.*, 1996; LIMA, 2001).

Atualmente há um crescente interesse pelas plantas como fonte de antibióticos, o que vem contribuindo de forma significativa para a introdução de novos agentes antimicrobianos como parte de uma nova estratégia terapêutica, com produtos mais efetivos que apresentem menor índice de efeitos colaterais e preferencialmente mais baratos (ZAITZ, *et al.*, 1998).

A pesquisa por alternativas naturais para o tratamento de doenças parasitárias, também atrai a atenção de muitos estudiosos, principalmente para doenças importantes como doenças de chagas, leishmaniose e malária, pois a terapêutica disponível atualmente para essas doenças é de pouca eficácia e com um nível de toxicidade bastante elevado (OTOBELLI, 2009).

2.6 Ensaio de atividade antimicrobiana- Método de diluição

Os métodos de diluição em caldo *in vitro* são empregados para detectar possíveis atividades antimicrobianas de extratos e/ ou compostos isolados de plantas medicinais. São métodos quantitativos considerados de referência para determinar a sensibilidade das bactérias e fungos aos antibióticos e antifúngicos respectivamente (ZGODA;PORTER, 2001).

O teste de microdiluição utiliza microplacas com 96poços e utiliza volumes mínimos de meio de cultura entre 0,1 e 0,2ml (SAHM;WASHINGTON,1991; ZGODA;PORTER, 2001). Esse método consiste em preparar diluições sucessivas do extrato ou composto isolado a ser testado em meio de cultura liquido ou sólido e em seguida semear cada diluição em placas para verificar qual a menor concentração do extrato e ou composto capaz de inibir o crescimento bacteriano. Possui a vantagem de ser quantitativo, podendo ser usado tanto para amostras hidrossolúveis como lipossolúveis além de possuir maior sensibilidade comparado a outros métodos (TRABULSI, 1999, OSTROSKY, *et al.*, 2008).

2.7 Considerações gerais sobre as plantas medicinais

O uso de plantas como recurso terapêutico tem sua aplicação desde as sociedades mais primitivas evoluindo com as civilizações. O homem pré histórico observava o comportamento dos animais quanto a utilização dos vegetais, permitindo compreender e direcionar o uso daquelas que considerava úteis, distinguindo assim as espécies alimentares das tóxicas (ALONSO, 1998).

Já nas civilizações antigas, a origem do uso de plantas para curar doenças estava relacionada ao poder divino ou práticas religiosas, já que, sem o conhecimento científico, essas culturas se ancoravam na mitologia e na própria história dessas civilizações a exemplo dos hindus e da civilização grega (BONTEMPO, 1990).

Na contemporaneidade, por volta de 1970, a Organização Mundial da Saúde, reconheceu os benefícios oriundos da medicina chinesa, e ao final dessa década, reconheceu a importância das plantas medicinais, considerando e alertando que grande parte da população mundial extrai diretamente da natureza sua fonte de matéria-prima para a saúde (BEVILAQUA, 2003). A partir daí surgiram pesquisas e o desenvolvimento de medicamentos obtidos de fontes naturais. Levantamentos realizados pela *Annual Reports of Medicinal Chemistry* no período de 1981 e 2002, evidenciaram que de 90 novas substâncias com potencial farmacológico analisadas, 61 delas eram derivados semi-sintéticos de plantas. (SIXEL; PECINALLI, 2002; NEWMAN *et al.*, 2003).

O conhecimento sobre plantas medicinais, tanto em regiões pequenas e pobres quanto em grandes cidades brasileiras, representa, na maioria das vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Nesse contexto, as plantas medicinais comercializadas ou dispensadas são facilmente acessíveis em feiras livres, mercados públicos e também em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002).

O estudo de plantas orientado pela medicina popular constitui-se um dos caminhos mais utilizados na descoberta de novos agentes terapêuticos, considerando a detecção e a análise de seus princípios ativos (CARVALHO, 1998; CECHINEL; YUNES, 1998; MACIEL *et al.*, 2002).

Considera-se como planta medicinal aquela que possui em sua composição, substâncias químicas sintetizadas biologicamente (a partir de nutrientes, água e luz), que possam provocar no organismo humano e animal, efeitos farmacológicos ou reações de cura ou abrandamento de doenças por meio de seus princípios ativos (FETROW, AVILA, 1999; OMS, 1992).

As substâncias biológicas produzidas pelas plantas são representadas pelos metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são encontrados em todas as plantas e são essencialmente importantes para o seu crescimento e manutenção da vida, como, por exemplo, os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, etc. Já os metabólitos secundários são produtos do metabolismo específico, resultantes do processo adaptativo e são caracterizados por uma imensa diversidade química de substâncias bioativas de importância relevante nos mecanismos de defesa das plantas contra o ataque de seus predadores como

fungos, protozoários, insetos e outros animais (CARVALHO, 1998; BARRACA, 1999; BASILE *et al.*, 1999; BRUNETON, 1995; DUFFY; POWER, 2001; LIMA, 2001).

Atualmente, o interesse científico pelos metabólitos secundários tem aumentado em decorrência da incessante busca por novos medicamentos oriundos de plantas que apresentem baixos ou nenhum efeitos tóxicos (BASILE *et al.*, 1999; SATO *et al.*, 2002; PAIVA, *et al.*, 2003).

O alto custo dos medicamentos industrializados que dependem de tecnologia e matéria-prima externas, o difícil acesso da população a serviços de assistência médica e farmacêutica, além da “cultura” pelo estilo de vida saudável de utilizar produtos preferencialmente naturais são fatores que contribuem para a crescente utilização de plantas medicinais na cura e prevenção de doenças (SIMÕES *et al.* 2002; SIXEL; PECINALLI, 2002).

O largo uso de plantas medicinais também pode ser explicado pela não exigência de prescrição médica, uma vez que o alto grau de aceitabilidade das plantas medicinais associado à grande disponibilidade desses recursos na medicina popular, justifica a ausência dessa prescrição, diferente do que ocorre com os medicamentos industrializados (AMORIM *et al.*, 2003; MITSCHER *et al.*, 1987).

Diversos medicamentos empregados na medicina convencional foram desenvolvidos com base no conhecimento empírico sobre as propriedades terapêuticas de algumas plantas, a exemplo dos digitálicos, quinina, morfina, atropina, aspirina entre outros (SIMÕES *et al.*, 2002).

Dentre os vários exemplos de estudos com plantas que demonstram a importância na aplicação clínica merece destaque a pilocarpina, alcalóide isolado do gênero *Pilocarpus* (ANDRADE NETO, 1989), utilizada na preparação de fármacos indicados para tratar glaucoma (MATOS, 1990), a capsaicina extraída de *Capsicum sp* que possui ação anestésica, a colchicina extraída da *Colchicum autumnale*, como agente anti reumático (YUNES *et al.*, 2001); como agentes cardiovasculares citam-se os efeitos benéficos dos extratos de *Digitalis purpúrea* e *Digitalis lanata* os quais levaram a descoberta de glicosídeos cardíacos como a digoxina e a digitoxina (CLARKE *et al.*, 2001).

Os flavonóides apresentam atividade anticancerígena sendo demonstrada em estudos também sua importância na alimentação, e são amplamente encontrados nas frutas, sementes, flores e folhas, fazendo parte da dieta humana (WILHELM FILHO *et al.*, 2001). Estudos preliminares têm demonstrado relevantes ações

biológicas de vários flavonóides que atuam na prevenção de acidentes vasculares, sendo muito utilizados pela indústria farmacêutica na preparação de agentes vasodilatadores como a rutina, além de outros como a quercetina e a luteolina, os quais produzem significativa resposta antiinflamatória e antinociceptiva quando testados com ácido acético, formalina e capsaicina (CALIXTO, 2000), além de atividade antimicrobiana (SARTORI *et al.*, 2003), e hipoglicemiante.

Os terpenóides e compostos esteróides são largamente distribuídos no reino vegetal e exibem distintas propriedades farmacológicas. Entre outras ações apresentam propriedades antiinflamatórias e antinociceptivas, inibem a agregação plaquetária e interferem a nível intracelular em vários passos do mecanismo de transdução (CALIXTO *et al.*, 2000).

As antraquinonas são compostos fenólicos largamente distribuídos nas plantas medicinais, caracterizadas quimicamente como substâncias policíclicas, com mais de 20 carbonos, inodoras e com aspecto amarelado ou castanho, ocorrem nas famílias *Polygonaceae*, *Rhamnaceae*, *Liliaceae* e *Leguminosae*. Possuem propriedades laxativas, catárticas, cicatrizantes, antipsoriáticas, bactericidas, antissépticas e antiinflamatória local (MONTEIRO, *et al.*, 2009;). As antraquinonas não são bem absorvidas no trato digestório, razão pela qual são utilizadas para atuação no intestino ou empregadas sobre a pele. Dentre inúmeros exemplos de plantas medicinais em que estudos evidenciaram a presença marcante de antraquinonas, cita-se *Cassia sena*, *Cassia angustifolia*, *Rhamnus pushiana*, *Rheum palmatum*, *Aloe vera*, *Vatairea guianensis* (VASCONCELOS, 2002; BOTSARIS; MACHADO, 1999; PIEDADE; FILHO 1988).

2.7 Considerações gerais sobre o uso tradicional de plantas medicinais na Amazônia

A Amazônia é detentora de uma imensa biodiversidade, cuja maior parte encontra-se ainda sem o devido estudo. No que tange ao uso de plantas medicinais é sabido que a população nativa se utiliza continuamente de seu uso, independentemente de estudos científicos. A esse processo chama-se uso tradicional. No âmbito do uso popular é desconhecido que as plantas possuem na

mesma medida que os medicamentos convencionais, efeitos indesejáveis quando utilizadas de modo inadequado, daí a importância do respaldo por meio de evidências científicas obrigatórias preconizadas pela Legislação brasileira (MACIEL, *et al.*, 2002)

Tanto pela ótica da biodiversidade quanto pela frequência do uso tradicional faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas dessa biodiversidade, em especial, aquelas de uso tradicional frequente para identificar substâncias ativas eficazes e/ou menos tóxicas de modo a potencializar o uso adequado. Nesse sentido algumas doenças tropicais são tratadas com essa terapia assim como a esquistossomose, a malária, a leishmaniose e as infecções bacterianas e fúngicas (ALVES *et al.*, 2000) e as micoses superficiais de pele, as quais ocupam o primeiro lugar com altos percentuais na incidência das dermatoses importantes, representadas principalmente pelas dermatofitoses e pitíriase versicolor, o que sugere ser um aspecto próprio da região amazônica (SILVA, 1981).

Além disso, o uso tradicional das plantas é favorecido na região em decorrência de sua geografia peculiar, da dificuldade de acesso aos medicamentos convencionais associado à precariedade e até a inexistência de serviços públicos de saúde em muitas comunidades isoladas da Amazônia.

Neste contexto, mesmo o Brasil possuindo uma grande biodiversidade, os dados em relação à pesquisa de plantas com atividade antimicrobiana ainda são escassos, estando disponíveis somente dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas. Atribui-se esse baixo número de registro à divulgação dos dados ocorrerem apenas em eventos restritos, como eventos científicos locais ou regionais, associado também ao fato de que a maioria das pesquisas são realizadas isoladamente com uma ou poucas espécies, baseadas em informações etnofarmacológicas, diferente de estudos abrangendo várias famílias botânicas pertencentes à flora de uma região definida (DUARTE, 2006).

É fato que o nosso país possui uma excepcional biodiversidade, sobretudo quando comparamos com outros países, como a Suíça que apresenta apenas uma espécie vegetal endêmica, a Alemanha com 16 e ainda o México com 3.376 espécies. Estes números tornam-se inexpressivos quando comparados aos 25 a 30 mil espécies endêmicas de ocorrência apenas na Amazônia, sem mencionar a

biodiversidade das demais regiões: cerrado, pantanal, caatinga e mata atlântica (ALVES *et al.*, 2000).

A atividade antimicrobiana relatada nas pesquisas de produtos naturais, em particular as plantas medicinais, tem sido atribuída à ação de metabólitos secundários como a terpenóides e compostos fenólicos os quais mesmo na forma pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica (CONNER, 1993; HELANDER *et al.*, 1998). Desta forma, esses compostos antimicrobianos presentes em plantas podem inibir o crescimento bacteriano e fúngico por diferentes mecanismos de ação, possuindo um significativo valor clínico.

Quanto à atividade antimicrobiana de outras espécies de uso popular investigadas na Amazônia, merecem destaque: *Kalanchoe pinnata* Pers, (pirarucu), (MORTON, 1990), *Psidium guajava* (goiaba) (SANCHES *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2006), *Copaifera langsdorffi* (copaíba) (LORENZI, 2002), *Petiveria alliacea* (mucura-caá) (GUEDES, 2009), *Anacardium occidentale* (caju) (SILVA *et al.*, 2007).

Considerando que este estudo se propõe também avaliar a atividade cicatrizante de feridas abertas é importante destacar aquelas de freqüente uso na Amazônia que já foram estudadas como a *Copaifera langsdorffi* (copaíba) (LORENZI, 2002; BRITO, 1999), *Jatropha gossypifolia* (pião roxo) (SANTOS, 2006); *Arrabidaea chica*, (pariri), (JORGE, 2008), *Caesapinia ferrea*, (jucá) (PENA, 2009).

2.8 Considerações gerais sobre fitoterapia

A prática da utilização de plantas medicinais para tratar doenças constitui a fitoterapia. Estudos mostram que até meados do século XIX, a fitoterapia foi considerada a peça essencial do arsenal terapêutico no Brasil e no mundo. No início do século XX, essa prática foi cedendo lugar ao uso de produtos biológicos de origem animal e a produtos elaborados com moléculas puras de princípios ativos isolados de plantas medicinais dotadas de ação farmacológica mais específica. Como conseqüência, as plantas medicinais perderam importância e passaram a ser utilizadas somente como terapia alternativa no Brasil e em outros países do terceiro mundo, onde cerca de 70% a 80% da população não têm acesso à assistência

farmacêutica (CARVALHO, 2004). Essa perda de grau de importância das plantas medicinais ocorreu na razão direta do avanço de uma gama de produtos lançados no mercado demonstrando a crescente lucratividade e poder econômico da indústria farmacêutica.

O uso abusivo desses medicamentos, constituídos, sobretudo por princípios ativos sintetizados e purificados, deflagrou sérias conseqüências, como o surgimento de doenças iatrogênicas (decorrente do uso de medicamento) e aumento de resistência microbiana (LEITE, 2009). Este fato aliado ao alto custo dos medicamentos industrializados e a busca da população por tratamentos menos agressivos ao organismo, impulsionou, em parte, o retorno ao interesse pelas plantas medicinais. Cabe ressaltar que, entre a população nativa esse movimento teve poucas repercussões em razão do uso tradicional constituir-se em uma prática cultural e o não acesso ao medicamento industrializado.

Pela Legislação brasileira, os fitoterápicos são definidos como medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada por levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não é considerado fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, nem associações destas com extratos vegetais (BRASIL, RDC 48, 2004).

As formas farmacêuticas fitoterápicas encontradas no mercado farmacêutico e em programas de fitoterapia, apresentam-se na forma líquida como extrato fluido, tinturas, xaropes, soluções, emulsões, loções e etc; semi-sólida como pomada, creme e géis e sólidas como comprimido, cápsula, drágea e sabonetes. Os fitoterápicos possuem inúmeras vantagens, dentre as quais estão o seu largo uso terapêutico, seu baixo custo e a grande disponibilidade para a população de baixa renda (CALIXTO, 2000).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), desde 1978, vem alertando para o fato de que a maior parte da população mundial, principalmente África, Ásia e América Latina, extraem diretamente da natureza sua fonte de matéria-prima para a saúde. No Brasil, a rica biodiversidade, a miscigenação das culturas indígena, negra e européia e o alto custo de medicamentos industrializados favorecem o emprego da fitoterapia para tratar a saúde. De acordo com a OMS, 80% da população dos

países em desenvolvimento dependem da medicina popular como fonte primária de atenção a saúde (WHO, 2002).

Nos países, desenvolvidos, a chamada medicina complementar e alternativa tem sido utilizada, com freqüência, de forma concomitante à medicina convencional. Nos Estados Unidos, por exemplo, o crescimento da fitoterapia foi superior a 50% no período de 1997 a 2002 (RIBEIRO; MOURA, 2009).

É importante ressaltar que, os usuários de plantas e seus derivados, compreendam que as plantas são portadoras de substâncias bioativas benéficas, mas que também podem causar efeitos adversos, embora menos freqüentes quando comparados as drogas de origem sintética. Assim, torna-se importante a exigência pela legislação, de testes que demonstrem a segurança, a eficácia e a qualidade destes recursos naturais, pois mesmo tendo uma larga utilização, não é suficiente para validá-las eticamente como produtos seguros e eficazes (CALIXTO, 2000). Nesse contexto, é obrigatório que um fitoterápico, para ser comercializado, esteja registrado no Ministério da Saúde .

Os critérios estabelecidos para a concessão de registro de fitoterápicos no Brasil estão apresentados na Resolução das Diretorias Colegiadas, RDC 48 (BRASIL, 2004), na qual a Agência Nacional de Vigilância Sanitária prevê uma lista de drogas vegetais, cujos componentes tem a permissão de obter o registro simplificado pela Indústria. Os fitoterápicos contidos nessa lista, podem ser registrados levando-se em consideração o maior número de evidências científicas reconhecidas em relação a eles, não havendo necessidade de revalidar as indicações terapêuticas e segurança do uso.

Na lista estão inseridas 34 espécies vegetais na sua maioria exóticas, ou seja, aquelas originárias de outros países. Caso o fitoterápico não integre a “Lista de Registro simplificado de fitoterápicos”, a indústria será obrigada a comprovar a segurança e eficácia do produto (RIBEIRO *et al.*, 2005) por meio de monografias referenciadas em lista publicada pela ANVISA (RE 88, 2004), que comprovem a ação biológica do princípio ativo presente na formulação do medicamento. Estas referências estão elencadas de acordo com uma pontuação, conforme a qualidade científica de cada obra.

A aprovação do registro será baseada no número de pontos atingidos que deve ser no mínimo de seis pontos, de acordo com a escala de pontuações das

referências. Nesse caso, a maioria das obras refere-se a compêndios internacionais os quais reportam estudos principalmente de plantas oriundas de países europeus.

Outra possibilidade de registro de fitoterápicos pela ANVISA, baseia-se em levantamentos etnofarmacológicos ou de documentações técnico-científicas que avaliem a indicação do uso, as coerências em relação às indicações terapêuticas propostas, ausência de risco tóxico ao usuário e comprovação de uso seguro por um período igual ou superior a 20 anos (BRASIL, 2004).

Desta forma, essa regulamentação encerra uma contradição, pois vai de encontro a uma lacuna nos estudos de plantas utilizadas na medicina popular, uma vez que a maioria das espécies brasileiras tradicionalmente empregadas pela população ainda não foram avaliadas do ponto de vista toxicológico e farmacológico, impossibilitando assim a obtenção do registro de fitoterápicos baseados em plantas tradicionais do nosso país. Por outro lado, essa regulamentação representa relevante incentivo para a realização de estudos de espécies utilizadas na medicina popular no Brasil (RIBEIRO, *et al.*, 2005).

No Brasil, duas importantes políticas foram estabelecidas pelo Ministério da Saúde em 2006: A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Ambas apresentam em suas diretrizes, o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos que possam ser disponibilizados com qualidade, segurança e eficácia à população, priorizando a biodiversidade do país. Essas medidas apontam para maior valorização e reconhecimento deste recurso terapêutico como alternativa de saúde para a população brasileira.

Desta forma, a fitoterapia ganha respaldo sendo valorizada e incrementada em diversos programas municipais e estaduais do Brasil, sendo prioridade do Ministério da Saúde, como forma de aumentar o acesso as plantas medicinais e fitoterápicos, disponibilizando esta opção terapêutica aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade biológica *in vitro* e *in vivo* dos extratos obtidos das sementes de *Vatairea guianensis*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos hidroetanólico, hexânico, clorofórmico e metanólico obtidos das sementes de *Vatairea guianensis*, por meio da determinação da Concentração Inibitória mínima – CIM, e Concentração bactericida mínima – CBM;
- b) Determinar a possível atividade cicatrizante do extrato hidroalcólico obtido das sementes de *Vatairea guianensis*;
- c) Avaliar *in vivo* a toxicidade aguda por via oral em camundongos do extrato hidroetanólico obtido das sementes de *Vatairea guianensis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e obtenção do material botânico

Foram coletados 8 kg do material botânico (frutos) de *Vatairea guianensis*, na região do Município de Porto Grande, distante 100 km de Macapá, capital do Estado do Amapá, em julho de 2009. Após a obtenção do material, foram confeccionadas exsiccatas do material vegetal e depositadas no Herbário do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA), identificadas por comparação pelo botânico Benedito Rabelo recebendo o registro nº 1916.

4.2 Preparação do material vegetal e obtenção dos extratos

Os frutos de *V. guianensis* foram coletados em seu habitat natural, e realizada a etapa de retirada das sementes sendo posteriormente lavadas em água corrente e borrifadas com álcool a 70%. Em seguida, iniciou-se o processo de secagem em estufa com circulação de ar (FANEN modelo 330, série 3096) em temperatura de 50° C durante 2 dias consecutivos para total retirada de umidade. Posteriormente, foram submetidas à moagem em moinho do tipo martelo no qual resultou em um pó de coloração escura. Essas etapas foram realizadas no Laboratório de Produção de Fitoterápicos do IEPA.

A obtenção do extrato hidroetanólico foi realizada pelo processo de maceração, sendo que 500g do pó foram adicionadas a 1.520mL de uma solução hidroetanólica a 75% em recipiente de vidro com tampa. A maceração ocorreu durante sete dias e a mistura foi agitada manualmente todos os dias durante 3 minutos. Após o tempo estabelecido, foi realizada a etapa de filtração em funil de vidro simples com algodão e papel de filtro por duas vezes consecutivas.

O extrato hidroetanólico foi submetido à concentração em evaporador rotativo (Quimis, modelo Q. 218) sob pressão reduzida em temperatura de 55°C para eliminação total do solvente. O material obtido após a concentração apresentou-se

em forma de pasta mole de coloração escura, sendo retiradas amostras para os testes *in vivo* e mantidos em freezer a 20°C até o momento de sua utilização (Figura 2). O rendimento do extrato bruto foi de 30,68%, tendo como base a massa inicial de matéria-prima.

A obtenção dos extratos hexânico, clorofórmico e metanólico foram obtidos diretamente do pó das sementes por maceração por 5 dias, utilizando-se 350g de sementes moídas adicionadas de 700 mL de solventes com polaridade crescente iniciando primeiro com o hexano, em seguida com o clorofórmio e por último o metanólico. Após a maceração, os extratos foram submetidos ao processo de concentração em evaporador rotatório de baixa pressão a 50° até a evaporação total do solvente. Após este procedimento, o concentrado de cada um foi posteriormente pesado, obtendo-se assim o rendimento de cada extrato que resultou em 4,57% para o extrato hexânico, 2,02% para o extrato clorofórmico e 6,22% para o extrato metanólico, tendo como base a massa inicial da matéria-prima (Figura 2).

