

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CURSO DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Karla Michelli Garcia de Oliveira**

**Atividades farmacológicas de extratos e formulações tópicas do caule de *Spondias mombin* L.: perspectivas para o tratamento de inflamação e lesões cutâneas**

**Juiz de Fora**

**2018**

**Karla Michelli Garcia de Oliveira**

**Atividades farmacológicas de extratos e formulações tópicas do caule de *Spondias mombin* L.: perspectivas para o tratamento de inflamação e lesões cutâneas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos

Orientadora: Dra. Célia Hitomi Yamamoto.  
Coorientador: Dr. Orlando Vieira de Sousa

**Juiz de Fora**

**2018**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Karla Michelli Garcia de .

Atividades farmacológicas de extratos e formulações tópicas do caule de *Spondias mombin* L.: perspectivas para o tratamento de inflamação e lesões cutâneas / Karla Michelli Garcia de Oliveira. -- 2018.

95 f. : il.

Orientadora: Célia Hitomi Yamamoto

Coorientador: Orlando Vieira de Sousa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.

1. *Spondias mombin*. 2. Ácido elágico. 3. Inflamação. 4. Agentes anti-inflamatórios. 5. Lesão. I. Yamamoto, Célia Hitomi, orient. II. Sousa, Orlando Vieira de, coorient. III. Título.

**Atividade farmacológica de extratos e formulações tópicas do caule de  
*Spondias mombin* L.: perspectivas para tratamento de inflamação e lesões  
cutâneas**

**Karla Michelli Garcia de Oliveira**

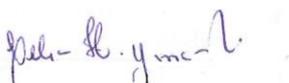
**ORIENTADORA: Dra. Célia Hitomi Yamamoto**

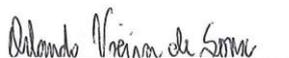
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 18/07/2018

  
Dra. Irene Satiko Kikuchi

  
Dra. Rozângela Magalhães Manfrini

  
Dra. Célia Hitomi Yamamoto

  
Dr. Orlando Vieira de Sousa

Dedico este trabalho aos meus amores: Filipe Garcia de Oliveira Siqueira, Joana Darc Garcia e Carlos Alberto de Oliveira

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, força e coragem que me concede todos os dias.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa pelo incentivo, ajuda e por me ensinar que não há limites para a superação.

A Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de fora, local onde tudo começou, minha gratidão.

As professoras Dra. Magda Narciso Leite e Dra. Célia Hitomi Yamamoto pelos incentivos e por sempre acreditarem em mim.

À minha mãe, Joana Darc Garcia, fonte de inspiração e pelo seu amor incondicional. Ao meu pai, Carlos Alberto de Oliveira pelos ensinamentos e exemplo de vida.

Ao meu amado filho, Filipe Garcia de Oliveira Siqueira, pelos carinhos e incentivos.

Ao Administrador Daniel Mazzoni da Costa e todos os funcionários da Clínica Psiquiátrica Vila Verde, por ter proporcionado condições para a realização desse trabalho, apoio e compreensão.

## RESUMO

*Spondias mombin* L. é uma planta frutífera e medicinal usada tradicionalmente para o tratamento de vômitos, diarreia, disenteria, hemorroidas, feridas e inflamação. Neste estudo, constituintes químicos e as atividades anti-inflamatória tópica e cicatrizante de extratos e géis de *S. mombin* foram avaliados. Extratos EECSM (casca) e EEMSM (madeira) foram obtidos por maceração estática em etanol. Estes extratos foram submetidos à partição para obter as frações hexânicas (FHCSM e FHMSM), diclorometânicas (FDCSM e FDMSM), em acetato de etila (FACSM e FAMSM) e butanólicas (FBCSM e FBMSM). A partir de EECSM e EEMSM, os géis GEECSM e GEEMSM foram preparados. Os teores de fenóis e flavonoides totais foram determinados por métodos espectrofotométricos. EECSM, EEMSM, FACSM, FAMSM, FBCSM e FBMSM foram analisados por CCD e CLAE-DAD-UV. Utilizando extratos (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) e géis (1, 3 e 5%), a atividade anti-inflamatória tópica foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido por óleo de Croton, enquanto a atividade cicatrizante foi realizada pelo teste de lesões cutâneas. Análises histopatológicas e atividades de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) foram avaliadas. Os teores de fenóis e flavonoides variaram de  $0,27 \pm 0,07$  a  $11,99 \pm 0,80$  (casca) e  $0,82 \pm 0,08$  a  $3,80 \pm 0,15$  (madeira) g equivalentes de