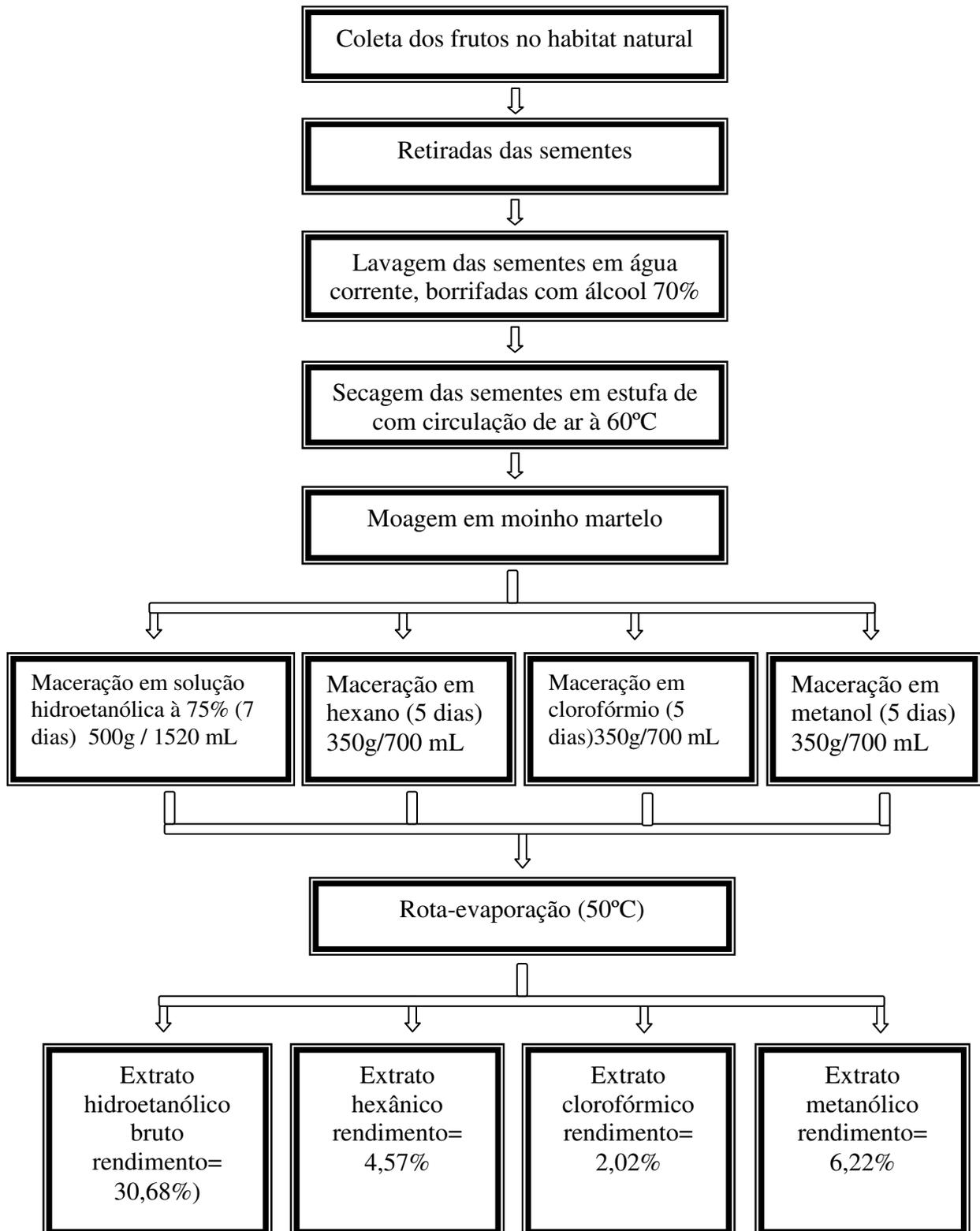


Figura 2 – Fluxograma geral do processo de obtenção dos extratos obtidos das sementes de *Vatairea guianensis*

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos hidroetanólico, hexânico, clorofórmico e metanólico de *Vatairea guianensis*

4.3.1 Diluição dos extratos

Para a realização dos testes de atividade antimicrobiana, os extratos das sementes de *Vatairea guianensis* foram diluídos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO):água destilada a 60% e homogeneizados em agitador elétrico (vortex) por 2 minutos.

4.3.2 Obtenção e manutenção das cepas

Os microorganismos utilizados para a realização do estudo foram bactérias Gram - positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); bactérias Gram - negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Salmonella sp* (Isolado clínico) (QUADRO 3). Essas cepas (ATCC) foram obtidas do INCQS/ FIOCRUZ (National Institute for Health Quality Control, Brazil) e mantidas no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará/UFPA. As cepas padrão (ATCC) e o isolado clínico foram mantidos em caldo nutritivo à temperatura ambiente.

Para os ensaios, todas as cepas foram semeadas em placas de petri novamente e em meios específicos para cada bactéria. Para *S.aureus* utilizou-se o meio ágar manitol; para *E. faecalis* utilizou-se ágar nutriente; *P. aeruginosa* utilizou-se ágar cetrimide e *Salmonella sp* em ágar SS. Em seguida, todas as placas foram incubadas a 37°C, por 24h em estufa bacteriológica para promover o crescimento exponencial após tempo de latência.

Quadro 3. Relação das cepas bacterianas usadas, sua origem e histórico.

No.	Microorganismos	Fornecedor	História
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	LAB/UFPA	ATCC 29213
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LAB/UFPA	ATCC 9027
3	<i>Salmonella sp</i>	LAB/UFPA	Isolado clínico
4	<i>Enterococcus faecalis</i>	LAB/UFPA	ATCC 29212

ATCC = American Type Culture Collection (EUA)

4.3.3 Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram Caldo Mueller Hinton (MERCK, Alemanha), Ágar Mueller – Hinton (MERCK, Alemanha), Ágar Cetrimide (HIMEDIA, Índia), Ágar nutriente (HIMEDIA, Índia), Ágar manitol (HIMEDIA, Índia). Esses meios foram preparados a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante.

4.3.4 Preparo dos inóculos bacterianos

Para o preparo dos inóculos bacterianos foram utilizadas cepas de *S.aureus*, *E.faecalis*, *P.aeruginosa* e *Salmonella sp*, sendo as duas primeiras gram-positivas e as duas últimas gram- negativas. Após o período de incubação, selecionou-se 3 a 4 colônias dessas bactérias e transferiu-se para tubo estéril contendo 1 ml de meio caldo Muller-Hinton. Quando necessário, foram realizados ajustes para alcançar a concentração desejada de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL, sendo compatível com a escala 0,5 de McFarland. Em seguida, foi realizada a incubação do tubo contendo a concentração 1×10^8 UFC/mL por 2h para alcançar o crescimento exponencial das bactérias. Após esse tempo, foram realizadas diluições seriadas até a obtenção do inóculo 1×10^3 UFC/mL. Para tanto, os inóculos e os procedimentos adotados para as bactérias testadas obedeceram a norma M7- A6 vol. 23 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de

crescimento Aeróbico”- Norma Aprovada - Sexta edição do NCCLS (National Committee for Laboratory Standards).

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroetanólico, hexânico, clorofórmico e metanólico de *Vatairea guianensis* Aublet pelo método da microdiluição em placas de Elisa

A microdiluição foi realizada a partir do inóculo 1×10^3 UFC/mL de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp, *Enterococcus faecalis* em microplacas de poliestireno (TPP/ISSO 9001/Switzerland) contendo 96 poços em forma de U, colunas de 1 a 12 e linhas de A a H .

Nos primeiros poços das linhas A a D, foram adicionados 20 μ L de cada extrato de *V.guianensis* na concentração inicial de 100 μ g/mL (0,1mg/mL), juntamente com 180 μ L do inóculo bacteriano (1×10^3 UFC/mL). Em seguida realizou-se as diluições seriadas à razão de 2 até a concentração de 0,390 μ g/mL. Após esse procedimento, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h e após esse tempo, 20 μ L de (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) foram acrescentados aos poços, para identificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

4.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição em microplacas de poliestireno (TPP/ISSO 9001/Switzerland) contendo 96 poços em forma de U, colunas de 1 a 12 e linhas de A a H.

A partir da concentração inicial de 100mg/mL de cada extrato a ser testado, foi realizada a microdiluição. Para isso, foram colocados 180 μ L do inóculo 1×10^3 do microorganismo a ser testado nos primeiros poços das linhas A a H acrescentados de 20 μ L de cada extrato obtendo-se uma concentração inicial de 100 μ g/mL, em seguida foi realizada a diluição seriada de 1:2 a 1:256 obtendo-se as concentrações

finais de 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL, 1,56 µg/mL, 0,78 µg/mL, 0,39 µg/mL. A diluição seriada foi realizada colocando-se 100µL do inóculo 1×10^3 nos próximos poços das linhas A a H e colunas de 1 a 9, em seguida foram retirados 100 µL do primeiro poço contendo o extrato ensaiado na concentração de 100 µg/mL juntamente com o inóculo e colocados no próximo poço contendo 100 µL de inóculo, obtendo-se a diluição 1:2, deste poço foram retirados 100 µL e colocados no próximo poço obtendo-se a diluição 1:4 e assim sucessivamente até a diluição 1:256. Como controle positivo para os ensaios frente a bactérias Gram-positivas foi utilizado o antimicrobiano comercial clorafenicol, e para as bactérias gram- negativas foi utilizado o antimicrobiano gentamicina. Como controle negativo foi utilizado o inóculo acrescentado de DMSO a 60%. Após realizada a microdiluição, a placa foi incubada a 35° por 24h.

Após a incubação por 24h, a CIM de cada extrato foi evidenciada frente as espécies bacterianas testadas empregando-se uma solução de MTT, sal de tetrazólio (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide em água destilada esterilizada na concentração de 5 mg/mL (p/v). O método do MTT baseia-se na capacidade apresentada pelas células de reduzir o sal de tetrazólio a cristais de MTT - formazan que se precipita pela ação mitocondrial succinil desidrogenase ativa apenas em células vivas (MOISMANN,1983).

Desta forma, após decorrido o tempo de incubação necessário, foi dispensado 20µL de solução de MTT em cada poço e esperou-se por um período de três horas em temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a leitura visual do resultado, ou seja, a olho nú, sendo observada a mudança da coloração amarela para escura, indicando a redução do sal de tetrazólio apontando assim para o crescimento das cepas bacterianas.

A interpretação dos resultados foi visualizada com maior segurança em relação a CIM, definida neste experimento como a menor concentração do produto natural que inibiu o crescimento bacteriano, pela evidência da cor amarela do indicador utilizado.

Após a leitura, o resultado da CIM foi complementado de modo a evidenciar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos. Para isso foi realizado o semeio de 10 µL de cada diluição presentes nos poços da microplaca em placas (90x15) contendo ágar Muller-Hinton. Em seguida as placas foram incubadas a 37° por mais 24h para posterior leitura das unidades formadoras de colônias (UFC). A

CBM foi considerada a menor concentração do extrato capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano. Foi realizado também o semeio dos controles negativo e positivo. O método de microdiluição em placas de Elisa segue representado na Figura 3.

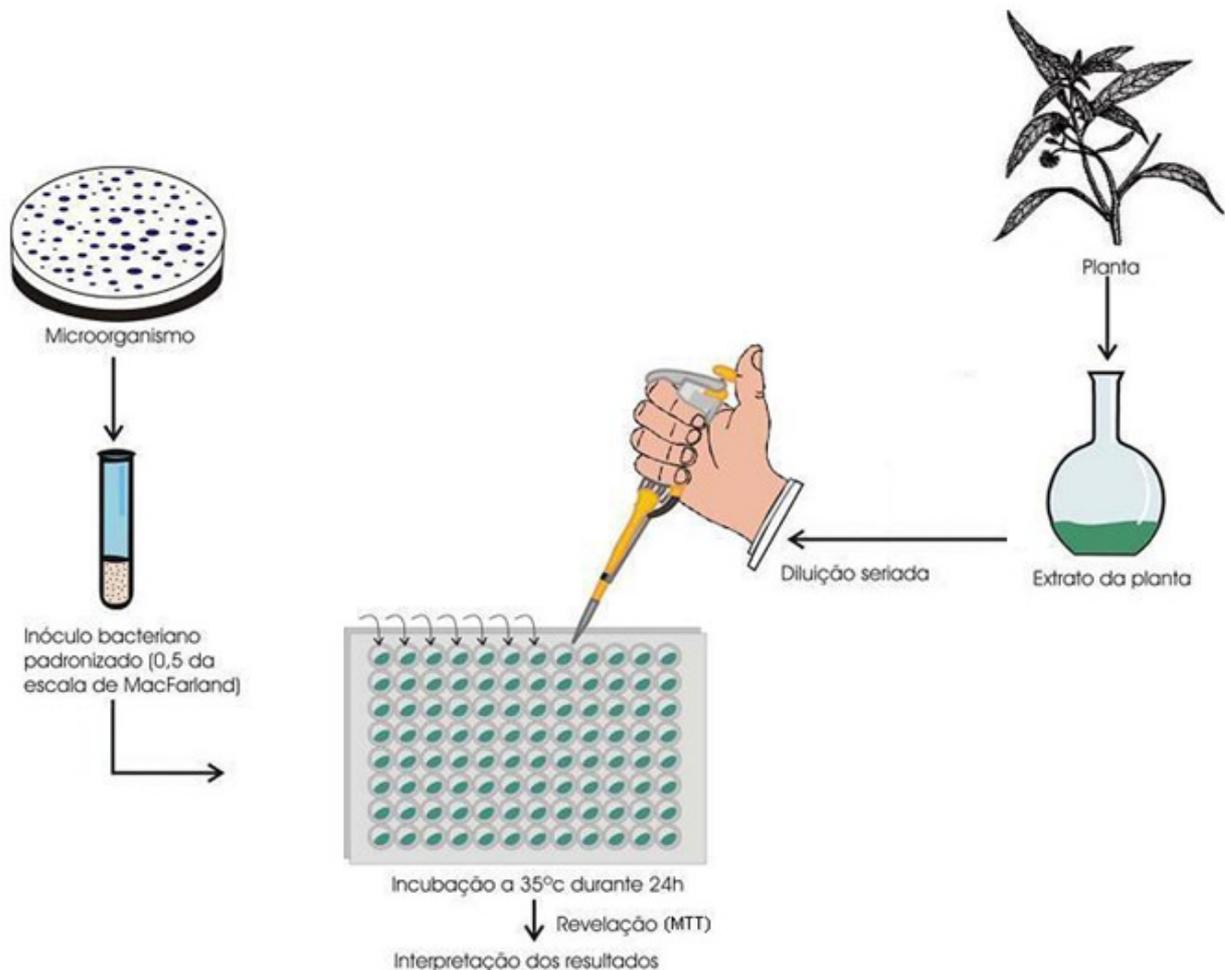


Figura 3. Representação esquemática do método de microdiluição em placas de Elisa para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Fonte: Adaptado de Oliveira, 2005.

Os microorganismos utilizados para a realização da pesquisa foram os seguintes: bactérias Gram - positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); bactérias Gram - negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Salmonella sp* (Isolado clínico) (QUADRO 3. Essas cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará/UFPA. As cepas foram mantidas em caldo nutritivo à temperatura ambiente. Para os ensaios, todas as cepas foram semeadas novamente

em caldo nutritivo e incubadas a 37°C, para promover seu crescimento após tempo de latência.

4.5 Avaliação da atividade cicatrizante do extrato hidroalcolólico de *Vatairea guianensis* sobre feridas cutâneas abertas de segunda intenção no dorso de ratos

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Fármacos da UNIFAP, em Macapá. A etapa relacionada à avaliação histológica e preparação das lâminas foram realizadas em parceria com a Universidade Tiradentes (UNIT), em Aracajú, no Estado de Sergipe. O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação e aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da UNIFAP, sendo aprovado através do parecer nº 005A / 2009.

4.5.1 Animais

Para a realização da avaliação da atividade cicatrizante, foram utilizados 25 (vinte e cinco) ratos da linhagem Wistar, variedade albino, fêmeas, pesando entre 200 e 290g, e idade de 110 a 160 dias, procedentes do Biotério do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amapá.

Durante a etapa experimental, os animais devidamente identificados, foram mantidos em caixas individuais de polietileno sem maravalha. As gaiolas foram higienizadas duas vezes ao dia, e mantidas em condições ambientais de temperatura e umidade controladas com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais permaneceram com livre acesso a água e ração (Labina®) ao longo de todo o experimento (Figura 3).



Figura 4. Animais condicionados em caixas individuais

Os animais foram distribuídos em igual número e aleatoriamente em 5 grupos com 5 animais ($n = 5/\text{grupo}$) cada e identificados da seguinte maneira:

Grupo 1 – Grupo controle positivo

Nesse grupo, os animais receberam por via tópica, o medicamento Fibrinase (desoxirribonuclease 666 U/g + fibrinolisinina 1 U/g + clorafenicol 0,01 g/g), na dose de 36,88mg/kg.

Grupo 2 - Grupo controle negativo

Nesse grupo, os animais receberam por via tópica, solução aquosa de cloreto de sódio a 0,9% (Soro fisiológico)

Grupo 3 - Grupo experimental – 500 mg/kg

Nesse grupo os animais receberam aplicação por via tópica do extrato bruto diluído em solução salina, na dose de 500mg/kg 1 vez por dia, durante 7 dias.

Grupo 4 - Grupo experimental – 250 mg/kg

Nesse grupo os animais receberam aplicação por via tópica do extrato bruto diluído em solução salina, na dose de 250 mg/kg 1 vez por dia, durante 7 dias.

Grupo 5 - Grupo experimental – 100 mg/kg

Nesse grupo os animais receberam aplicação por via tópica do extrato bruto diluído em solução salina, na dose de 100 mg/kg.

A aplicação por via tópica ocorreu imediatamente após o procedimento cirúrgico para todos os grupos, sendo que as feridas não receberam nenhum tipo de curativo, entretanto, foram higienizadas diariamente antes das aplicações com soro fisiológico, permanecendo em exposição ao meio ambiente durante todo o tempo de experimentação.

Todos os grupos foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico e acompanhados por um período de 7 dias de tratamento. Decorrido este tempo, os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de CO₂.

4.5.2 Procedimentos para o ensaio *in vivo*

- **Procedimento anestésico:**

Todos os grupos foram submetidos à anestesia geral, utilizando Tiopental sódico 45 mg/kg (Laboratório Crisalia, S. Paulo, Brasil), administrados por via intraperitoneal e foram considerados anestesiados pela imobilidade do corpo, porém com frequência e amplitude respiratória normais.

- **Procedimento cirúrgico para realização das feridas cutâneas:**

Após a anestesia, procedeu-se imediatamente em todos os animais a tricotomia da região dorsal superior, com máquina de tosa delimitando uma área retangular de aproximadamente 3 cm x 5 cm (Figura 4).

Em seguida, com o auxílio de um *punch* descartável com 6 mm de diâmetro, as feridas foram demarcadas na pele (Figura 4) de cada animal na área tricotomizada, por rotação da borda cortante do *punch* e posteriormente retirado um

fragmento de pele circular seguindo a área demarcada pelo referido *punch*, com auxílio de tesoura e pinça de procedimento cirúrgico até a exposição da fáscia muscular dorsal (Figura 4). A hemostasia foi realizada por compressão digital com gase esterilizada, embebida em solução salina 0,9%. Não foi utilizado nenhum tipo de analgesia, nem curativos, no pós-operatório dos animais estudados.



Figura 5. Procedimentos de tricotomia nos animais (A); demarcação da ferida (B); retirada do fragmento circular de pele da área demarcada (C).

▪ Procedimento de mensuração e registro fotográfico das feridas

Imediatamente após a obtenção das feridas, iniciou-se o procedimento de mensuração por meio de paquímetro digital ZAAS Precision-Digital Caliper 0-150mm e o registro fotográfico com câmera fotográfica digital modelo “Cyber-shot”, (Sony), 12,1 mega pixels. Esses procedimentos foram realizados diariamente de maneira padronizada logo após o procedimento cirúrgico até o último dia de experimento, nos quais obteve-se as medidas tanto no sentido crânio caudal como látero-lateral (Figura 5 e 6, respectivamente), com o objetivo de avaliar a evolução da cicatrização da ferida através da análise morfométrica.

Considerou-se na mensuração das feridas, a crosta formada após o 2º dia de pós-operatório, sendo todos os dados obtidos, registrados em protocolo próprio do Laboratório de Pesquisa em Fármacos da UNIFAP. Para a obtenção da área das feridas, utilizou-se a seguinte equação:

$$A = \pi.R.r,$$

Onde **A** representa o valor da área calculado em mm², **R** corresponde à metade do diâmetro maior da ferida e **r** a metade do diâmetro menor (PRATA *et al.*,1988).

A partir do valor das medidas obtidas, foi avaliado o grau de contração da ferida expresso em percentual, através da seguinte fórmula (RAMSEY *et al.*, 1995):

$$\text{Percentual de contração da ferida} = (\text{Área inicial} - \text{Área final}) / \text{Área inicial} \times 100$$

Onde a área inicial corresponde ao dia do procedimento cirúrgico (**T₀**) e a área final ao 7º dia de tratamento.

As imagens digitais das feridas foram obtidas imediatamente após o procedimento cirúrgico até o 7º dia de tratamento (Figuras 7, 8, 9, 10,11). Para tanto, a câmera foi acoplada a um suporte fixado perpendicularmente ao plano horizontal, sendo mantida uma distância de 8 cm desse plano, propiciando uma focalização melhor da ferida. As imagens digitalizadas foram armazenadas no formato Windows Bitmap (BMP) e analisadas no programa ImageLab, versão 2.4, Borra, SP, 2000, um programa computadorizado, desenvolvido especificamente para realizar a mensuração da área da ferida em imagens digitais.



Figura 6 - Procedimento da medida crânio - caudal **Figura 7** - Procedimento da medida látero- lateral

- **Procedimento para tratamento dos animais**

Logo após os procedimentos cirúrgicos, mensuração e registro fotográfico das feridas, cada animal conforme o grupo a que pertencia, recebeu o seu tratamento (Figura 7) obedecendo rigorosamente os horários padronizados (18 h – 19 h), realizado uma vez por dia, durante 7 dias.

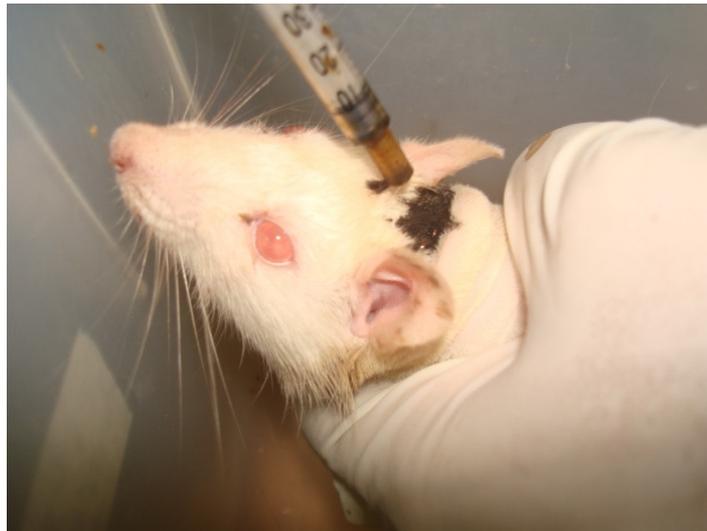


Figura 8. Aplicação do tratamento com extrato no animal

- **Procedimento de sacrifício e biópsia**

Ao final dos 7 dias de tratamento, os animais, por grupo, foram submetidos a eutanásia por inalação de dióxido de carbono em câmara de acrílico. Posteriormente, a ferida foi excisada com margem de segurança, de pele íntegra em torno da lesão, em profundidade até a fáscia muscular, em condições assépticas, realizando-se um corte mediano, tendo sido a peça fixada em solução de formol a 10% para análise histológica.

4.5.3 Avaliação histológica do processo cicatricial por segunda intenção em ratos tratados com o extrato hidroetanólico das sementes de *Vatairea guianensis*

- **Preparação histológica**

Os procedimentos histológicos de preparação das lâminas e leitura microscópica foram realizados no Laboratório de Morfologia da Universidade Tiradentes (UNIT), na cidade de Aracajú - Sergipe. Após a remoção dos espécimes equivalentes a área cicatricial, os fragmentos foram conservados em solução de formol a 10% até o momento da realização do procedimento histológico. As peças foram posteriormente seccionadas transversalmente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina sob a forma de blocos os quais foram montados no micrótomo e obtidos cortes com 5µm de espessura e, a seguir, submetidas à coloração Hematoxilina - eosina (HE) e Picrossirius.

4.5.3.1 Processo de montagem das lâminas

Inicialmente, o material foi submetido à técnica histológica convencional, que incluiu as etapas de fixação, desidratação, diafanização, inclusão e microtomia e montagem dos cortes na lâmina.

- **Fixação**

É considerada a primeira etapa para a montagem das lâminas. No presente estudo optou-se pelo formol de acordo com o protocolo do Laboratório de Morfologia da UNIT- Aracajú - Sergipe.

- **Desidratação**

A desidratação das peças é um processo necessário para que as mesmas possam ser incluídas em parafina. É indispensável que se faça uma substituição gradual com imersão em soluções de álcool com concentrações crescentes (álcool 70%, 80%, álcool absoluto 100% I, 100% II e 100% III) permanecendo uma hora em cada recipiente para completa remoção da água. Porém, álcool e parafina não são miscíveis, havendo a necessidade de substituir o álcool por xilol.

- **Diafanização**

O xilol é um agente diafanizador (solvente da parafina). Desta forma, as peças foram imersas em concentrações crescentes de xilol (xilol I, II e III) permanecendo uma hora em cada recipiente a fim de promover a total substituição do álcool.

- **Inclusão**

A inclusão foi realizada por meio da imersão das peças em dois banhos de parafina, a fim de que o xilol fosse totalmente substituído. Após este procedimento as peças foram emblocadas em parafina e submetidas ao processo de corte em micrótomo.

- **Microtomia e montagem dos cortes sobre as lâminas**

Os blocos foram submetidos ao processo de corte no micrótomo, sendo obedecida a espessura de 5 mm. À medida em que os cortes iam sendo realizados, eram imediatamente colocados em recipiente contendo água a 40°C, para promover o seu estiramento. Em seguida eram posicionados sobre a lâmina e, por fim, levados

à estufa para secagem (40°C) de 15 a 30 minutos. Após esse procedimento as lâminas foram submetidas à etapa de coloração.

▪ Coloração

Esta etapa foi realizada conforme o método de colorações hematoxilina – eosina (HE) para avaliação das características do processo inflamação-reparo e Picrosirius para análise descritiva da deposição de colágeno. O processo consistiu na passagem das lâminas em xilol, álcool e água, promovendo a desparafinização, eliminação do solvente, fixação e hidratação seguindo os procedimentos descritos abaixo:

➤ Método de coloração com HE

1º xilol I	2min
2º xilol II	2min
3º xilol III	2min
4º álcool abs	2min
5º álcool abs	2min
6º álcool 95%	2min
7º álcool 80%	2min
8º álcool 70%	2min
9º água	2min
10º água	2min
11º HE	2min
12º água	2min
13º água	2min
14º eosina	30seg
15º álcool 80%	2min
16º álcool 95%	2min
17º álcool abs	2min
18º xilol I	2min

19º xilol II	2min
20º xilol III	2min

Após o procedimento supracitado, foi realizada a montagem das lâminas, empregando-se o balsamo de Canadá, para fixar a lamínula na lâmina.

➤ Método de coloração Picrossirius

As etapas foram realizadas conforme à HE, com desparafinização, fixação e hidratação. Em seguida, as lâminas com o material foram coradas com a solução de Picrossirius, por 30 minutos. Após esse tempo, lavadas em solução de HCl, 0,01N por 2 minutos, corando em HE por 15 minutos, retirando o excesso com água, desidratando progressivamente em solução alcoólica e clareando com xilol.

Posteriormente, foi realizada a montagem empregando-se o bálsamo de Canadá para fixar a lâmínula, e em seguida, levadas a estufa (40°C) para a secagem.

4.5.3.2 Análise histomorfológica da reação inflamatória

As características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório/reparativo, foram avaliadas através das secções histológicas coradas em HE, considerando os seguintes critérios: intensidade e tipo do infiltrado inflamatório.

A intensidade do processo inflamatório foi analisada e determinada conforme os seguintes critérios: (1) - quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituíram menos de 10% da população celular observada na área da ferida cirúrgica; (2) - quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo constituíram entre 10% a 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica; (3) - quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo constituíram mais de 50% da população celular da área da ferida cirúrgica.

Determinou-se o tipo de reação inflamatória, considerando-se de forma quantitativa as diferentes células inflamatórias individualmente, a saber: neutrófilos,

eosinófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos, identificadas pela sua morfologia específica. Dessa forma, para esta análise foram obedecidos os seguintes critérios: (1) - quando o fenótipo celular, estudado correspondeu a menos de 10% do total de células inflamatórias infiltradas na área da ferida; (2) - quando o fenótipo celular estudado correspondeu a mais de 10% e menos de 50% do total de células inflamatórias na área da ferida; (3)-quando o fenótipo celular estudado correspondeu a mais de 50% do total de células inflamatórias na área da ferida. Após a semi quantificação, a reação inflamatória foi categorizada com o fenótipo inflamatório predominante em Inflamação aguda (quando houve o predomínio de neutrófilos e/ou eosinófilos); Inflamação sub aguda (quando houve o equilíbrio entre neutrófilos e/ou eosinófilos e linfócitos e plasmócitos); Inflamação crônica inespecífica (quando predominaram linfócitos e/ou plasmócitos) e inflamação crônica granulomatosa (quando predominaram macrófagos e/ou gigantócitos). A reação de granulação foi categorizada obedecendo os seguintes critérios: (1) quando a fase proliferativa foi predominantemente endotelial; (2) quando a fase proliferativa exibiu característica vascular e (3) quando a fase proliferativa apresentou característica fibrovascular.

4.5.3.3 Avaliação do padrão de deposição de fibras colágenas durante a cicatrização de feridas tratadas com o extrato hidroetanólico bruto das sementes de *Vatairea guianensis*.

O fragmento de pele excisado, foi fixado em formol, processado adequadamente com técnicas histológicas de rotina e emblocado em parafina. Secções histológicas de 5µm foram obtidas e submetidas à coloração Picrossirius (Sirius Red), específica para estudo da deposição colagênica, analisada em microscopia de luz polarizada.

A análise de todos os grupos foi realizada de forma descritiva, detendo-se na identificação do colágeno, classificando-o em tipo I ou III, de acordo com a birrefringência apresentada (esverdeada, amarelo esverdeada, amarelo ouro, laranja e vermelha), observação quanto ao aspecto da densidade das fibras (frouxa, moderada, densa), disposição dos feixes (reticular, paralelo, entrelaçado) e espessura (delgado-delicado, espesso-delicado, grosseiro-delicado).

4.6 Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroetanólico obtido das sementes de *Vatairea guianensis* (Aublet)

No ensaio de toxicidade aguda foram utilizados 30 camundongos machos (Swiss-albino) pesando 20 a 30g, divididos em grupos de 10, os quais receberam dose única de 2000 mg/kg e outro grupo recebeu a dose de 5000 mg/kg do extrato diluído em tween 80 a 1%, administrados por via oral por meio de uma sonda orogástrica em experimentos independentes e cada grupo foi comparado ao controle negativo representado por 10 animais que receberam água destilada. Em seguida, os animais foram observados por um período de 4 horas ininterruptas após a administração, para avaliação de possíveis alterações comportamentais e registros de mortes, segundo o método descrito por Malone;Robichaud (1962). Os animais continuaram sendo avaliados por um período adicional de 14 dias, com acesso a água e comida “*ad libitum*”. Este ensaio, obedeceu as diretrizes da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) Guideline 425.

5 - Análise estatística

Os resultados da avaliação macroscópica estão apresentados como média \pm e.p.m (erro padrão da média), e foram considerados estatisticamente significantes os resultados que apresentaram a probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($p < 0,05$). Para comparação das médias foram utilizados a ANOVA, seguida do método de múltiplas comparações, teste de Student-Newman-Keuls. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico InStat e SigmaStat.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos bruto hidroetanólico, hexânico, metanólico e clorofórmico das sementes de *Vatairea guianensis* Aublet

Os extratos das sementes de *Vatairea guianensis* Aublet foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de bactérias patogênicas, escolhidas neste experimento por serem recomendados como microrganismos padrões para testes de suscetibilidade antimicrobiana, sendo responsáveis por várias formas de infecção em humanos, além de adquirirem com mais frequência, resistência aos antimicrobianos.

Para a determinação do teste da CIM foi utilizado o método de microdiluição empregando-se MTT (5mg/mL), utilizando-se 4 cepas bacterianas, conforme citadas anteriormente, sendo duas do grupo gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e duas do grupo Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella sp* - isolado clínico Lab.Microb.UFPA)

Os resultados de atividade antimicrobiana por meio da CIM pelo método da microdiluição, revelaram que o extrato bruto hidroetanólico das sementes de *Vatairea guianensis* frente a *S.aureus* apresentou CIM na concentração 3,12 µg/mL (A) e a concentração bactericida mínima (CBM) evidente na concentração 6,25 µg/mL(B) (Figura 9).

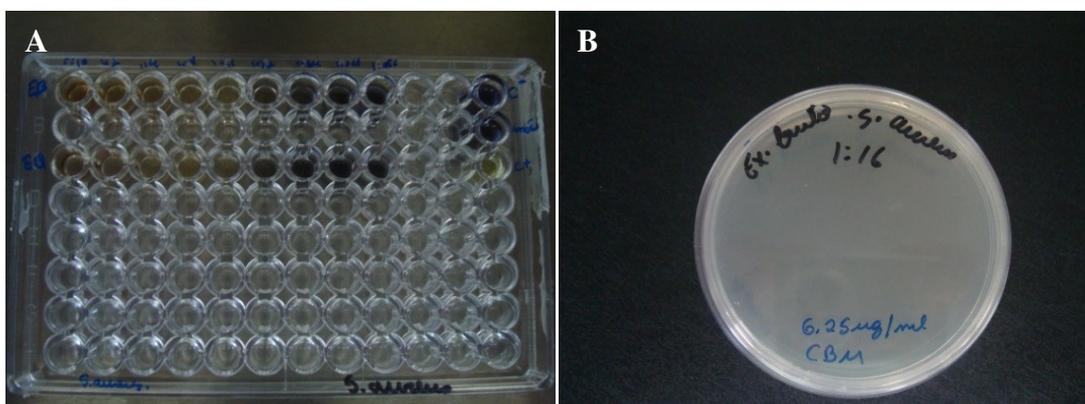


Figura 9. Ensaio de CIM do extrato bruto hidroetanólico de *Vatairea guianensis* frente a *S aureus* (.A). Concentração bactericida mínima do extrato bruto hidroetanólico de *Vatairea guianensis* frente a *S. aureus* (B)

Em relação ao extrato hexânico, a CIM foi evidenciada na concentração 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seta (A) e a CBM na concentração 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B) (Figura 10).

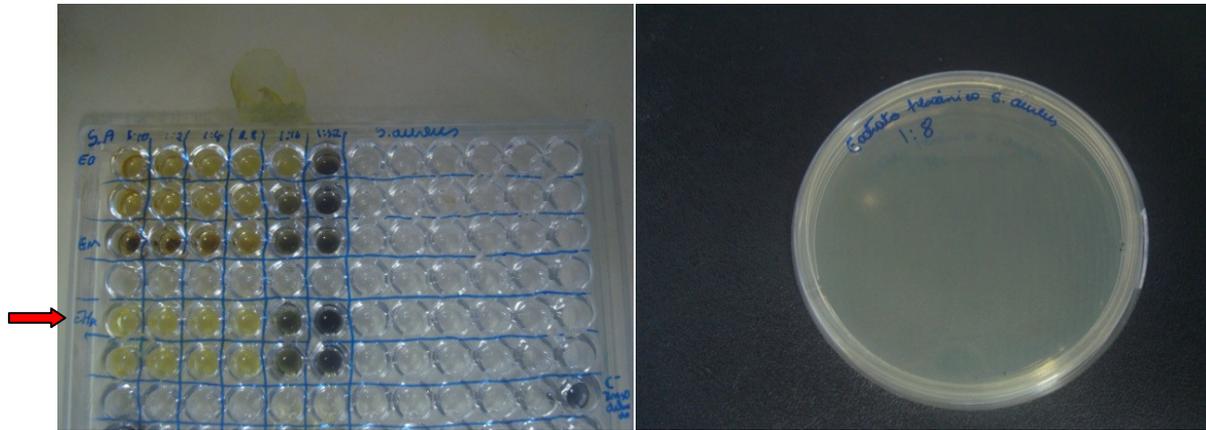


Figura 10. Ensaio de CIM do extrato hexânico de *Vatairea guianensis* frente a *S aureus*. (A) Concentração bactericida mínima do extrato hexânico de *Vatairea guianensis* frente a *S. aureus*. (B)

Quanto ao extrato clorofórmico a CIM mais efetiva foi na concentração 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seta (A) e a CBM 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B) (Figura 11).

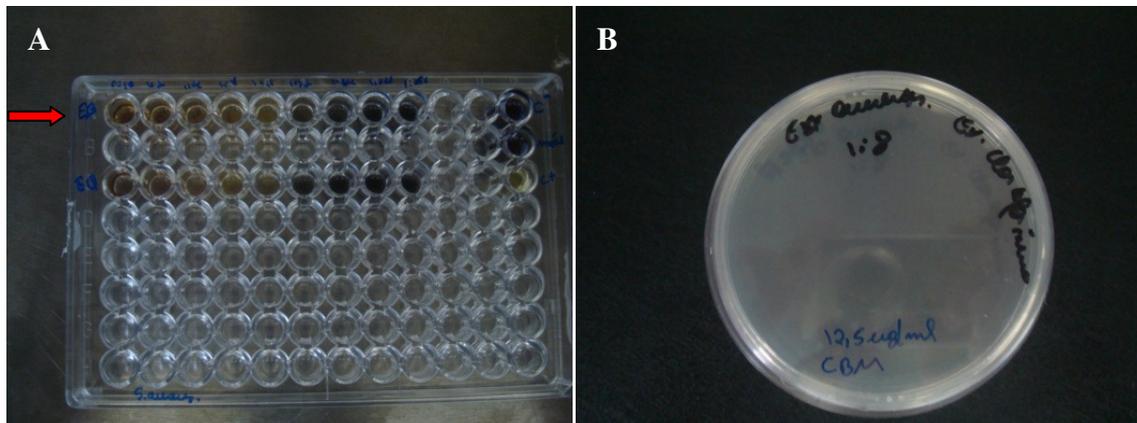


Figura 11. Ensaio de CIM do extrato clorofórmico de *Vatairea guianensis* frente a *S aureus* (A) . Concentração bactericida mínima do extrato clorofórmico de *Vatairea guianensis* frente a *S. aureus* (B).

Em relação ao extrato metanólico a CIM contra *S.aureus* evidenciou-se na concentração 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seta (Figura A) e a CBM na concentração 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B) (Figura12).

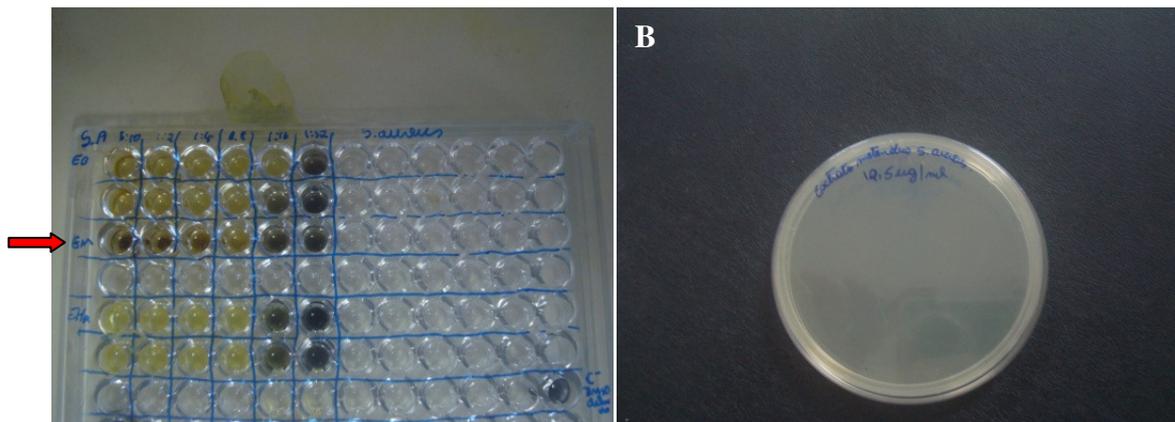


Figura 12. Ensaio de CIM do extrato metanólico de *Vatairea guianensis* frente a *S aureus* (A). Concentração bactericida mínima do extrato metanólico de *Vatairea guianensis* frente a *S. aureus* (B).

Os resultados de atividade antimicrobiana por meio da CIM pelo método da microdiluição, revelaram que o extrato bruto hidroetanólico das sementes de *Vatairea guianensis* frente a *E. faecalis* apresentou CIM na concentração 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (A) e a concentração bactericida mínima (CBM) foi evidente na concentração 25 $\mu\text{g/mL}$ (B) (Figura 13).

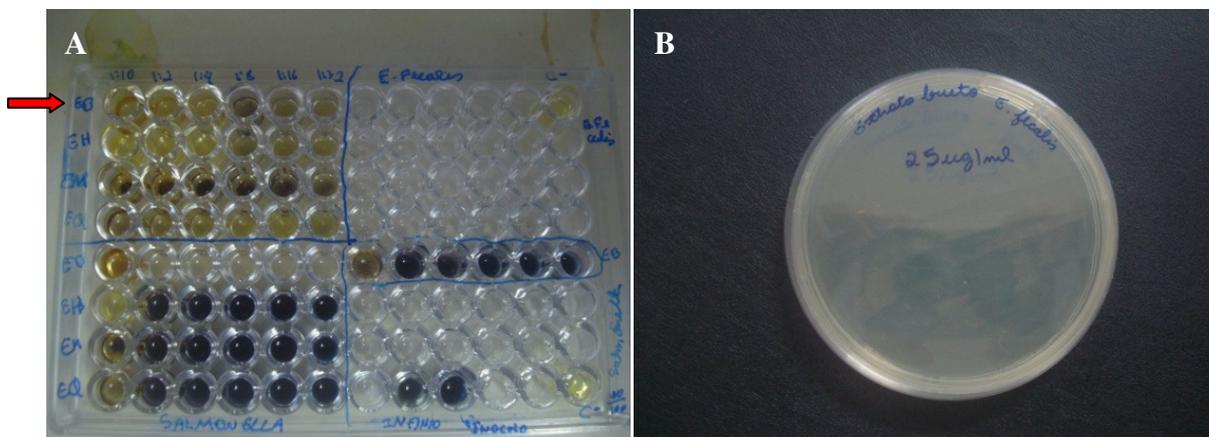


Figura 13. Ensaio de CIM do extrato bruto de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis* (A). Concentração bactericida mínima do extrato bruto hidroetanólico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis* (B).

Em relação ao extrato hexânico, a CIM foi evidenciada na concentração 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (A) e a CBM na concentração 25 $\mu\text{g/mL}$ (B) (Figura 14).

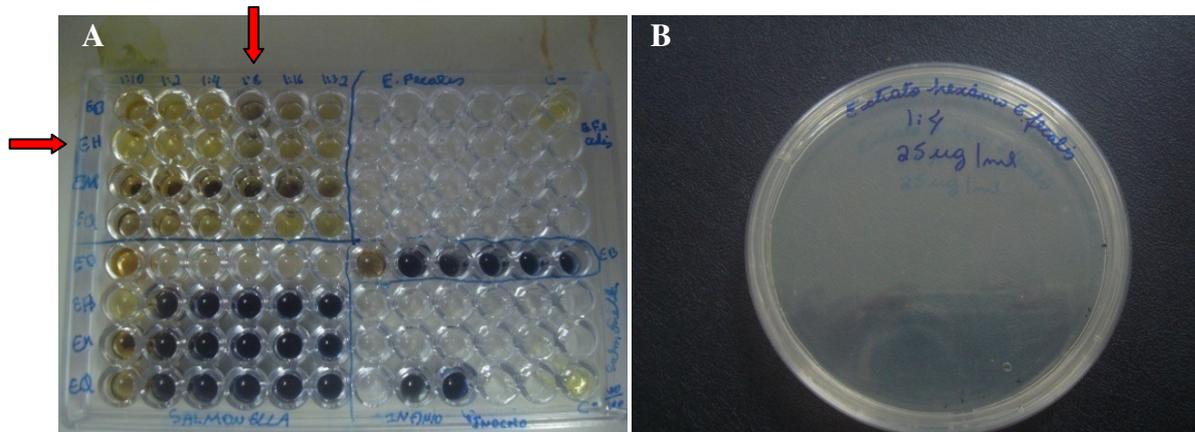


Figura 14. Ensaio de CIM do extrato hexânico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis* (A). Concentração bactericida mínima do extrato hexânico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis*. (B)

Quanto ao extrato clorofórmico a CIM mais efetiva foi na concentração 3,12 $\mu\text{g/mL}$ (A) e a CBM 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (B) (Figura 15).

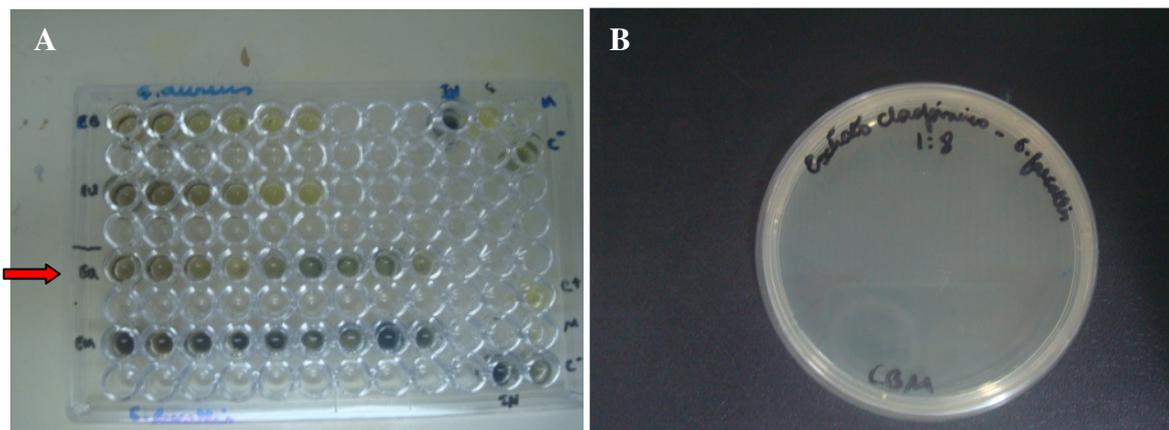


Figura 15. Ensaio de CIM do extrato clorofórmico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis* (A). Concentração bactericida mínima do extrato clorofórmico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis* (B).

Em relação ao extrato metanólico a CIM contra *E. faecalis* apresentou-se na concentração 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (A) e a CBM na concentração 50 $\mu\text{g/mL}$ (B) (Figura 16).

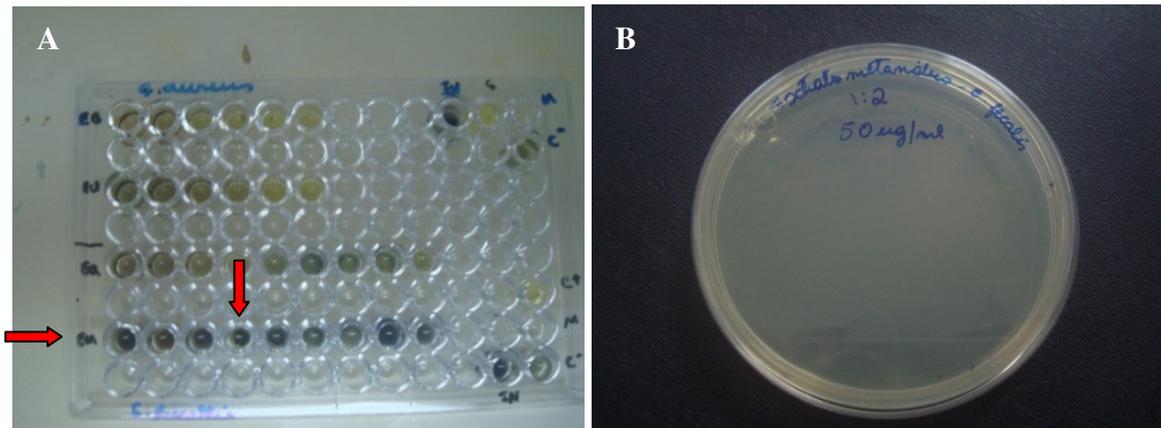


Figura 16. Ensaio de CIM do extrato metanólico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis* (A). Concentração bactericida mínima do extrato metanólico de *Vatairea guianensis* frente a *E faecalis* (B).

Quanto à atividade antimicrobiana dos extratos frente a *Pseudomonas aeruginosa* pelo método da microdiluição, os resultados revelaram que todos os extratos apresentaram CIM na concentração de 25 µg/mL (Figura 17) e os extratos bruto hidroetanólico, hexânico e clorofórmico apresentaram CBM na concentração de 100 µg/mL. Apenas o extrato metanólico demonstrou CBM na concentração de 50 µg/mL (Figura 18).

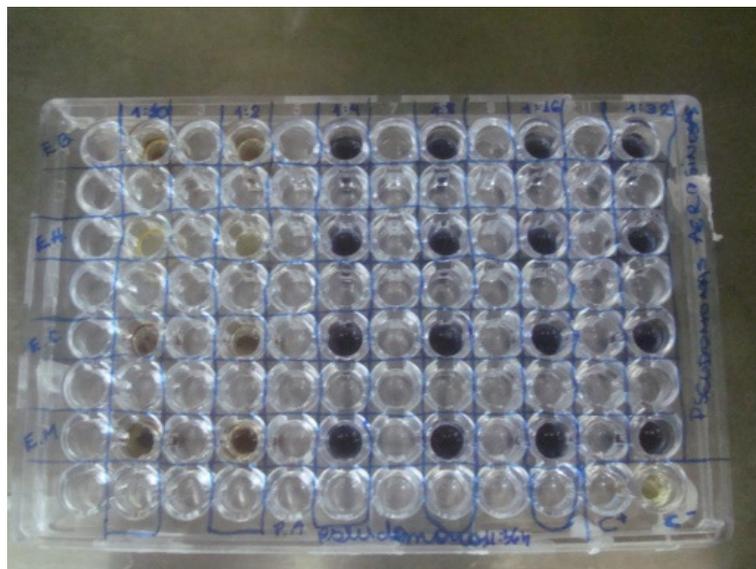


Figura 17. Ensaio de CIM dos extratos bruto hidroetanólico, hexânico, clorofórmico e metanólico de *Vatairea guianensis* frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

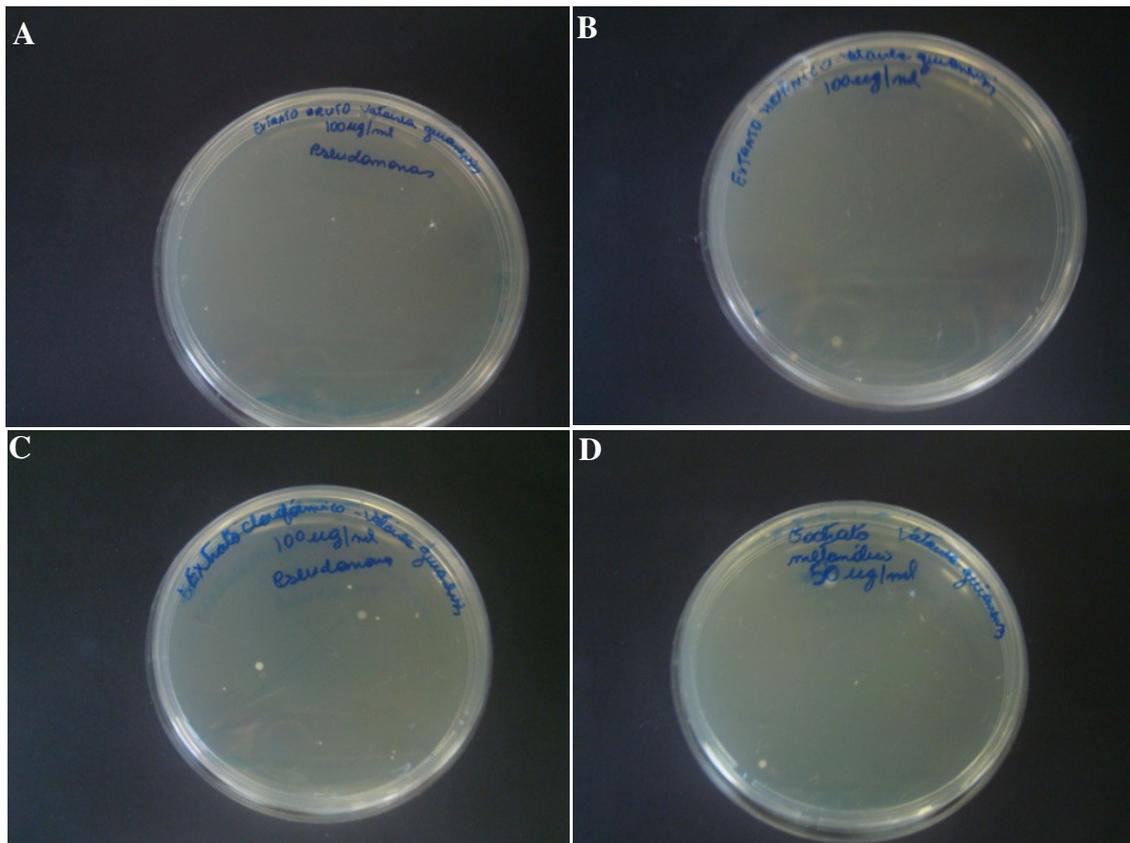


Figura 18. Concentração bactericida mínima dos extratos bruto (A) hidroetanólico, (B) hexânico, (C) clorofórmico e (D) metanólico de *Vatairea guianensis* frente a *P. aeruginosa*.

Em relação a *Salmonella sp*, os extratos clorofórmico e metanólico foram ativos apresentando CIM na concentração de 50 µg/mL e CBM na concentração de 100µg/mL (Figura 19). Não foi possível a determinação dos extratos bruto hidroetanólico e hexânico no presente trabalho.

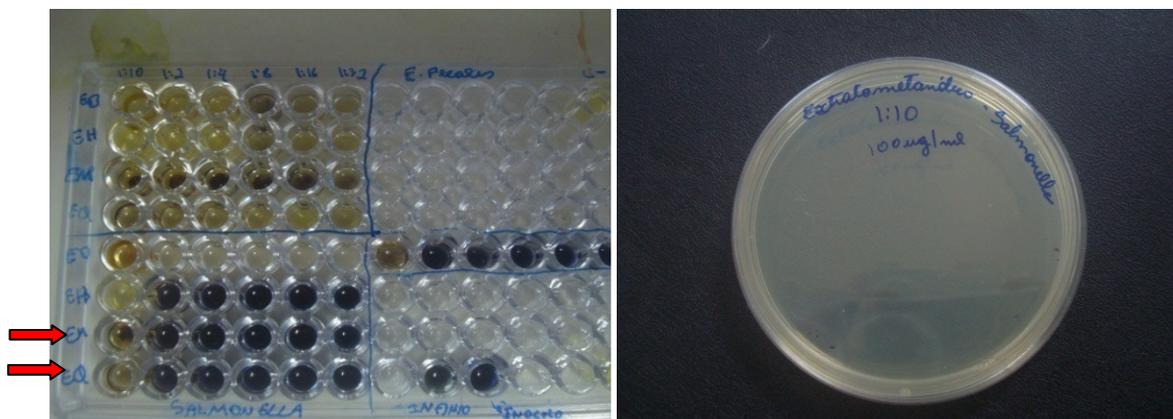


Figura 19. Ensaio de CIM dos extratos clorofórmico e metanólico de *Vatairea guianensis* frente a *Salmonella sp*. (A). Concentração bactericida mínima do extrato metanólico de *Vatairea guianensis* frente a *Salmonella sp* (B)



Figura 20. Concentração bactericida mínima do extrato clorofórmico de *Vatairea guianensis* frente a *Salmonella sp.*

O resumo dos resultados de atividade antimicrobiana estão descritos na tabela 12 .

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos obtidos das sementes de *Vatairea guianensis*, determinadas pelo método de microdiluição em caldo.

Extratos (µg/ml)	Microrganismos							
	<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>Salmonella sp</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Extrato bruto hidroetanólico	3,12	6,25	12,5	25	25	100	ND	ND
Extrato Hexânico	6,25	12,5	12,5	25	25	100	ND	ND
Extrato Clorofórmico	3,12	12,5	3,12	12,5	25	100	50	100
Extrato Metanólico	6,25	12,5	12,5	50	25	50	50	100

Os números estão expressos em µg/mL. ND= não determinado

6.2 Avaliação da atividade cicatrizante do extrato hidroetanólico de *Vatairea guianensis* em feridas cutâneas de segunda intenção no dorso de ratos

6.2.1 Avaliação macroscópica da contração da ferida

O acompanhamento da contração ou retração da ferida nos diferentes grupos foi realizado durante os 7 dias de tratamento (Figuras 21, 22, 23, 24 e 25). Na análise macroscópica, verificou-se a evolução da cicatrização da ferida de cada grupo, levando-se em consideração o diâmetro das medidas crânio-caudal e látero-lateral mensurados de forma padronizada, imediatamente após o procedimento cirúrgico (T_0) e após o 7º dia de tratamento.

Os valores médios diários da área das feridas de cada grupo estão apresentados nas tabelas 2, 3, 4, 5 e 6. Os dados mostram que em relação à evolução da cicatrização da contração da ferida, houve redução da lesão em todos os grupos no tempo decorrido durante o experimento. Entretanto, no 3º, 5º e 7º dia de tratamento ($p < 0,05$ - teste de Student-Newman-Keuls), o grupo tratado com a dose de 100 mg/kg do extrato hidroetanólico bruto das sementes de *Vatairea guianensis* apresentou área menor quando comparado ao grupo controle negativo (solução salina). Essa dose apresentou também diferença estatisticamente significativa, em relação à área da ferida, quando comparada ao grupo controle positivo fibrinase no 5º dia ($p < 0.01$ teste de Student-Newman-Keuls).

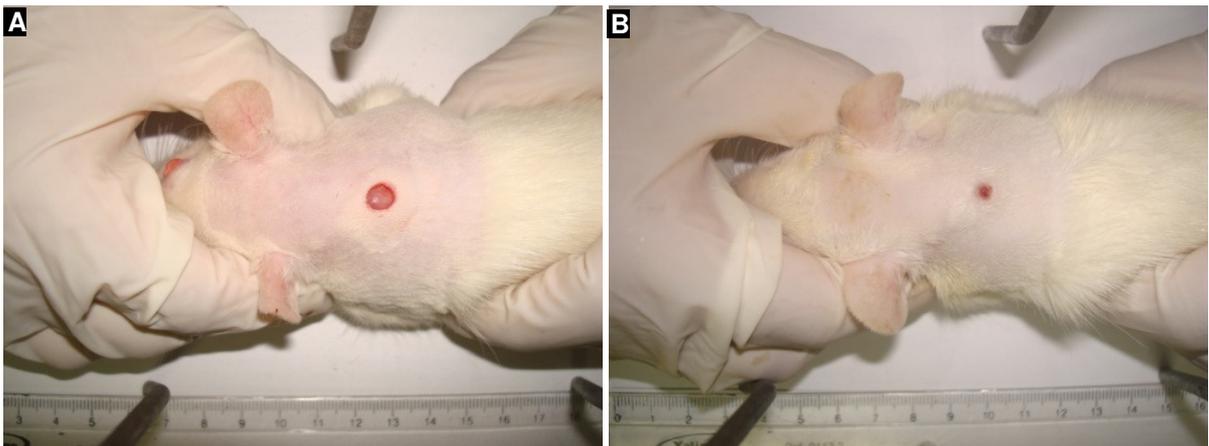


Figura 21 - Avaliação macroscópica da contração das feridas no grupo controle positivo, fibrinase, no dia do procedimento (A) e ao sétimo dia de pós-operatório (B).

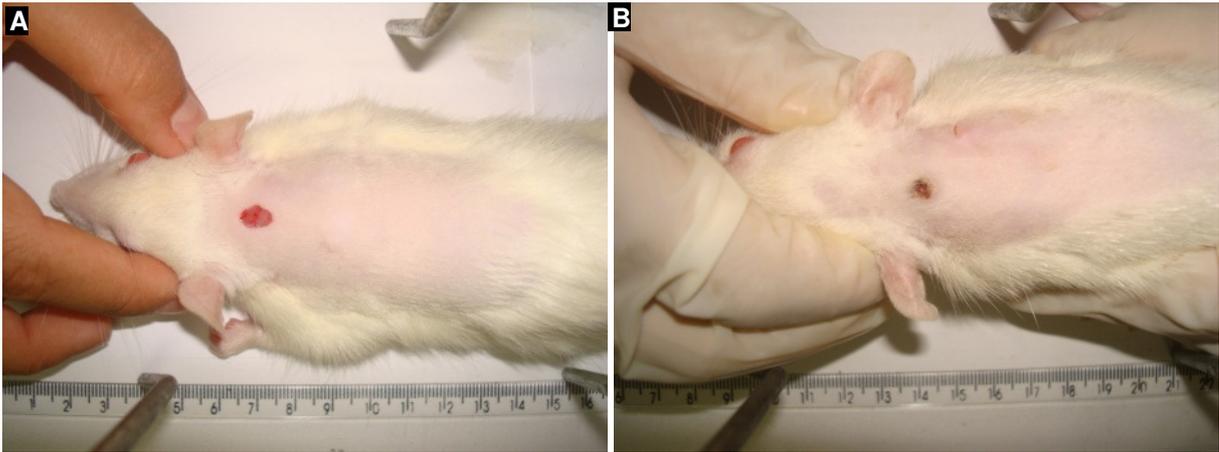


Figura 22. Avaliação macroscópica da contração das feridas no grupo controle negativo - solução salina, no dia do procedimento (A) e ao sétimo dia de pós-operatório (B).

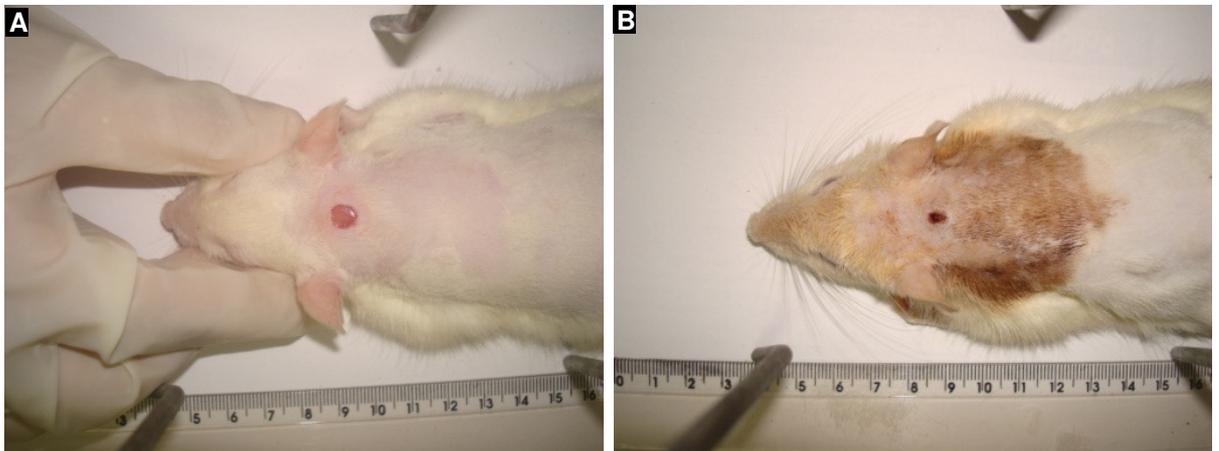


Figura 23. Avaliação macroscópica da contração das feridas no grupo experimental G3 500mg/kg, no dia do procedimento (A) e ao sétimo dia de pós-operatório (B).

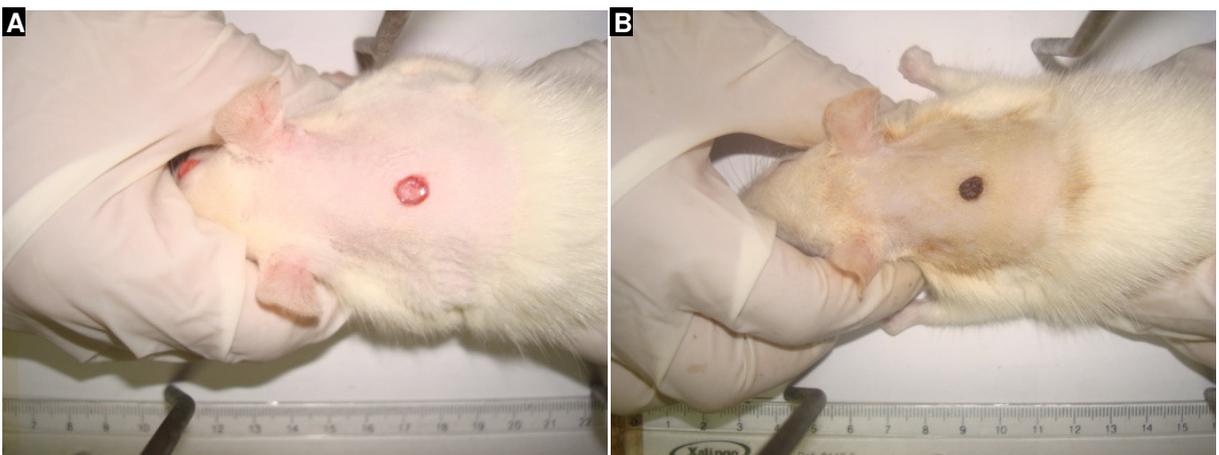


Figura 24. Avaliação macroscópica da contração das feridas no grupo experimental G4 250mg/kg, no dia do procedimento (A) e ao sétimo dia de pós-operatório (B).

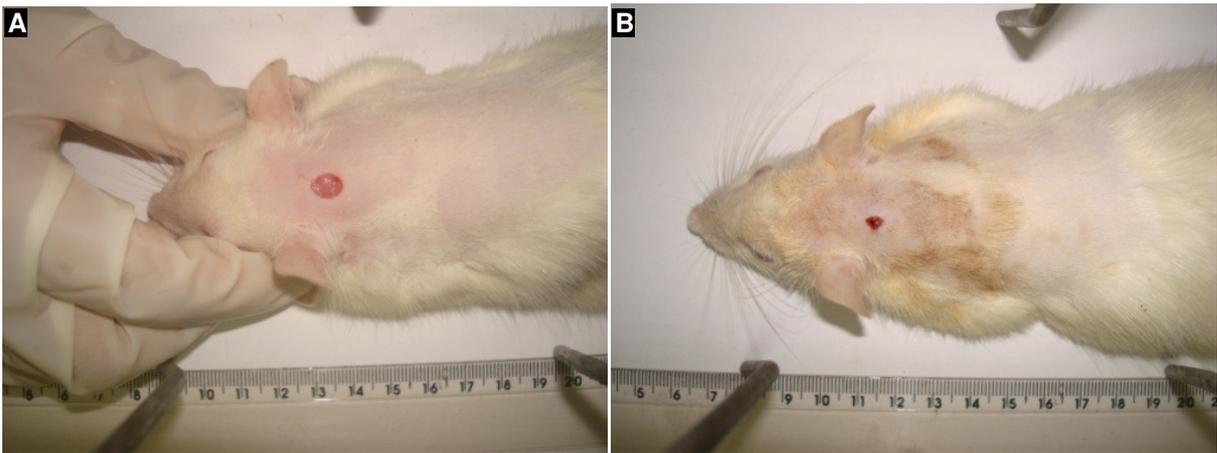


Figura 25. Avaliação macroscópica da contração das feridas no grupo experimental G5 100mg/kg, no dia do procedimento (A) e ao sétimo dia de pós-operatório (B).

Os resultados obtidos nas condições experimentais neste trabalho revelaram que, em relação ao percentual de contração, o grupo controle positivo (Fibrinase) apresentou média de percentual de contração de **79,37%**, já no grupo controle negativo (solução salina) a média foi de **77,69%**, no grupo G3 dose 500 mg/kg o percentual foi de **74,79%**, no grupo dose 250 mg/kg, foi **64,07%** e no grupo dose 100 mg/kg a média foi de **77,89%** (tabela 7, figura 27). Notadamente, observou-se variação de percentuais nos diferentes grupos ao sétimo dia, no entanto estatisticamente não houve diferença significativa quando comparados ao grupo controle negativo (Figura 26).

Tabela 7. Área média das feridas (mm^2) no pós-operatório imediato, 7º dia e percentual de contração nos diferentes grupos experimentais.

Grupo	Dia do pós-operatório imediato (T_0) (mm^2)	7º dia (mm^2)	Contração (%)
Controle positivo-Fibrinase	32.90±2.02	6.79±1.18	79.37
Grupo teste 500 mg/kg	29.59±1.80	7.42±1.30	74.79
Grupo teste 250 mg/kg	30.39±1.66	10.97±2.71	64.07
Grupo teste 100 mg/kg	25.77±2.39	5.52±0.40	77.89
Controle negativo Solução salina 0,9%	41.80±3.65	9.08±0.45	77.69

Os números representam a média \pm e.p.m de 5 animais.

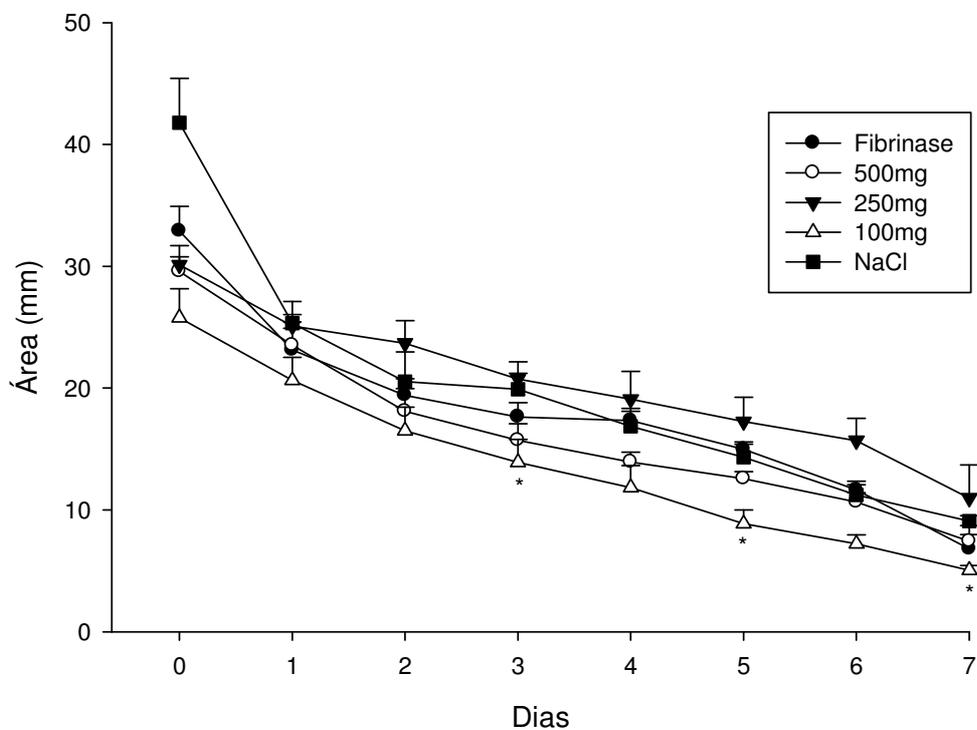


Figura 26. Efeito do tratamento tópico do extrato hidroetanólico bruto de *Vatairea guianensis* (500 mg/kg, 250 mg/kg, 100 mg/kg), Fibrinase (36,88 mg/kg), Solução salina (0,5 mL /animal) sobre feridas em ratos Wistar durante 7 dias de tratamento (n=5/ grupo). Teste de Student- Newman- Keuls para múltiplas comparações $p^* < 0,05$.

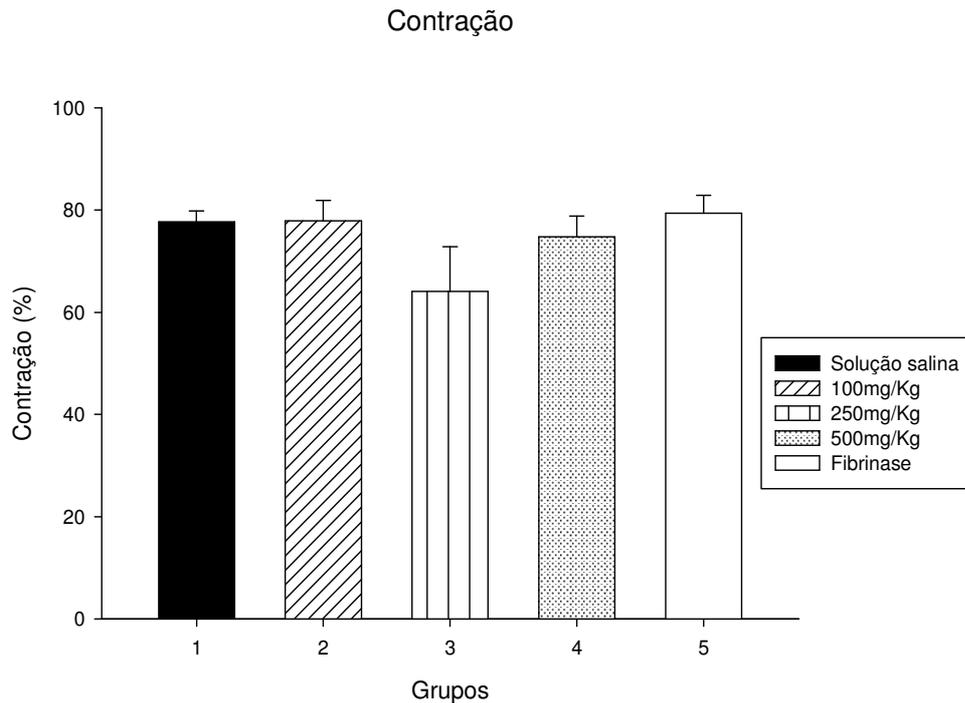


Figura 27. Efeito do tratamento tópico do extrato hidroetanólico bruto de *Vatairea guianensis* (500 mg/kg, 250 mg/kg, 100 mg/kg), Fibrinase (36,88 mg/kg), Solução salina (0,5 mL /animal) sobre feridas em ratos Wistar durante 7 dias de tratamento (n=5/ grupo). As barras representam o percentual médio de contração da área das feridas de cada grupo (solução salina, 100 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg e Fibrinase) desde o procedimento cirúrgico até o dia 7º dia de tratamento de evolução pós cirúrgica.

6.3 Avaliação do processo cicatricial por segunda intenção em ratos tratados com o extrato hidroetanólico obtido das sementes de *Vatairea guianensis*.

6.3.1 Análise histomorfológica da reação inflamatória

Conforme apresentado na tabela 8, ao sétimo dia o grupo G1 - controle positivo - exibiu reação inflamatória de intensidade moderada com padrão de infiltração de célula inflamatória, categorizada como crônica, em função da observação de uma quantidade mais expressiva de leucócitos mononucleares (linfócitos) na porção superficial da ferida. Além disso, verificou-se também grande quantidade de vasos sanguíneos repletos de hemáceas, caracterizando reação de granulação predominantemente vascular (Figura 28, 29 e 30)

Tabela 8. Efeito do tratamento tópico com fibrinase (36,88 mg/kg) sobre feridas em ratos Wistar durante 7 dias de tratamento (n=5). Análise morfológica ao sétimo dia após o procedimento cirúrgico, da Intensidade inflamatória e reação de granulação.

G1	Espécimes				
	R1	R2	R3	R4	R5
Neutrófilos	1	1	2	1	2
Linfócitos	3	3	2	3	2
Plasmócitos	1	1	1	1	1
Macrófagos	1	1	1	1	1
Gigantócitos	0	0	0	0	0
Eosinófilos	0	0	0	0	0
Reação de granulação	2	2	1	2	1
Intensidade da inflamação	2	2	3	2	3

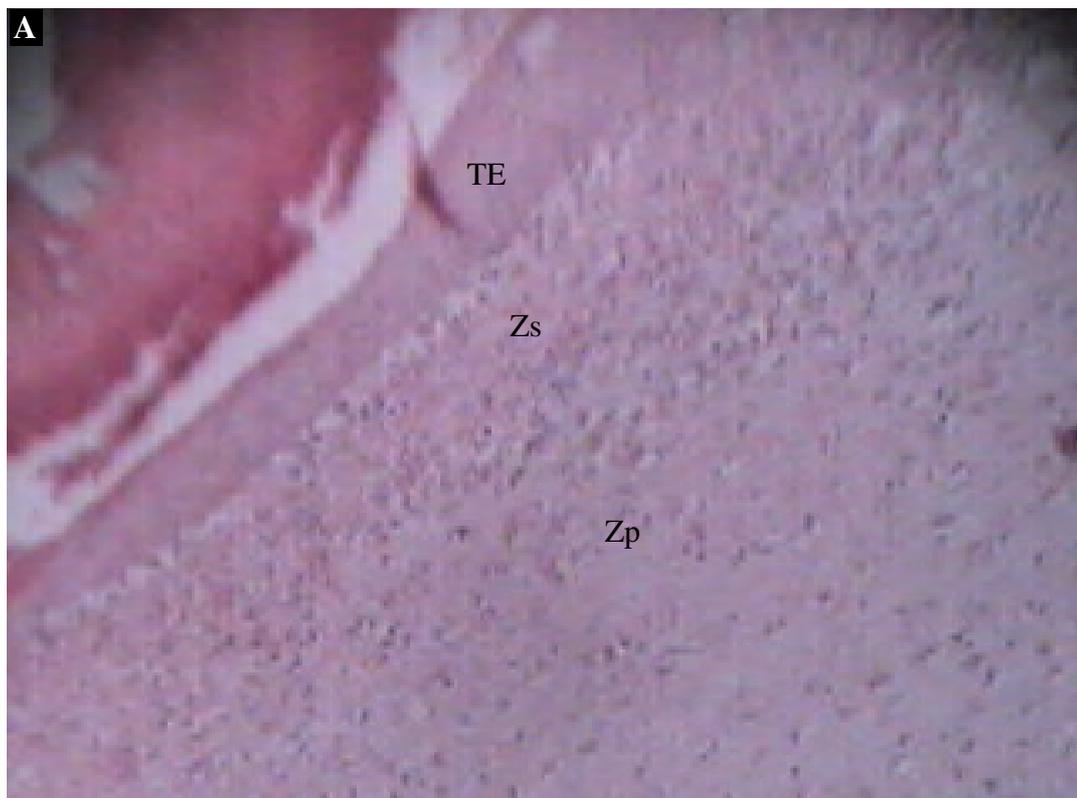


Figura 28. Moderada infiltração leucocitária com predomínio de monucleares ao 7º dia em G1 na zona superficial da ferida (Zs) e reação de granulação evidente na zona profunda (Zp) da ferida, TE (tecido epitelial). (HE, 10x) (A).

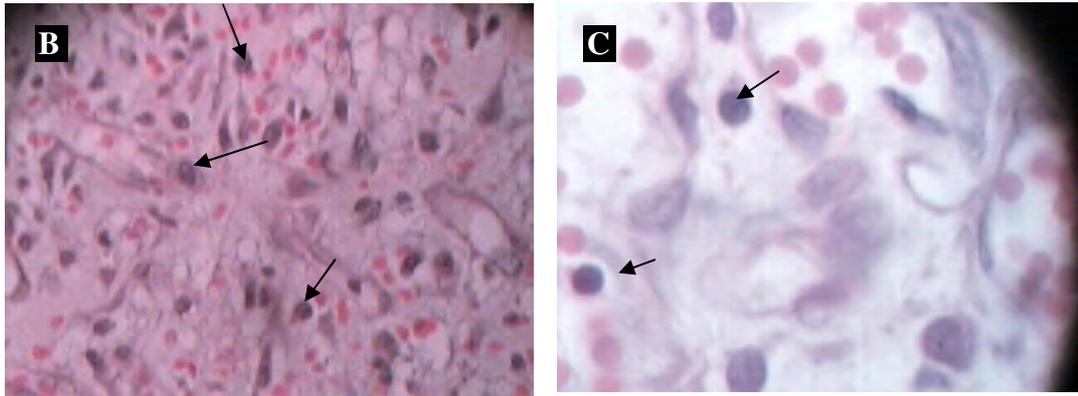


Figura 29. Reação inflamatória crônica com maior expressão de leucócitos mononucleares (linfócitos) (setas), presença de vasos repletos de hemáceas e fibrilas delicadas de colágeno em G1, (B) e (C) (HE, 40x).

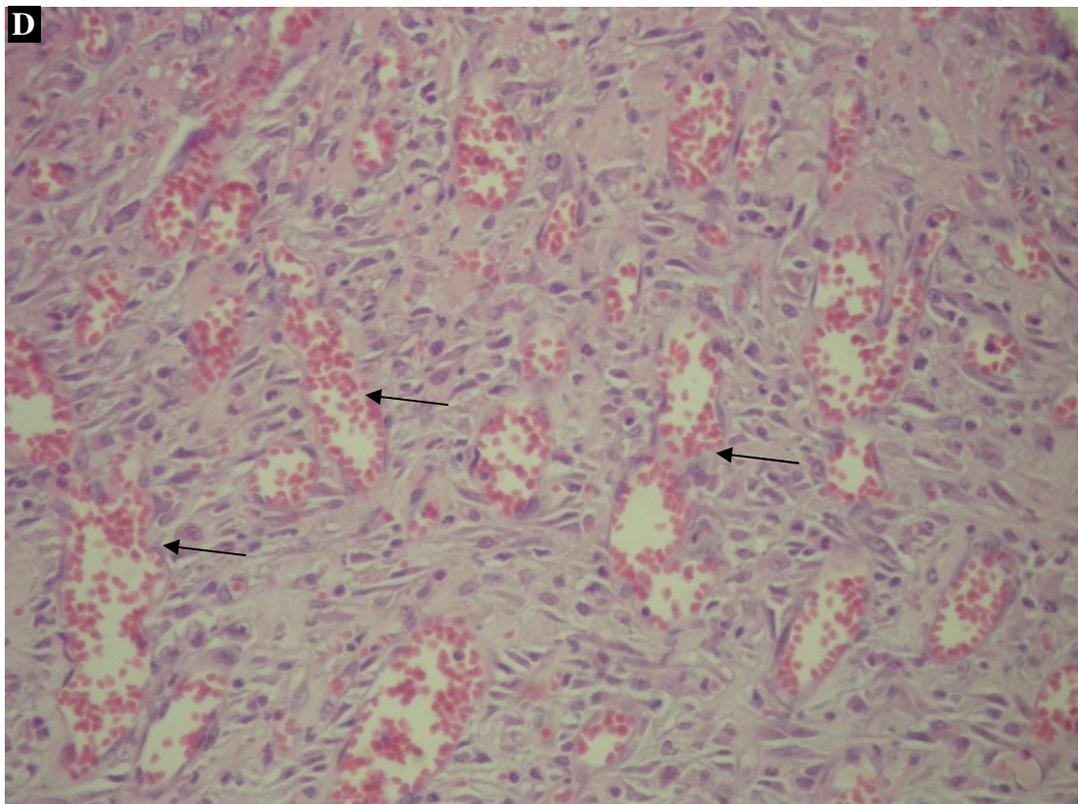


Figura 30. Reação de granulação predominantemente vascular em G1, (HE, 10x) ao sétimo dia com pouca infiltração na zona superficial da ferida e presença de vasos e fibras delicadas e paralelas de colágeno; vasos sanguíneos congestionados repletos de hemáceas (setas) (D).

O grupo G2 - controle negativo -, de acordo com os dados apresentados na tabela 9, ao sétimo dia apresentou inflamação de intensidade significativa com padrão de infiltração inflamatória categorizada como subaguda, em função da predominância de polimorfonucleares (neutrófilos) na superfície em adição aos

mononucleares linfócitos na região mais profunda e presença marcante de edema (Figura 31).

Tabela 9. Efeito do tratamento tópico com solução salina (0,5 mL /animal) sobre feridas em ratos Wistar durante 7 dias de tratamento (n=5). Análise morfológica ao sétimo dia após o procedimento cirúrgico, da Intensidade inflamatória e reação de granulação.

G2	Espécimes				
	R1	R2	R3	R4	R5
Neutrófilos	2	-	2	1	2
Linfócitos	2	-	2	2	2
Plasmócitos	1	-	1	2	1
Macrófagos	1	-	1	1	1
Gigantócitos	0	-	0	0	0
Eosinófilos	0	-	0	0	0
Reação de granulação	1	-	1	3	1
Intensidade da inflamação	3	-	3	2	3

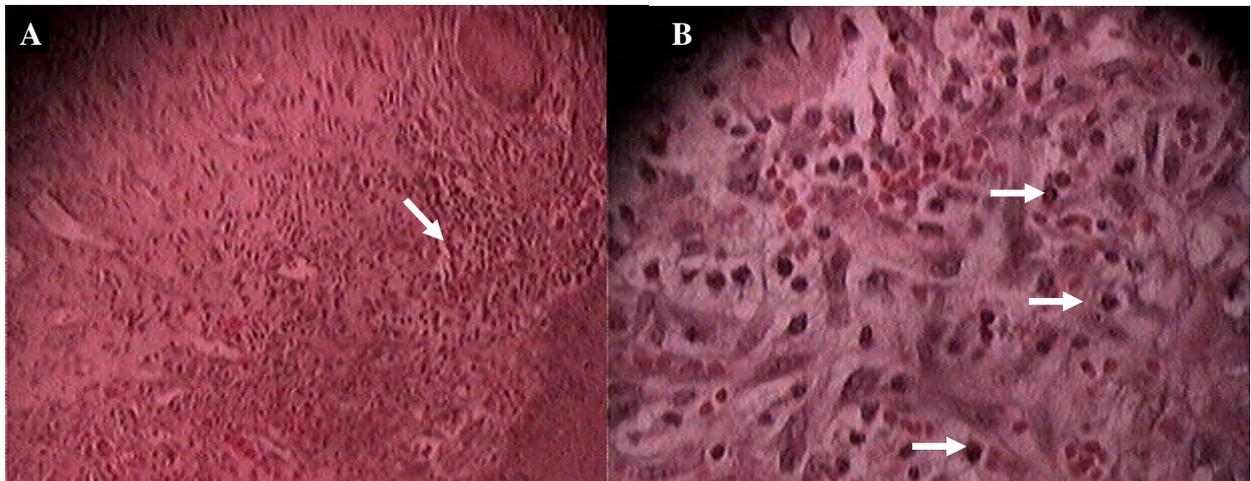


Figura 31. Infiltração leucocitária neutrofilica na superfície, linfocítica na profundidade e edema em G2 ao 7º dia caracterizando inflamação subaguda (A). (HE 10x). Neutrófilos na superfície (setas) (B) (HE 40x)

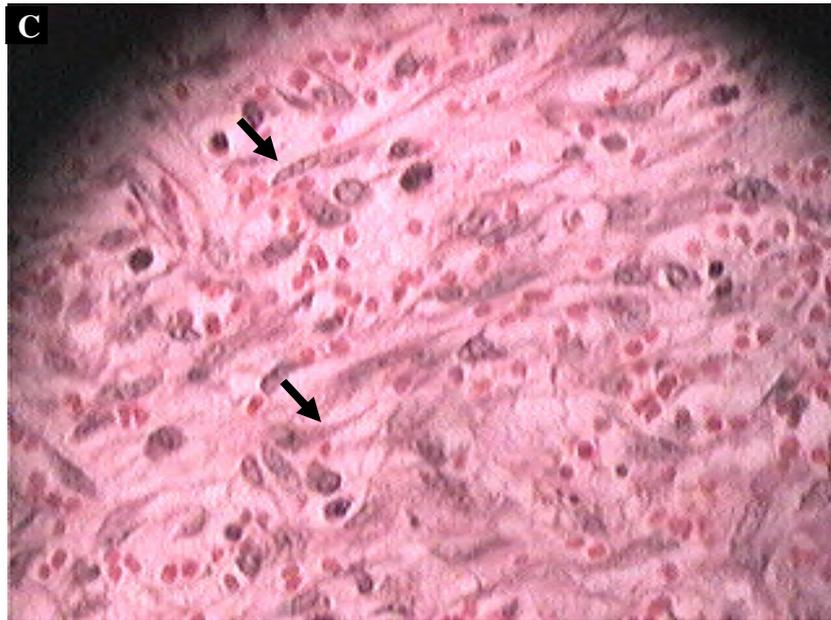


Figura 32. Reação de granulação ao 7º dia em G2, apresentando fase predominante endotelial, exibindo tecido conjuntivo com densidade frouxa, fibras reticulares de aspecto delgado e delicado mas com tendência ao paralelismo. Presença de células fusiformes sugerindo fibroblastos (setas) (C) (HE, 40x).

No grupo experimental G3 - tratado com extrato hidroetanólico bruto de *Vatairea guianensis* na dose de 500mg/kg -, conforme dados apresentados na tabela 10, ao sétimo dia, exibiu inflamação de intensidade moderada com padrão de infiltração inflamatória categorizada como crônica, em função da observação de uma quantidade mais expressiva de leucócitos mononucleares (linfócitos) (Figura 33).

Tabela 10. Efeito do tratamento tópico do extrato hidroetanólico bruto de *Vatairea guianensis* (500 mg/kg) sobre feridas em ratos Wistar durante 7 dias de tratamento (n=5/ grupo). Análise morfológica ao sétimo dia após o procedimento cirúrgico da Intensidade inflamatória e reação de granulação.

G3	Espécimes				
	R1	R2	R3	R4	R5
Neutrófilos	1	1	1	1	2
Linfócitos	3	3	3	3	2
Plasmócitos	1	1	1	1	1
Macrófagos	1	1	1	1	1
Gigantócitos	0	0	0	0	0
Eosinófilos	0	0	0	0	0
Reação de granulação	2	2	3	2	1
Intensidade da inflamação	2	2	2	3	3

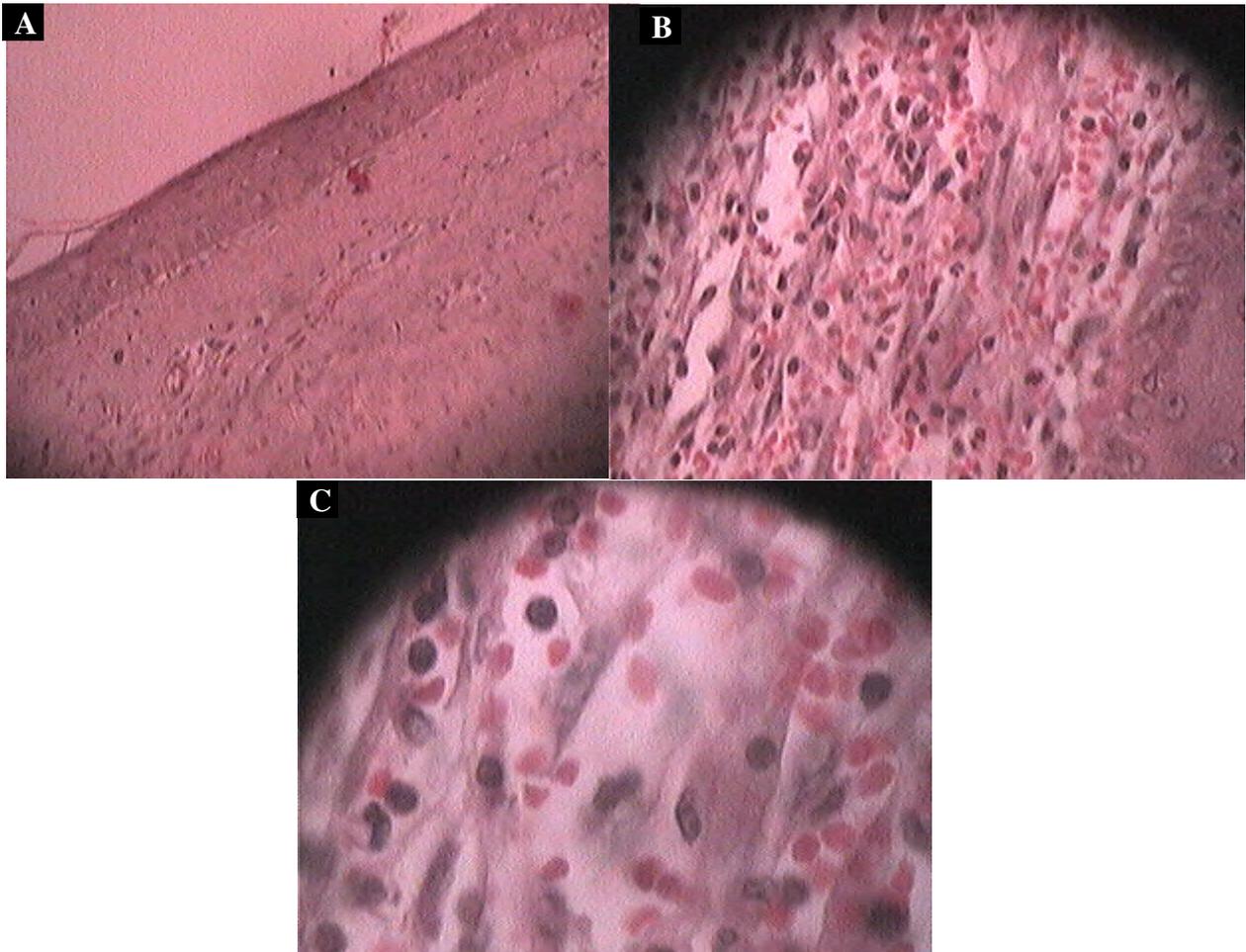


Figura 33. Pouca infiltração leucocitária em G3 (A) (HE,10x) mas com evidente infiltração linfocítica (B e C) (HE, 40x) (HE, 100x).



Figura 34. Reação de granulação ao 7º dia em G3, apresentando fase predominante vascular exibindo feixes de fibras colágenas com disposição reticulada e aparência delgada e delicada . Presença de células fusiformes sugerindo fibroblastos (D) (HE, 40x).

O grupo experimental G4, 250mg/kg, por sua vez, apresentou de acordo com a tabela 11, inflamação de intensidade significativa, porém com padrão de infiltração

inflamatória categorizada como subaguda, em razão da observação de uma quantidade equilibrada de neutrófilos e linfócitos, além de exibir proliferação de células com núcleos ovóides com cromatina dispersa compatíveis com células endoteliais (Figura 35) (Figura 36).

Tabela 11. Efeito do tratamento tópico do extrato hidroetanólico bruto de *Vatairea guianensis* (250 mg/kg) sobre feridas em ratos Wistar durante 7 dias de tratamento (n=5). Análise morfológica ao sétimo dia após o procedimento cirúrgico, da Intensidade inflamatória e reação de granulação.

G4	Espécimes				
	R1	R2	R3	R4	R5
Neutrófilos	1	2	2	2	2
Linfócitos	3	2	2	2	2
Plasmócitos	1	1	1	1	1
Macrófagos	1	1	1	1	1
Gigantócitos	0	0	0	0	0
Eosinófilos	0	0	0	0	0
Reação de granulação	1	1	1	1	3
Intensidade da inflamação	2	3	3	3	2

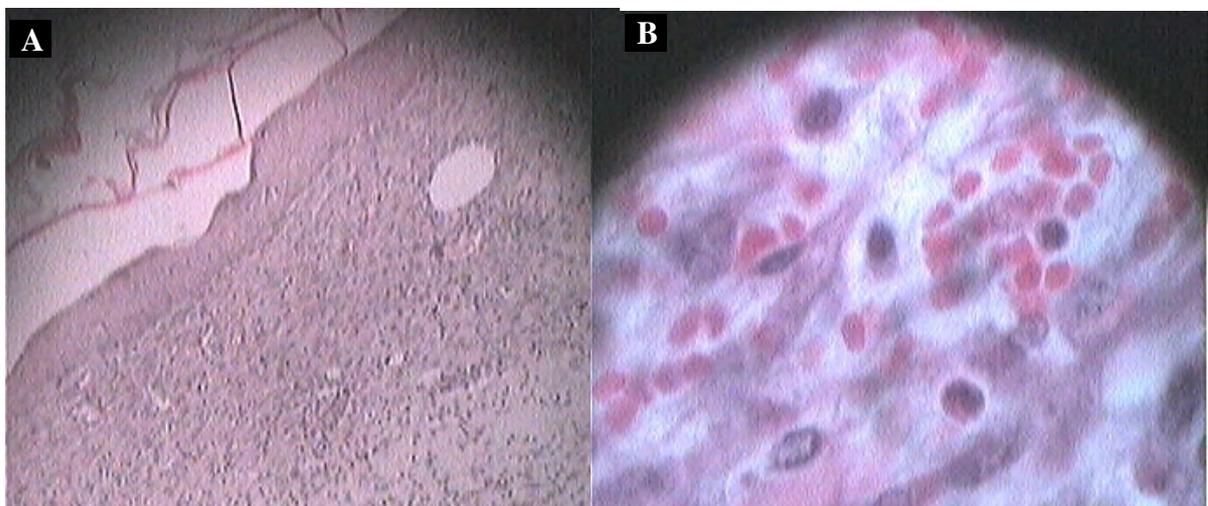


Figura 35. Infiltração leucocitária neutrofílica e linfocítica ao 7º dia em G4 caracterizando reação inflamatória subaguda (A) (HE, 10x) e (B) (HE, 100x).

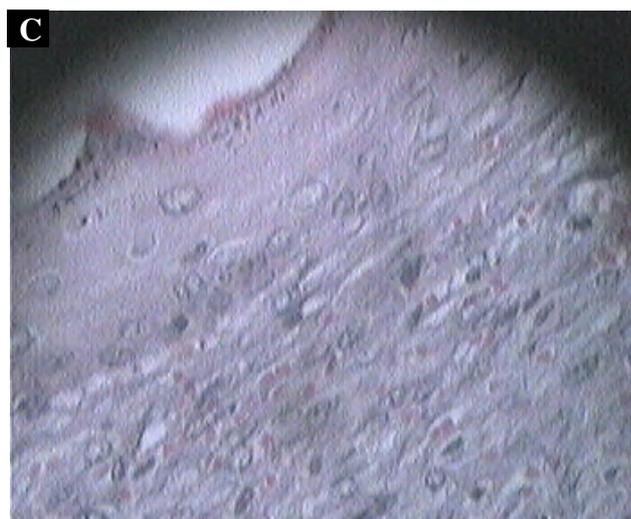


Figura 36. Reação de granulação em G4 com proliferação de células com núcleos ovóides compatíveis com células endoteliais na superfície com tecido conjuntivo frouxo e fibras colágenas de aspecto reticular e delicadas (C) (HE,40x).

E, por fim, o grupo experimental G5 - tratado com 100mg/kg -, conforme tabela 12, exibiu inflamação de intensidade substancial com padrão de infiltração inflamatória categorizada como subaguda, em função da observação de uma quantidade expressiva equilibrada de neutrófilos e linfócitos com reação de granulação predominantemente endotelial (Figura 37) (Figura 38).

Tabela 12. Efeito do tratamento tópico do extrato hidroetanólico bruto de *Vatairea guianensis* (100 mg/kg), sobre feridas em ratos Wistar durante 7 dias de tratamento (n=5). Análise morfológica ao sétimo dia após o procedimento cirúrgico, da Intensidade inflamatória e reação de granulação.

G5	Espécimes				
	R1	R2	R3	R4	R5
Neutrófilos	2	2	2	1	2
Linfócitos	2	2	2	2	2
Plasmócitos	1	1	1	1	1
Macrófagos	1	1	1	1	1
Gigantócitos	0	0	0	0	0
Eosinófilos	0	0	0	0	0
Reação de granulação	1	1	1	3	1
Intensidade da inflamação	3	3	3	2	3

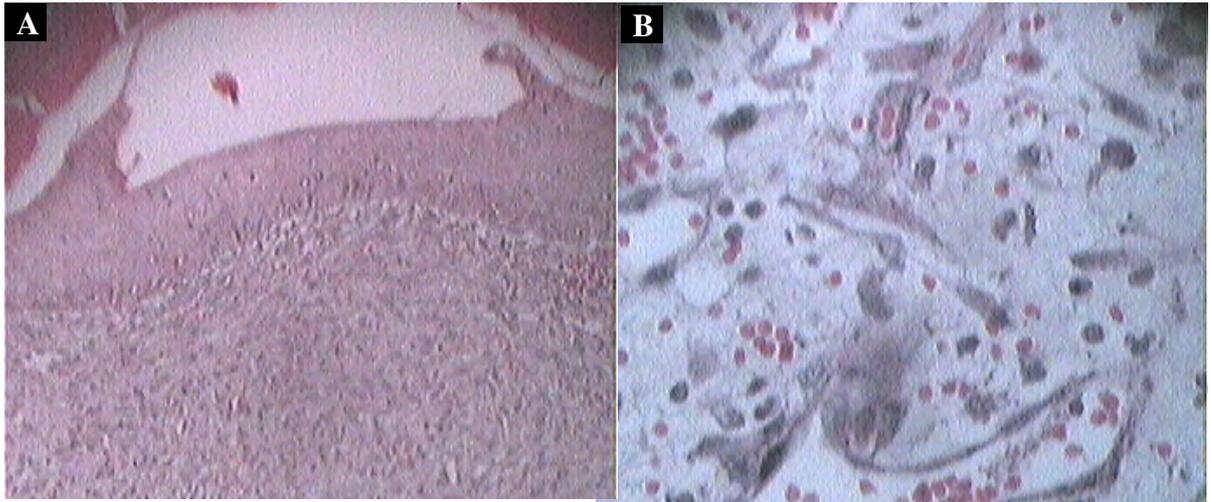


Figura 37. Infiltração leucocitária neutrofílica e linfocítica ao 7º dia em G5 caracterizando reação inflamatória subaguda (HE,10x) (A), observa-se o equilíbrio de linfócitos e neutrófilos (B) (HE, 100x).

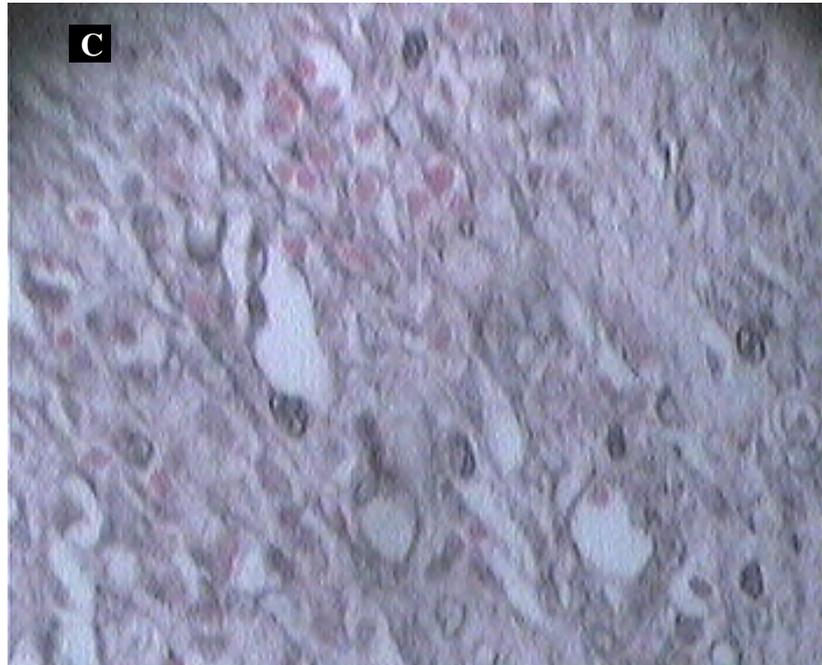


Figura 38. Reação de granulação caracterizada como endotelial em G5, apresentando tecido com fibras frouxamente arranjadas e reticulares mas com tendência ao paralelismo (C) (HE,40x)

Ressalta-se que a presença de edema intersticial foi bem mais marcante no Grupo G2 - controle negativo -, quando comparado aos demais, sendo que em G3 - 500 mg/kg, G4 - 250 mg/kg e G5 - 100 mg/kg o edema pareceu menos evidente. Além disso, observou-se que o grupo G3 - 500 mg/kg apresentou comportamento similar ao controle G1 - controle positivo - quanto à intensidade do processo inflamatório, exibindo inflamação do tipo moderada, com o padrão de infiltração categorizada nos dois grupos como crônica inespecífica. Os grupos G4 e G5 apresentaram resultados semelhantes ao G2 - controle negativo, exibindo padrão de infiltração categorizado como subaguda.

Por outro lado, a expressão morfológica da reação de granulação em G1 - controle positivo-, foi categorizada como vascular. Em G2 - controle negativo-, a reação de granulação foi endotelial, com 1 espécime apresentando reação fibrovascular. Já o grupo experimental G3 - tratado com a dose de 500mg/kg, expressou morfológicamente reação de granulação vascular na maioria dos espécimes. Os demais grupos experimentais, de maneira geral, exibiram reação de granulação predominantemente endotelial em grande parte dos espécimes.

O resumo dos resultados acima estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13. Descrição resumida das diferenças morfológicas quanto ao padrão de inflamação, expressão celular e reação de granulação dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Padrão de inflamação	Expressão de células	Reação de granulação
G1 Controle positivo	Crônica	Linfócitos	Vascular
G2 Controle negativo	Sub- aguda	Neutrófilos/linfócitos	Endotelial
G3 Dose 500mg/Kg	Crônica	Linfócitos	Vascular
G4 Dose 250mg/Kg	Sub- aguda	Neutrófilos/linfócitos	Endotelial
G5 Dose 100mg/kg	Sub- aguda	Neutrófilos/linfócitos	Endotelial

6.3.2 Avaliação do padrão de deposição de fibras colágenas na cicatrização de feridas por segunda intenção em ratos tratados com o extrato hidroetanólico das obtido das sementes de *Vatairea guianensis*

As secções coradas em picrossírius examinadas sob luz polarizada, ao sétimo dia, revelaram em G1, controle positivo, a presença predominante de fibras colágenas do tipo III, com birrefringência amarelo esverdeada, frouxamente arranjadas, dispostas reticularmente. Individualmente, as fibras exibiram aparência delgada e delicada.

O grupo G2 controle negativo, por sua vez apresentou especial variedade quanto a birrefringência, exibindo predomínio de fibras amarelo ouro (tipo I) e amarelo esverdeadas (tipo III), com densidade frouxa, dispostas com padrão reticular, maior quantidade de espaços interfibrilares evidentemente mais alargados (tecido conjuntivo mais frouxo) e espessura com aspecto delgado e delicado. De especial interesse, foi a observação, nesse grupo, da presença aparente de maior e melhor quantidade de fibras colágenas do tipo I, e tendência ao paralelismo quando comparado ao G1.

No grupo experimental G3 500 mg/kg as sessões histológicas, revelaram de um modo geral a presença predominante de fibras colágenas do tipo III com birrefringência amarelo esverdeada, frouxamente arranjadas, com disposição reticular e aparência delgada e delicada.

No grupo experimental G4 - 250 mg/kg, as secções revelaram histologicamente o predomínio de fibras colágenas do tipo III, com birrefringência amarelo esverdeada, densidade moderada, dispostas em padrão reticular com aspecto de fibras delgadas e delicadas.

E, por fim, o grupo experimental G5 – 100 mg/kg, exibiu de maneira predominante, fibras colágenas tipo III com birrefringência amarelo esverdeada, frouxamente arranjadas, dispostas de modo reticular com aparência delgada e delicada. Nesse grupo, foi observada a tendência ao paralelismo das fibras, indicando a presença de fibras tipo I (Figura 39).

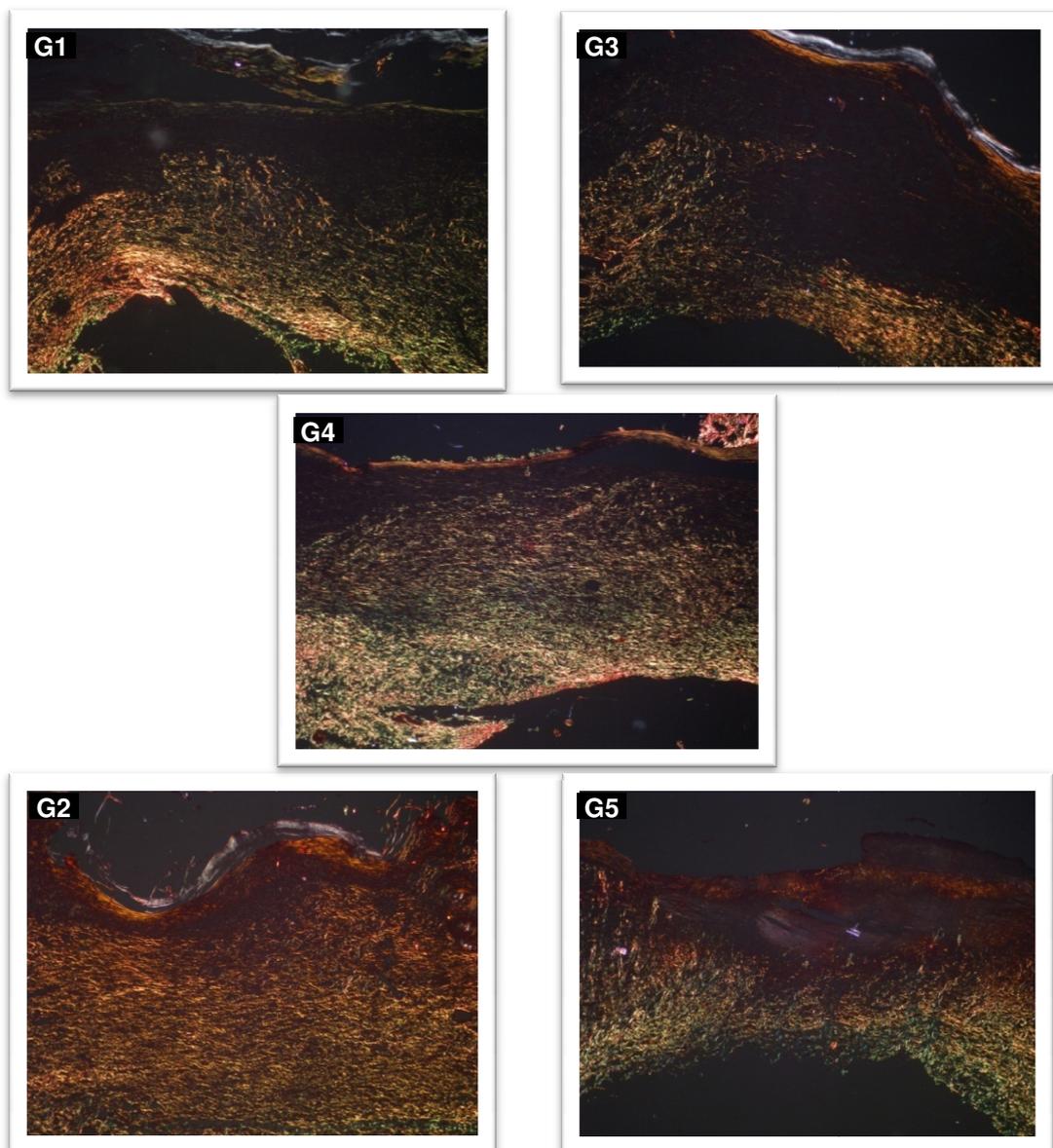


Figura 39. Grupos G1, G3 e G4, exibem predominância de fibras de colágeno predominantemente tipo III (Amarelo esverdeada), frouxamente arranjadas e disposição reticular. Nos grupos G2 e G5, são observadas fibras predominantemente do tipo III, mas com clara deposição de fibras de colágeno do tipo I (ouro), com arranjo paralelos de fibras colágenas.

6.4 Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroetanólico obtido das sementes de *Vatairea guianensis* (Aublet)

A avaliação da toxicidade aguda, por via oral, do extrato nos animais tratados inicialmente com a dose de 2000 mg/kg, no período estabelecido, demonstrou nas condições experimentais deste trabalho que não houve nenhuma alteração de

comportamento conforme descrita por Malone & Robichaud (1962), tais como: a atividade locomotora, piloereção, analgesia, hipoatividade, hiperatividade, lacrimejamento, anestesia, perda de reflexo e de apreensão da pata, alerta, apatia, estereotipia, agressividade, sudorese, micção, diarreia e convulsão. E na dose de 5000mg/kg, também não houve nenhum sinal e sintoma acima descrito. Além disso, nenhuma das doses levou os animais a óbito, o que nos permite sugerir que o extrato hidroetanólico bruto pode ser considerado de baixa toxicidade por via oral, o que pode indicar segurança no seu uso como agente terapêutico.

7 DISCUSSÃO

Quanto ao uso freqüente de *Vatairea guianensis* pela população amazônica, um número reduzido de estudos científicos foram encontrados com relatos sobre o gênero *Vatairea* e da espécie *Vatairea guianensis*.

Nesta perspectiva, avaliou-se, a atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos bruto hidroetanólico, hexânico, clorofórmico e metanólico das sementes de *Vatairea guianensis* frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Salmonella sp* (isolado clínico).

A escolha do solvente utilizado tem relevante importância na extração de substâncias ativas de plantas medicinais. Neste trabalho optou-se especialmente pelo álcool, pelo fato de se aproximar mais da prática popular, sobretudo da terapia com plantas mediante maceração em vinho, álcool de cereais e aguardente (cachaça). Os demais solventes foram escolhidos por ordem crescente de polaridade para avaliar de maneira mais específica o comportamento dos mesmos frente aos microrganismos selecionados, levando-se em consideração que as substâncias responsáveis pela atividade biológica poderiam estar presentes nos extratos por semelhança de solubilidade. Desta forma, foram selecionados os solventes de baixa, média e alta polaridade como o hexano, clorofórmio e metanol respectivamente. Ressaltamos que apesar desses solventes não serem utilizados na prática popular, várias substâncias com atividade biológica antimicrobiana já foram isoladas a partir desses extratos (OTOBELLI, 2009; PIEDADE; FILHO, 1988).

O ensaio da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método da microdiluição revelou que todos os extratos elaborados a partir das sementes de *Vatairea guianensis* apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as diferentes espécies bacterianas selecionadas.

Todos os extratos apresentaram atividade frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) sendo que os extratos bruto hidroetanólico e o clorofórmico foram notadamente mais ativos na mesma concentração com CIM de 3,12 µg/mL, contudo o extrato bruto hidroetanólico foi o que apresentou CBM mais efetiva contra *S.aureus*, mostrando ter potencial para ser utilizado na produção de fitoterápicos de aplicação tópica contra as infecções de pele causadas por bactérias gram-

positivas particularmente *S. aureus*. Este resultado sugere que o efeito inibitório desses extratos provavelmente podem estar relacionado com a presença de compostos fenólicos, em particular as antraquinonas, substâncias polares já relatadas na literatura e isoladas a partir de extratos de média e alta polaridade, como no extrato metanólico das cascas do caule de *V. guianensis* do qual já foram isoladas as antraquinonas crisofanol, emodina e fisciona (PIEIDADE; FILHO, 1998) e de outras espécies do gênero *Vatairea* (FORMIGA, 1975). A antraquinona crisofanol destaca-se como uma das substâncias mais isoladas do gênero *Vatairea*. Estudos anteriores realizados por outros autores, confirmaram a atividade biológica antimicrobiana dessa antraquinona isolada do extrato metanólico de outras espécies pertencentes a outros gêneros de plantas nativas do México (SOSA, *et al.*, 2006).

Ressalta-se que a maioria dos estudos encontrados na literatura sobre a constituição química do gênero *Vatairea* reporta-se sobre o isolamento de antraquinonas (PIEIDADE ; FILHO, 1998, MATOS,*et al.*1998).

O fato do extrato bruto hidroetanólico ter apresentado melhor efeito inibitório contra *S. aureus* justifica, em parte, os relatos de uso popular das sementes de *Vatairea guianensis* como antimicrobiano no tratamento de infecções de pele, já que as sementes são utilizadas popularmente maceradas em álcool ou “in natura” sobre a pele. Além disso, os resultados permitem sugerir também, que, embora, o extrato bruto seja uma mistura complexa de substâncias, o sinergismo entre elas foi relevante para a obtenção da atividade antimicrobiana. Este achado é plenamente justificável uma vez que os efeitos terapêuticos de muitas espécies medicinais não resultam apenas da ação isolada de um único composto químico e sim da ação complexa de sinergismos e antagonismos de várias substâncias (VACONCELOS *et al.*; 2002).

Os resultados obtidos neste experimento em relação a *S.aureus* são semelhantes ao único estudo de atividade antibacteriana relatado na literatura, porém para outra espécie do mesmo gênero a *Vatairea macrocarpa*, o qual revelou acentuada atividade antibacteriana do extrato acetônico contra *S. aureus* (MATOS, *et al.*,1998). Nossos dados corroboram, deste modo, com os obtidos por Matos (1998) em relação ao gênero e permitem sugerir que o gênero *Vatairea* apresenta potencial antimicrobiano frente a bactérias gram positivas.

Os extratos hexânico e metanólico também apresentaram atividade frente a *S.aureus*. É de especial interesse relatar que apenas um registro foi encontrado na

literatura com o extrato hexânico do qual foram isoladas das cascas do fruto de *V.guianensis* duas substâncias ativas (em processo de patentiamento) contra a *Leishmania amazonensis* com acentuada atividade leishmanicida (OTOBELLI, 2009). Desta forma, estes resultados demonstram que esta espécie medicinal pode ser promissora como agente antimicrobiano e antiparasitário, levando-se em consideração que os constituintes ativos isolados nas cascas do fruto isolados por Otobelli (2009) podem também estar presentes nas sementes, abrindo possibilidade de estudos futuros que possam identificar e/ou confirmar tais substâncias.

De maneira geral, os resultados no presente trabalho permitem sugerir que a atividade antimicrobiana desses extratos de média e alta polaridade no gênero *Vatairea* é decorrente de substâncias de alta polaridade provavelmente aos compostos fenólicos antraquinonas já relatados em estudos anteriores por outros autores.

O ensaio da CIM dos diferentes extratos de *V.guianensis* frente a *Enterococcus faecalis*, revelou que todos os extratos apresentaram atividade. Entretanto, ressalta-se que o extrato clorofórmico exibiu desempenho superior aos demais com CIM e CBM mais efetivas para este microrganismo (Tabela 12). Este resultado permite sugerir que a atividade antibacteriana de *Vatairea guianensis* contra *E.faecalis* pode ser em parte atribuída aos compostos fenólicos provavelmente antraquinonas extraídas especificamente no extrato clorofórmico.

É relevante ressaltar que o extrato clorofórmico exibiu o mesmo comportamento frente aos dois microrganismos gram-positivos estudados no presente estudo, o que permite indicar que estes microrganismos foram mais sensíveis ao extrato clorofórmico pelo método da microdiluição em caldo. A significativa atividade pode estar relacionada também com a constituição da parede celular desta classe de bactérias, que se apresenta quimicamente menos complexa, espessa com as camadas de peptidoglicano porosas o suficiente para permitirem a difusão de metabólitos para a membrana citoplasmática (TRABULSI *et al.*, 1999).

Em uma análise conjunta dos resultados obtidos neste trabalho com os diferentes extratos, frente aos microrganismos gram-positivos estudados causadores de infecções de pele e hospitalares, consideramos viável abrir caminhos para o aprofundamento de novos estudos dessa espécie medicinal nas diversas áreas, no sentido de contribuir para sua possível viabilidade como fitoterápico capaz de proporcionar uma aplicação clínica.

Os resultados da CIM dos extratos pelo método da microdiluição em caldo frente a bactérias gram negativas, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella sp* revelaram que todos inibiram o crescimento destes microrganismos exibindo atividade. Entretanto, o extrato metanólico apresentou melhor desempenho em comparação com os demais extratos frente a *P. aeruginosa* por conta da CBM evidenciada na concentração 50 µg/mL (Tabela12). Em relação a *Salmonella sp*, foi possível avaliar apenas os extratos clorofórmico e metanólico os quais exibiram atividade significativa.

Este resultado é relevante principalmente porque trata-se de bactérias de grande importância clínica, causadoras de infecções hospitalares graves devido a alta frequência nesse ambiente, além ainda de possuírem elevada resistência a antibióticos e serem tipicamente oportunistas. (TRABULSI, *et al* 1999). É importante destacar que não foi encontrado na literatura nenhum registro de atividade antimicrobiana de *V. guianensis* ou de outra espécie do gênero contra *P. aeruginosa* e *Salmonella*, permitindo dar um caráter inédito ao presente estudo.

E por fim, acredita-se que os resultados obtidos quanto a atividade antimicrobiana possam vir a contribuir para o estudo da espécie *V guianensis* e aumentar o interesse no gênero que ainda é pouco explorado.

A cicatrização é um evento biológico de intensa complexidade que envolve, fundamentalmente, inflamação e posteriormente quimiotaxia, proliferação celular, colageinização e remodelação (MANDELBAUM, SANTIS, MANDELBAUM, 2003).

O processo de cicatrização por segunda intenção tem como característica a indução do reparo em feridas com perda maior de células e tecidos, não havendo união das bordas e sim formação de coágulo de fibrina que preenche a lesão. A reação de granulação cresce a partir da margem para completar a reparação (DIEGELMAN, EVANS, 2004).

A estimulação por substâncias medicamentosas no estudo da cicatrização é particularmente interessante, sobretudo, por representar a possibilidade de melhoria do processo de reparo cicatricial, sendo útil na terapêutica de lesões superficiais até naquelas em que requerem o preenchimento de tecido da área perdida (ferida aberta) (COTRAN *et al.*, 2000; BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2006). Assim, o estímulo por meio de terapias alternativas como os produtos naturais, especialmente as plantas medicinais, vem sido amplamente discutido por diversos autores (SEMENOFF SEGUNDO, *et al.*, 2007; CARVALHO, *et al.*, 1991; CHITHRA, *et al.*, 1998).

A ferida aberta (segunda intenção), sem o auxílio de tratamento, apresenta uma dinâmica de reparo que acontece por meio da instauração da inflamação caracterizando o início da cicatrização, evento que atua em defesa do organismo, propiciando ambiente favorável para as fases proliferativas e de remodelação, traduzidas, respectivamente, em contração da ferida e a substituição do tecido injuriado, garantindo a integridade do organismo (DIETER, 2005; MARTINS *et al.*,2006). No presente estudo o controle negativo foi a solução salina 0,9%, considerada farmacologicamente inerte.

A análise macroscópica das áreas de reparo nos animais experimentais demonstrou que o uso tópico do extrato hidroetanólico bruto de *Vatairea guianensis* nas doses estudadas, promoveu a contração da ferida ao longo do tempo. As feridas de segunda intenção, tais quais realizadas neste trabalho, possuem a capacidade de contração promovida pela ação de miofibroblastos, dotados de filamentos de actina sendo essas células as responsáveis por este fenômeno (MONTENEGRO, M. R, 1999). Por inspeção visual, destaca-se que entre os grupos experimentais, G5 - 100 mg/kg exibiu, aparentemente, melhor resposta clínica, embora não tenha havido estatisticamente diferença significativa quanto ao percentual de contração dos grupos em comparação ao controle negativo.

Na análise microscópica, foi observado histologicamente que ao sétimo dia, a reação inflamatória nos grupos oscilou de intensa à moderada, embora o padrão de infiltração leucocitária tenha exibido diferenças entre os cinco grupos avaliados. Assim, os resultados podem sugerir que o tratamento com aplicação tópica de *Vatairea guianensis* pareceu exibir propriedades antiinflamatórias. Ao comparar sob coloração em HE, os achados morfológicos dos grupos G1 controle positivo com o grupo experimental G3 tratado com a dose 500 mg/kg do extrato hidroetanólico bruto de *V. guianensis*, verificou-se que a reação inflamatória comportou-se de maneira moderada, com perfil leucocitário exibindo uma considerável infiltração de linfócitos.

Estes achados podem indicar o início da cronicidade do processo, e conseqüentemente, sugerir aceleração dos eventos característicos da resposta inflamatória, visto que esta célula é própria da inflamação crônica. Comparando os demais grupos - G2 controle negativo, G4 250 mg/kg e G5 100 mg/kg, observou-se que a reação inflamatória foi intensa, porém, com infiltração equilibrada de neutrófilos e linfócitos, caracterizando reação inflamatória subaguda.

Notadamente, nos estágios iniciais da resposta do hospedeiro à agressão, o influxo de neutrófilos é determinado pela ação de mediadores químicos liberados durante o processo de injúria tissular, a exemplo das prostaglandinas e leucotrienos (BALBINO, PEDREIRA e CURI, 2005). No entanto, ressalta-se que no processo de reparo, a duração da fase neutrofílica da resposta inflamatória é proporcional ao grau de liberação de quimiocinas, que, por sua vez é diretamente dependente da intensidade da injúria e o grau de contaminação bacteriana secundária (RIBEIRO, 2006). Desta forma, justifica-se o fato de que nos grupos G2, G4 e G5, a permanência da reação ainda aguda evidenciada mesmo aos sete dias, poderia estar relacionada à contaminação bacteriana, uma vez que ficavam expostas durante todo o período de experimento.

A evidência de maior infiltração de linfócitos nos grupos G1 e G3 em comparação aos demais, sugere uma baixa liberação de quimiocinas no local da injúria e conseqüentemente uma transição mais rápida de polimorfonuclear para mononuclear.

Neste contexto é interessante destacar que a inflamação é absolutamente necessária ao processo de reparo, visto a sua função em eliminar o agente agressor e, em última instância, reparação dos danos teciduais (STEVENS; LOWER, 2002). No entanto, quando este fenômeno se apresenta exacerbadamente, ou por tempo demasiado, pode atuar como retardador da cicatrização (PEREIRA PINTO et al., 1997). Deste modo, pode-se inferir que a intensidade da resposta inflamatória, observada nos grupos G2, G4 e G5, não foi exacerbada, e por conseqüência, não pareceu influenciar de maneira negativa na instalação dos fenômenos que caracterizaram o processo de reparo. Além disso, nestes grupos, observou-se a reação de granulação nos estágios iniciais, com predominância de células endoteliais com tecido conjuntivo frouxo e poucas fibrilas.

Na cicatrização de ferida de segunda intenção, caracterizada por perda excessiva de tecido, a deposição de colágeno representa um fator primordial na recuperação dérmica após uma agressão (DIELGEMAN;EVANS, 2004). Nesta condição, o processo cicatricial ocorre de forma lenta, sendo necessária a formação da reação de granulação, composta de grandes quantidades de vasos sanguíneos e células, que vão preenchendo o vazio deixado pela perda dos tecidos. Assim, quando novas camadas de reação de granulação são formadas, aquelas mais antigas localizadas mais profundamente, conseqüentemente, perdem os vasos,

dando lugar aos fibroblastos e feixes de colágeno que por sua vez predominam (BALBINO, PEDREIRA ; CURI, 2005).

A síntese de colágeno inicia-se ao terceiro dia, atingindo seu pico máximo em três a seis semanas, e a partir deste período, entra em fase de remodelação. Desta forma, a maturação do tecido cicatricial implica na substituição do colágeno do tipo III, (fortemente presente em tecido conjuntivo), pelo colágeno do tipo I, (abundante em muitos tecidos) conferindo alta resistência à pele, tendões e ligamentos (Carneiro *et al.*, 2005). Neste contexto, o uso de coloração específica para colágeno a exemplo do Picrossírius, adquire grande relevância por permitir a análise específica dos tipos de colágeno de maneira segura, utilizando luz polarizada (RIBEIRO, 2004).

No presente trabalho a coloração picrossirius foi empregada para subsidiar o estudo do padrão de deposição de colágeno, visto que, apresenta forte sensibilidade e especificidade para localizar as fibras colágenas (FONSECA, 2003). Esta metodologia permite diferenciar os tipos de colágeno baseando-se em distintos padrões de cores (birrefringência), diferenças de densidade e disposição ou arranjo estrutural das fibras do colágeno e aparência (HIRSHBERG, *et al.*, 1996).

O colágeno tipo I em coloração Picrossirius, sob luz polarizada apresenta-se como fibras espessas nas cores amarelo ouro, amarelo laranja ou vermelho. Enquanto que o tipo III é visualizado como fibras delgadas e delicadas com birrefringência esverdeada e amarelo esverdeada de ocorrência comum nas etapas iniciais do processo de reparo cicatricial. Deste modo, a coloração aliada à microscopia, vem sendo referenciada na literatura como método adequado para avaliar a deposição de colágeno em estudos de cicatrização (RABAU, DAYAN, 1994; RIBEIRO *et al.*, 2004).

A busca por estratégias que se refletem em produtos e substâncias naturais ou sintéticas que promovam a melhoria do processo cicatricial, ao longo dos anos, vem sendo discutida, sobretudo fazendo uso de terapias alternativas como as plantas medicinais e seus derivados a exemplo de extratos e tinturas (SEMENOFF SEGUNDO, *et al.*, 2007).

Neste sentido, diversas espécies de plantas de uso popular têm sido amplamente investigadas com o intuito de estimular de alguma forma a cicatrização. Deste modo, o extrato hidroetanólico bruto das sementes de *Vatairea guianensis* Aublet, espécie de leguminosa nativa da Amazônia, em especial no Estado do

Amapá, foi submetido ao estudo do processo de reparo cicatricial. Estudos químicos posteriores em relação à espécie *V. guianensis* e ao gênero *Vatairea* revelaram a presença marcante de antraquinonas, responsáveis por inúmeras atividades biológicas, dentre as quais se destacam: ação antimicrobiana (MATOS, 1988), fungicida, cicatrizante. No entanto, em razão dos poucos estudos encontrados na literatura enfocando o efeito desta planta sobre a possível interferência no processo de reparo cicatricial, propôs-se avaliar o efeito tópico do extrato hidroetanólico bruto de *V. guianensis* administrados por via tópica em grupos experimentais nas doses de 500 mg/kg, 250 mg/kg e 100 mg/kg sobre o processo de síntese e deposição de colágeno durante o reparo cicatricial de segunda intenção ao sétimo dia, sendo o controle positivo representado pelo medicamento fibrinase (desoxirribonuclease 666U/g, fibrinolisa 1U/g, clorafenicol 0,01 g/g) e controle negativo, solução salina.

No presente estudo, as secções coradas em picrossirius mostraram, sob luz polarizada ao sétimo dia, que o grupo G2 - controle negativo e o grupo experimental G5 100 mg/kg exibiram com maior frequência o surgimento de fibras dispostas em paralelo, indicando o início da formação do colágeno tipo I. De especial interesse foi a observação de que nos grupos G1 controle positivo representado pela fibrinase, G3 - 500 mg/kg e G4 - 250 mg/kg demonstraram maior frequência de fibras com padrões reticulado e de espessura delgada e delicada, birrefringência amarelo esverdeado caracterizando a deposição de colágeno do tipo III. A verificação do aparecimento de fibras colágenas do tipo I nos grupos G2 e G5 sugere que a substituição das fibras de colágeno III por I, representa uma etapa característica da evolução do processo, conforme já foi relatado por outros autores (JUNQUEIRA, *et al.*, 1983; CARNEIRO *et al.*, 2004).

Diversos fatores podem modular a síntese de colágeno e interferir na velocidade de deposição da matriz protéica na sua maturação ou na organização do seu arranjo durante o processo cicatricial (MANDELBAUM;SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Considerando-se que durante a formação do processo cicatricial, após a instalação do dano tecidual, a síntese de colágeno tem seu início logo no terceiro dia, atingindo pico máximo entre 3 e 6 semanas. Ocorrendo, inicialmente, a formação do colágeno do tipo III, que tem como função relevante a orientação da migração de células endoteliais, durante os estágios iniciais da reação de

granulação, sendo estas células precursoras na formação de vasos sanguíneos (RAMOS; MIRANDA, 2007).

No presente estudo, observou-se que os grupos experimentais G3 – 500 mg/kg e G4 - 250 mg/kg desempenharam papel similar ao controle positivo representado pelo medicamento Fibrinase, que contém em sua composição uma enzima proteolítica capaz de estimular a reação de granulação modulando a síntese de colágeno. No entanto, os grupos G5 - 100 mg/kg e G2 - controle negativo, exibiram efeitos similares quanto à evolução do colágeno. Estes achados podem sugerir que esteja ocorrendo uma modulação por parte do extrato teste. Em ambos, ocorreu a exibição de fibras paralelas, indicando o aparecimento de fibras colágenas tipo I em substituição ao tipo III. Desta forma, estes achados podem sugerir que esteja acontecendo uma evolução precoce do processo cicatricial do extrato hidroetanólico bruto de *V. guianensis* em G2 e G5 - 100 mg/kg. Por outro lado, sugere-se que nos grupos G1 controle positivo, G3 - 500 mg/kg e G4 – 250 mg/kg, o extrato esteja causando um retardo no processo de reparo.

Avaliando a relação dos grupos controles com os grupos experimentais, os achados deste estudo permitem inferir que o extrato hidroetanólico bruto de *V. guianensis* além de estimular a reação de granulação da mesma forma que a fibrinase, desempenha também o papel de modular a velocidade da síntese de colágeno, com o propósito de evitar uma cicatriz hipertrófica, caracterizada por excesso de colágeno. Desta forma, parece que o extrato esteja também estimulando a síntese de colágeno do tipo III em G1, G3 e G4, além de estar bloqueando sua síntese excessiva, com deposição lenta ou retardada e regulada de colágeno, minimizando o favorecimento de uma cicatrização hipertrófica. Assim, na cicatrização por segunda intenção, caracterizada por ser aberta e com perda excessiva de tecido, na qual é necessário a reação de granulação, estes achados são de suma importância para conhecimento da atuação biológica do extrato hidroetanólico de *V. guianensis* no processo de reparo.

A análise dos resultados obtidos no presente estudo vem sugerir que ao sétimo dia, o extrato hidroetanólico bruto de *V. guianensis*, conforme observação histológica em HE, de uma maneira geral, diminuiu a intensidade da reação inflamatória, com considerada infiltração de linfócitos em todos os grupos, sendo mais evidente em G1 e G3, melhorando assim o processo de cicatrização. Além disso, conforme observação da deposição de colágeno em coloração Picrossirius, o

extrato hidroetanólico bruto de *V. guianensis* pareceu modular a velocidade da síntese de colágeno, visto que exibiu o aparecimento de fibras colágenas paralelas, indicadoras de colágeno tipo I nos grupos G2 e G5 e estimulou a síntese de colágeno do tipo III em G1, G3 e G4. Assim, sugere-se, de forma preliminar, que o extrato estudado apresenta ter aplicação clínica, principalmente na prevenção de cicatriz hipertrófica pela estimulação lenta de colágeno e bloqueio da síntese excessiva desta proteína. No entanto, estudos posteriores devem ser realizados a fim de que sejam elucidados os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela possível atividade biomodulatória do extrato hidroetanólico bruto de *V. guianensis* sobre os eventos que envolvem o reparo cicatricial.

Os resultados obtidos na avaliação da toxicidade aguda permitem sugerir que o extrato apresenta baixa toxicidade oral, visto que nenhum animal foi a óbito e não foram registrados sinais e sintomas dignos de nota após a administração das doses de 2000 mg/kg e 5000 mg/kg. É pertinente destacar que nenhum estudo de toxicidade com esta espécie foi encontrado na literatura. Entretanto, nossos resultados foram semelhantes ao único trabalho relatado na literatura realizado por Oliveira (2008), que submeteu o extrato etanólico de outra espécie do gênero a *Vatairea macrocarpa* à avaliação da toxicidade aguda nas doses 1000, 2000 e 5000 mg/kg e verificou que esta espécie apresentou baixa toxicidade em estudo agudo por via oral em camundongos.

Deste modo os resultados permitem conferir ao extrato hidroetanólico bruto de *Vatairea guianensis*, segurança no seu uso em razão da baixa toxicidade em processo agudo por via oral. É interessante ressaltar que a proposta de realização deste ensaio justifica-se pela inexistência de estudos na literatura que comprovem a toxicidade desta espécie. Embora as informações etnofarmacológicas na literatura relatem que a espécie *Vatairea guianensis* não é administrada oralmente com uso restrito apenas para uso externo, nossos resultados preliminares mostraram que o extrato por via oral não apresentou sinais de toxicidade e mortes. Contudo, são necessários estudos posteriores mais aprofundados de toxicidade *in vivo* que envolvam outras vias de administração, bem como análise histológica dos órgãos dos animais.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, permitem com base nas condições experimentais concluir que:

- ✓ Na avaliação da atividade antimicrobiana utilizando o método da microdiluição em microplacas com adição de MTT, os extratos hidroetanólico, hexânico, clorofórmico e metanólico obtidos das sementes de *Vatairea guianensis* inibiram o crescimento de todas as cepas de bactérias desafiadas apresentando atividade bacteriostática e bactericida;
- ✓ Os resultados mais efetivos considerando-se as menores concentrações inibitórias foram obtidos frente a *S aureus*;
- ✓ O extrato hidroetanólico obtido das sementes de *Vatairea guianensis* interferiu de maneira positiva sobre o processo de cicatrização diminuindo a intensidade da reação inflamatória e estimulando a síntese de colágeno;
- ✓ O extrato hidroetanólico obtido das sementes de *Vatairea guianensis* apresentou baixa toxicidade aguda por via oral em camundongos.

9 REFERÊNCIAS

AGREN, M.S.; MERTZ, P.M.; FRANZÉN, L. Acomparative study of three occlusive dressing in the treatment of full- thickness wounds in pigs. **Journal of American Academy of Dermatology**, v.36, n.1, p. 53-58,1997.

ALONSO, J. **Tratado de fitomedicina- Bases Clínicas y Farmacológicas**: Rio de Janeiro, 1039 p. 1998.

ALVES, P.M.; LEITE.P.H.A.S.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA,L.F.; PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* sobre leveduras do gênero *Cândida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(2): 192-196, Abr/jun, 2006.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M; SMÂNIA, E. F.A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of brasilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

AMORIM, E.L.C.; LIMA,C.S.A.; HIGINO,J.S.;SILVA, L.R.S.; ALBURQUERQUE, U.P. Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarma**, v. 15, n. 1-3. p.66-69, 2003.

ANDRADE NETO, M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste, Pilocarpus sp.** Fortaleza, 1989. Dissertação Mestrado Química. Departamento de Química, Universidade do Ceará.

ANTUNES, R.M.P.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; CAMARÁ, C.A.; ARRUDA, T.A.; CATÃO, R.M.R.; BARBOSA,T.P.; NUNES, X.P.; DIAS,C.S.; SILVA, T.M.S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16,n.4, p.517-524,Out/dez.2006.

BALBINO,C.A.;PEDREIRA,L.M.;CURI,R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev.Brás.de Ciências farmacêuticas**. v.41, n.1, Jan/Mar 2005.

BARRACA,S.A. **Manejo e Produção de Plantas Medicinais e Aromáticas**.Relatório de estágio supervisionado produção vegetal II- Faculdade de São Paulo, Piracicaba , São Paulo 1999.

BARRETO,A.L.S.**Estudo histomorfológico do efeito de membrana de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos**. Programa de Pós-graduação em saúde e Ambiente Dissertação de mestrado. Universidade Tiradentes- Aracaju. Sergipe, 95p. 2008.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.I.; ICHASO, C.I.F.; COSTA, C.G.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H. C de. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, vol 2. Imprensa Universitária, Minas Gerais. 377p. 1991.

BASILE, A.; GIORDANO,S.; LÓPES-SÁES,J. A.; COBIANCHI, C.R. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. **Phytochemistry** v. 52, p.1479-1482, 1999.

BEVILAQUA,C.H. **Avaliação do uso do medicamento homeopático *Arnica Montana* no tratamento da dor e edema pós operatórios em cirurgia bucco-maxilo-facial. Dissertação de Mestrado**, Faculdade de odontologia da USP, São Paulo, SP 2003. 53p .

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; ALCANTARA, E. M.; DALLAGNOL, J. C.; YOSHIZUMI, K. O.;TORRES, L. F. B.; BORSATO, K. S. Cicatrização de feridas: estudo comparativo em ratos hipertensos não tratados e tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina, **Rev. Col. Brás Cir**, v.33 n.2, p.74-78, Mar/Abr,2006

BONTEMPO, M. **Medicina natural**. São Paulo: Nova cultural, 1990.

BOTSARIS, A. S.; MACHADO, P. V. Memento terapêutico de fitoterapia, Rio de Janeiro:**Flora medicinal**, 1999.v.1, 98 p .

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário oficial da União**, Brasília, 04 mai. 2006^a

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto n.º 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 23 jun. 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico sobre registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 mar. 2004

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia. 6 ed** . Rio de janeiro, 2000.

BRASIL-MMA/SCA, Produtos potenciais da Amazônia- Plantas medicinais. Brasília. 26p. 1998

BRITO, N.M.B. A. Aspectos microscópicos de cicatrização de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. **Rev. Para. Med** , v.13 n.1, p 12-7, 1999.

BRITO, N.M.B. A. Aspectos microscópicos de cicatrização de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de andiroba em ratos. **Rev. Para. Med** , v.15, n.2, p 17-22, 2001.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica e Farmacognosia**. Zaragoza: Acribea, 1995.

CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, p. 318-334, 2001.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapies). **Braslian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J, SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother. Res**, v. 14, p. 401- 418, 2000.

CARNEIRO,C.G *et al.*Avaliação da deposição de colágeno após implante de fásia lata e de gordura na prega vocal de coelho:estudo histomorfológico. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**v.71,n.2, p.798-802,2005.

CARRICO, T.J.; MEHRHOF, A. JR.; COHEN, I.K. Biology of wound healing. **Surg Clin North Am.** v.4,n.4, p.721-33, 1984.

CARVALHO, J. T. C **Validação Química- Farmacológica da Espécie Vegetal Pterodon emarginatus Vog** (Atividade antiinflamatória). Tese de Doutorado. São Paulo:USP 184p.,1998.

CARVALHO, J. T. C.; GOSMAN, G.; SCHENKEL, E. P. 2002. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In SIMÕES, C. O et al. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento . Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Da UFRGS/Ed. UFSC, p. 443- 460, 2002.

CARVALHO, J.T.C. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmed, p 165-180. 2004.

CARVALHO, P.S.P.; TAGLIAVINI, D.G.; TAGLIAVINI, R.L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas; estudo clínico e histológico em ratos. **Revista de Ciência Biomédica**, v.12, p.39-50,1991.

CAVADA, B. S.; SANTOS.; C. F.; GRANJEIRO, B. T.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUZA, F.A.M.; CRISOSTOMO, C. V .; CALVETE, J. J. Purification and characterization of lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Ducke. **Phytochemistry**, v. 49. n. 3. p 675-680, 1998.

CHANDRASOMA, P; TAYLOR, C.R. **Patologia básica**. São Paulo: Ed. Prentice-Hall do Brasil Ltda;.1993. p.70-9

CLARK. R. A. **The molecular and cellular biology wound repair**. 2 nd ed. New York: Plenum Press; 1996.

CLARKE, J.M.; GILLINGS, M.R.; ALTAVILLA, N.; BEALE, A.J. Testing natural products for antimicrobial activity- potencial problems with fluorescein diacetate assays of cell viability. **J. Microbiol. Menth**, v. 46, n. 3, p. 261. 2001.´

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G. L.; SHAPOVAL, E.E.S.; ELIZABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **J. Ethnopharmacol.**; v. 90, p. 135- 143, 2004.

CONNER, D.E. Naturally occurring compounds. In: *Antimicrobials and Foods*, Davidson, P.M.; Branem, A.L. Eds.; Dekke: New York, 441-468,1993.

CORSI, R.; CORSI, P.;PIRANA, S.Fatores que prejudicam a cicatrização de feridas: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v.85, n.2,p.4753,1995.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.6,111p, 1982

COTRAN, R. S; KUMAR, V; ROBBINS, S. L. Patologia estrutural e funcional. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000, p.87-99.

CHITHRA, P.; SAJIRHLAL, G.B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of Aloe vera on collagen turnover in healing of dermal wounds in rats. **Indian Journal Experimental Biology**, v.36, n.9, p.896-901, 1998.

CROSS, S.E. *et al.* An experiment model to investigate the dynamics of wound contraction. **British Journal of plastic Sugery**, v 48, n.4.p. 189- 197. 1995.

DE CAMPOS, M. P.; CECHINEL FILHO, V.; DA SILVA, R. Z.; YUNES, R. A.; ZACCHINO, S.; JUAREZ, S.; CÉ BELLA CRUZ, S.; BELLA CRUZ , A.; Evaluation of antifungal activity of extract, fraction and four compouds from *Piper solmsianum* C.D.C, Var. solmsianum (Piperaceae). **Biological Pharmaceutical Bulletin** v.8, n.28, p. 1527- 1530. 2005.

DESMARCHELIER ,C.; GURNI, A.; CICCIA, G. e GIULIETTI.; A.M.Ritual an medicinal plants of the Esse'ejas of Amazonian rainforest (Madre de Dios, Peru). **Journal of Ethnopharmacology** v. 52, p.45-51,1996

DESMOULIERE, A.; REDARD, M.; DARBY,I.; GABBIANI,G.Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **Am J Pathol**, v.146,n.1,p.56-66,1995.

DI STASI, L. C. *et al.* **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002. p. 604.

DIEGELMAN,R.F.; EVANS, C.M. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**.v.9, p.283-289, 2004.

DIETER, M. F., **Ação do medicamento canova na cicatrização do dorso de camundongo após incisão e sutura: avaliação macro e microscópica**, Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Celular, Programa de Pósgraduação em Biologia Celular e Molecular, Curitiba, 2005.

DUARTE, M.C.T. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas utilizadas no Brasil**. Construindo a história dos produtos naturais, Multiciência, out 2006.

DUFFY, C. F; POWER, R. F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plants extracts. International **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 527- 529, 2001.

EMING, *et al.*, Gene therapy and wound healing. **Clin.Dermat**, v.25,p.79-92, 2007.

EURIDES, D. Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com de barbatimão (*Stryphynodendron barbatiman martius*). Ver **Fac Zootec Vet Agro Uruguiana**; v.2/3,p.37-42.1995/1996.

FERREIRA, M.C; SANTOS, M.A.C; VIANA, E. P. Relatório Técnico , IEPA/BASA . **Estudo botânico/ ecológico e análise qualitativa de espécies medicinais extrativas utilizadas na produção de fitoterápicos e / ou fitocosméticos pelo IEPA**, 2004.

FERREIRA, S.Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de janeiro, **Academia Brasileira de Ciências**,1998

FETROW, C.W.; AVILA, J.R. Manual de medicina alternativa para o profissional. Rio de janeiro. Guanabara Koogan,1999.

FONTANA,C. Fisiologia da cicatrização de feridas. *Cicatrização* v.1, n. 1, p.3-22,1996.

CECHINEL FILHO,V e YUNES,R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais.Modificação estrutural para otimização de atividade. **Quim. Nova**, São Paulo.v.21,n.1,p.99-105,1998.

FILHO, A. M. Estudos preliminares da atividade antifúngica de *Vatairea guianensis* (Aublet). Trabalho de conclusão de curso.Belém Pará.1999

FONSECA, V.R.C.D. **Quantificação da deposição de colágeno de submucosa de pregas vocais suínas após exesere de fragmento de mucosa a frio e uso de mitomicina- C tópica**. Dissertação de Mestrado, IPM, Curitiba, PR, 2003..

FOLKMAN,J;SHING,Y. Angiogenesis. **J.Biol.Chem**. v.267,p.10931-4,1992

FORMIGA, M.D.; GOTTLIEB, O.R.; MENDES, P. M.; KOKETSU, M.; ALMEIDA, M.E.L.; PEREIRA, M.O.S.; MAGALHÃES, M.T. -. Constituintes of Brazilian Leguminosae. **Phytochemistry**, v.14,n.3, p.828, 1975

GARCIA, E.S.; Fitoterápicos: biodiversidade, perspectivas e oportunidades tecnológicas.1996.

GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. Pharmacopées traditionnelles en Guyane. Creoles, Palikur, Wayãpi. Paris: Institut François de Recherche Scientifique pour le Developpement en Coopération, ORSTOM, 186p, 1987.

GUEDES, R.C.M.; NOGUEIRA,N.G.P.; FUSCO-ALMEIDA,A.M.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA,W.P. Atividade antimicrobiana de Extratos brutos de *Petiveria alliacea*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28,n.4,p. 520-4 2009.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI H.L.; LATVA- KALA K.; MATTILA- SANDHOLM T.; POL I.; SMID, E.J.; GORRIS L.G.M.;VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essencial oil components on Gram negative bactéria, **J.Agric. Food Chem.** v.46,p.3590-3595. 1998.

HIRSHBERG, A.; BUCHNER, A.; DAYAN,D. The central odontogenic fibroma and the hyper plastic dental follicle: study with Picrosirius red polarizing microscopy. **Journal of Oral Pathology e Medicine**,v.28,n.9,p.410-412,1999.

HOLETZ, F.B.;PESSINI,G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ,D..A. G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brasilian folk medicine for the tratamento of infectious diseases. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz**, v. 97, n.7, p. 1027-1031, 2002.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. Patologia básica. 10th Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.488. 2004

LEITE, J.P.V.Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas..Ed.Atheneu, 328p. 2009.

LIMA, E. O. Plantas e suas Propriedades Antimicrobianas: Uma breve análise histórica: Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, p. 479- 499, 2001.

LIMA, H. C. de. Revisão Taxonômica do Gênero Vatairea Aublet (Leguminosa Faboideae). **Arquivos do jardim Botânico do Rio de Janeiro**: v. 26, n.3, p.173-203.1982

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. Plantas medicinais no Brasil/nativas e exóticas. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**. p.512, 2002.

LOUREIRO, A. A.;DA SILVA,M.F.Leguminosae Papillioideae in Catálogo das Madeiras da Amazônia, v.2,p.47-126. 1968.

MACIEL, M.A.M.;PINTO,C.A.;VEIGA JR,V.F.;Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares.**Química nova**. v.25.n.3, São Paulo. Maio, 2002.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD R.C. A Hipocratic screen for pure or crude drug materials.**Lloydia** v.25,p.320-332, 1962.

MANDELBAUM, S.H.;DISANTIS,E.P.;MANDELBAUM, M.A.H.S.A. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources- part I. **An brs Dermatol**, Rio de Janeiro, v.78,n. 4, p. 393-410, jul./ag.2003.

MARCHINI F.B.; MARTINS, D.M.F.S.; TEVES,D.C.;SIMÕES, M.J. Efeito do óleo de rosa mosqueta na cicatrização de feridas abertas. **Revista Paulista de Medicina**, São paulo,v.106,n.6,p.356,1988

MARTINS, E.R.;CASTRO.D.M.;CASTELLANI,D.C.;DIAS, J.E.;Plantas medicinais. Viçosa:UFV, 1998.

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,n.3), p.66-75, 2006.

MATOS, F.J, As plantas medicinais brasileiras- um desafio para os nossos químicos. **Revista de Extensão- Fortaleza**, v. 3, n. p. 5-13, 1990.

MATOS, F.J. A.; AGUIAR, L.M.B.A.; SILVA M.G.V. Constituintes químicos e atividade antimicrobiana de *Vatairea macrocarpa*. **Acta Amazônica**, v.18, n.1-2, p 351-352. 1988.

MENDONÇA, R. J.; NETTO, J.C. Revisão: Aspectos celulares da cicatrização. **An. Brás. Dermatol.** v.84 n.3, Rio de Janeiro, julho, 2009.

MIGUEL, O.G, *et al.*Antimicrobial activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia*. **Phytoterapy Research**, v.10, p.694-696,1996.

MIGUEL, M. D.;MIGUEL,O.G. Desenvolvimento de Fitoterápicos. São Paulo: Probel.116p.2000

MITSCHER, L.A.; DRAKES.; GOLLAPUDI, S.R.; e OKUNTE, K. A modern look at folklore use of antiinfective agents. **J. Nat. Prod.**, v. 50, p.1025- 1040, 1987.

MITSCHER, L. A.; LEV,L.P.;BATHOLA,M.S.;WU,W.N.; BEAL, J.L. Antimicrobial agents from higher plants. *Lloydia*, v. 35, p. 157- 166, 1972.

MODOLIN, M.; BEVILACQUA, R. G. Cicatrização das feridas. Síntese das aquisições recentes. **Rev. Bras. Clin. Ter.**, v. 14, n. 6, p.208-213, 1985.

MONTADON, *et al*, The mechanism of wound contraction and epithelisation. **Clin.Plast.Surg**,v.4,p.325-346, 1977

MONTENEGRO, M.R,FRANCO.M. Patologia processos gerais. 4th Ed. São Paulo: Atheneu,1999.p.146-50.

MONTEIRO, J.; MACEDO, E.M.S.; SILVA, M.G de V. Extração seletiva de crisofanol em *Vatairea macrocarpa* Ducke. **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**.2009.

MOREIRA, M.E.C.;DOS SANTOS, M.H.; ZOLINI,G.P.P.;WOUTERS,A.T.B.; CARVALHO,J.C.T.;SCHNEEDORF,J.M Antiinflammatory and cicatrizing activities of carbohydrate fraction isolated from sugary Kefir. **Journal of Medicinal Food**. v.11n.2, p.356-361. 2008.

MORTON, J. F. Mucilaginous plant and their uses in medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.8,n.3,p.371-392,1990.

MOSHER *et al.*; Fibronectin: review of its structure and possible functions. *J.Invest.Dermatol.* v. 77, p175, 1981

MOISMANN,T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

NCCLS (National Committee for Laboratory Standards M2- A8 vol. 23 nº 1 da “Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco difusão: norma aprovada - 8ª edição”

NCCLS (National Committee for Laboratory Standards) M27-A2 vol.22.n. 15. Metodo de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: Norma Aprovada- 2ª edição

NCCLS (National Committee for Laboratory Standards).M7-A6 vol.23.n.2. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico”. Norma Aprovada- sexta edição

NEWMAN, D.J.; CRAGG,G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981- 2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

OLIVEIRA, A. F. **Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia Férra* (Martius), (jucá), em lesões cutâneas de caprinos.** Dissertação de Mestrado, 65p. Rio Grande do Norte. 2008.

OLIVEIRA, H.C.;SANTOS,M.P.;GRIGULO,R.;LAYLA, LIMA, L. L.; MARTINS,O. D. T.;LIMA,J.C.S.;STOPIGLIA,L.F.;LOPES,C. F.; KAWASHITA, N. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 115 . p. 515-519, 2008.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. 88p,1992.

ORTONNE, J.P.; CLEVY,J.P. Physiologie de la cicatrisation cutanée.Rev Prat, v.44,n.13,p. 1733-4, 1994.

OSTROSKY,E, *et al.*, Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória de plantas medicinais.Brasilian **Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.2,p.301-302,Abr- jun.2008.

OTOBELLI, *et al.*,Estudo fitoquímico e atividade e atividade leishmanicida de *Vatairea guianensis* Aubl (Fabaceae). XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia,II Encontro de Parasitologia do Mercosul, Sociedade Brasileira de Parasitologia, **Revista Patologia Tropical**, v.38,supl.2, jul-set..2009.

PAIVA, S.R.; FIGUEIREDO, M.R.; ARAGÃO, T.V.; KAPLAN, M.A. Antimicrobial in vitro of plumbagin isolated from plumbago species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 959-961, 2003.

PEDERSON, C.S.; FISCHER, P. Bactericidal activity of vegetables juice. **J. Bacteriology**, Baltimore, v.47, p.421-422, 1984

PENA, F.P.S. *et al.* Avaliação da atividade cicatrizante tópica de *Caesalpinia férrea* Mart. In: **7º Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**. Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Maringá. Paraná, 2009.

PEREIRA-PINTO, L. *et al.* Patologia Básica. Sinopse. 1ed. Editora da UFRN, NATAL, 1997.

PERAZZO, F. F., CARVALHO, J.T.C.; RODRIGUES, M.; MORAES, E.K.L.; MACIEL, M.A.M. Comparative anti-inflammatory and aqueous extract obtained from cróton cajucara Benth. **Revista Brasileira de farmacognosia** v.17, n.4, p.521-528 out/dez. 2007.

PETTO, J. B. Ethnopharmacological studies of *antimicrobial* remedies in the South of Brazil. **Journal Ethnopharmacology**, v.90, p.135-143, 2004.

PIEIDADE, L. R.; WOLTER FILHO W.; Antraquinonas de *Vatairea guianensis* Aubl. **Acta Amazônica**, Manaus, v 18, n. 3-4, p.185- 187. 1988.

POLLACK, S.V. Wound healing: A review I- The biology of wound healing. **J. Derm.Surg.Oncol.** v. 5. n.5, p.389-393, 1979

PORTAL, R. R.; LIMA, M. A. S.; LUZ, V. L. F.; BATAUS, Y. S. L.; REIS, I. J dos. Espécies vegetais utilizadas na alimentação de *Podocnemis unifilis*. Troschel 1948 (Reptilia, Testudinae, pelomedusidae) na região do Pracuúba- Amapá Brasil. **Ciência Animal Brasileira** v. 3(1). p. 11-19, jan/ jun. 2002 .

PRATA M.B, *et al.* Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em rato. **Acta Cir Bras** , v.2.n.3. p.43- 48, 1988.

PRETTO, J. B.; CECHINEL FILHO, V.; NULDIN, V. F.; SARTORI, M. R. K.; ISAIAS, E.B.; BELLA CRUZ, A. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense*. **Z.Naturforsch.**59c, p. 657- 662, 2004.

RABAU, M.Y.; DAYAN, D. Polarization microscopy of picrossirius red stained sections: a useful method for qualitative evaluation of intestinal wall collagen. **Histol. Histopathol** v.9, n.3. p.535-528, 1994.

RAMOS, A.F.N.; MIRANDA, J.L. Propolis: Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **J. Venom. Anim.** v.13, n.4, p. 698, 2007.

RAMSEY, D.T. *et al.* Effects of three occlusive dressing materials on healing of full thickness skin wounds in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n.7, p.941-949, 1995.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-13, 2001.

REVILLA, J. Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. 1 ed. Manaus: Programa de Empresarial e Tecnológico, .405p. 2000

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J.P.V.; DANTAS-BARROS, A.M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.15, n.1, p.65-70, 2005.

RIBEIRO, A. Q.; MOURA, C.S. Informações sobre plantas medicinais e fitoterápicos no contexto da farmacoterapia. In: Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas, 328p. 2009.

RIBEIRO, F. A. Q.; BORGES, J.P.; ZACCBI, F.F.S.; GUARALDO, L. Clinical and histological healing of surgical wounds treated with mitomycin c. **Laryngoscope**. v.114, n.1, p.148-152, 2004.

RIBEIRO, MAM. **Avaliação morfológica, histoquímica e imuno-histoquímica do processo de reparo subcutâneo em ratos submetidos à fotobiomodulação a laser 660nm**. Tese de Doutorado, Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil, 2006.

RIOS, J. L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacology**. v.100, p.80-84, 2005.

RUIZ, A. L. T. G.; TAFFARELLO, D.; SOUZA, V. H. S.; CARVALHO, V. H. S. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 295-300, 2008.

RUNGGRE-BRANDLE, E.; GABIANNI, G. The role of cytoskeletal and cytocontractile elements in pathologic process. **Am.J.Path.**, v.110, p.361-392, 1983.

SAHM, D.F, Washington II JA. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: Balows, A.; Hauser, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shamody, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1105-1116 .1991

SANCHES NETO *et al.* 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**. v.8, p.18-23, 1993.

SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; SCHIAVINI, M.S.; NAKAMURA, C. Y.; DIAS FILHO, B.P. MEvaluation of Antibacterial activities of *Psidium guajava*, Braz. Arch. **Biol. Technol**. v.8, p.429-436. 2005.

SANTOS, M.A.C, *et al.* Atlas das espécies medicinais extrativas utilizadas pelo IEPA. Macapá IEPA/ BASA, 76 p. 2006.

SARTORI, M. R. K.; PRETTO, J.B.; CRUZ, A.B.; BRESCIANI, L. F. V.; YUNES, R. A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.A.; CECHINEL FILHO, V, Antifungal Activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (ASTERACEAE), **Pharmazie**, v. 35, n.8, p. 567-9, 2003.

SATO *et al* . Antibacterial property of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* cariogenic oral bacterial. **Phytomedicine**, v.9, p.427-433, 2002

SEMENOFF SEGUNDO, A.; BOSCO,A.F.; DA MAIA, D.; RIBEIRO,R.V.; DE AGUIAR,EB.H.;ROCATTO,G.E.G.D.;CIRILO,D.M.;BUZELLE,S.L.;SEMENOFF, T.A.D.V. Influência do Aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. **Peridontia**. v.17,n.01, p. 05-10, 2007.

SILVA, D.;NAZARÉ,I.; REBELO, P. B.; ALMEIDA, M.D.; MORAES, F.; NEVES, C. Incidência das Micoses na Amazônia. **Anais. Brás. Derm.** v.56, p.187-8, 1981

SILVA, J. G.; SOUZA,I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus* .**Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.4, p. 572-577, Out/Dez. 2007.

SIMATUPANG, *et al*, 1967, apud PIEDADE, p.185-187,1988.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL,E.P.; GOSMAN, G. Farmacognosia: Da planta ao medicamento .4 ed Florianópolis: UFSC, 2002.

SINGER, A. J.; CLARK,R.A.N. Cutaneous wound healing. **Engl. J. med** v.10, p.738-46. 1999.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N.R. Seleção de plantas para pesquisa farmacológica. **Infarma**, v.15,n.3, p. 70- 73, 2002.

SOSA,K.G.; VILLAREAL,N.A.; PEÑA,P.L.; PEÑA,L.M.R. Crysophanol, uma antraquinona antimicrobiana do extrato de raiz de *Colubrina greggii*. **J.Mex.Chem.Soc**, v.50, n.2,p.76-78. 2006

SOUZA, L.K.H, *et al*. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brasil. **Journal of Ethnofarmacology**, v.90, p.135-143, 2004.

SOUZA, A.P.B de. **Efetividade de medicamentos em ensaios biológicos de gastroproteção e cicatrização**.Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente.Dissertação de mestrado, UNIT. Aracajú.2009.

STEVENS.;LOWER,J..Patologia.2ªed.; Ed Manole, Baueri/SP,2002.

STRADA, L.C.; PEREIRA, C. R.; DA SILVA, L. E.; SOUZA JR, P. T.; RIBEIRO, A. N.; DALL'OGGIO, E. L.; SILVA,V.C. Catequinas das cascas do caule de *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae). **Sociedade Brasileira de Química**-Departamento de química- Cuiabá, MT. 2007.

STREIT *et al*, Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. **EMBO.J**,v.19, p.3272-82, 2000.

TEVES,D.C.;SIMÕES, M.J.; MARTINS, D.M.F.S.; MARCHINI, F.B. Aspectos morfológicos dos processos de cicatrização em ratos albinos sob ação da collagenases. **Folha médica**, v.98,n.1,p.191-194,1989.

TRABULSI, L.R *et al*.Microbiologia 3 ed.São Paulo:Atheneu,1999.

VASCONCELOS, A.G, *et al* 2002. Fitofármaco, fitoterápico, plantas medicinais e a complexidade na produção do conhecimento científico. **Rev. Brás. Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, p.103-105, 2002.

WILHELM FILHO,D *et al*. Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos:importância e perspectivas terapêuticas . In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, p.318-334, 2001.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química das plantas medicinais.In:YUNES, R.A CALIXTO, JB. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, p. 18-42, 2001.

YUNNES, R.A.; PEDROSA,R.C.; CECHINEL FILHO,V.Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**. v. 24,n.1. p. 147-152,2001.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, p.47- 75, 2001.

ZACCHINO, S. Estratégias para descoberta de novos agentes antifúngicos In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, 2001, 500p.

ZACCHINO, S. A.;YUNES,R.A.;CECHINELFILHO,V.;ENRIZ,R.D.;KOUZNETSOV, V; RIBAS, J.C. The need for new antifungal drugs: sreening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In : RAI, M; MARES, D. Plant derived antimycotics: current trends and future prospects. The Haworth Press, 1- 41, 2003.

ZAITS,C *et al*, **Micologia Médica**. Rio de janeiro:Medsj,1998.

ZGODA, J.R.; PORTER J.R A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharm Biol** 39: 221-225. 2001.

WERNER, S; GROSE, Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.**Physiol. Rev**. v.83, p.835-870, 2003

(WHO) World Health Organization Traditional medicine strategy. 2002. Genova: World Health

APÊNDICE (Tabelas sobre a evolução da área das feridas e percentual de contração de cada grupo)

Tabela 2. Área das feridas (mm^2), logo após o procedimento cirúrgico imediato (T_0), 7º dia e percentual de contração da ferida no grupo controle positivo Fibrinase.

Animal	Pós operatório imediato (T_0) (mm^2)	7º dia (mm^2)	Contração (%)
1	32.10	3.98	87.60
2	29.59	3.83	87.05
3	37.68	8.57	77.25
4	37.44	9.07	75.77
5	27.71	8.54	69.18
Média±EPM	32.90±2.02	6.79±1.18	79.37

Tabela 3. Área das feridas (mm^2) logo após o procedimento cirúrgico imediato (T_0), 7º dia e percentual de contração da ferida no grupo controle negativo (solução salina 0,9%).

Animal	Pós operatório imediato (T_0) (mm^2)	7º dia (mm^2)	Contração (%)
1	34.72	8.30	76.14
2	50.79	10.02	80.27
3	49.50	9.39	81.03
4	33.11	9.93	70.00
5	40.88	7.76	81.01
Média±EPM	41.80±3.65	9.08±0.45	77.69

Tabela 4. Área das feridas (mm^2), logo após o procedimento cirúrgico imediato T_0 , 7º dia e percentual de contração da ferida no grupo experimental dose 500mg/kg.

Animal	Pós operatório imediato (T_0) (mm^2)	7º dia (mm^2)	Contração (%)
1	34.10	11.91	65.07
2	32.83	5.64	82.82
3	25.22	6.18	75.49
4	30.04	4.65	84.52
5	25.76	8.74	66.07
Média±EPM	29.59±1.80	7.42±1.30	74.79

Tabela 5. Área das feridas (mm^2), logo após o procedimento cirúrgico imediato (T_0), 7º dia e percentual de contração da ferida no grupo experimental dose 250mg/kg.

Animal	Pós operatório imediato(T_0) (mm^2)	7ºdia (mm^2)	Contração (%)
1	33.10	5.97	81.96
2	28.66	17.58	38.66
3	33.07	17.19	48.01
4	24.60	4.84	80.32
5	32.53	9.29	71.44
Média±EPM	30.39±1.66	10.97±2.71	64.07

Tabela 6. Área das feridas (mm^2), logo após o procedimento cirúrgico imediato (T_0), 7º dia de tratamento e percentual de contração da ferida no grupo experimental G5 dose 100mg/kg.

Animal	Pós operatório imediato (T_0) (mm^2)	7ºdia (mm^2)	Contração (%)
1	27.48	5.01	81.76
2	18.28	3.80	79.21
3	23.02	8.66	62.38
4	32.09	4.66	85.47
5	28.32	5.48	80.64
Média±EPM	25.77±2.39	5.52±0.40	77.89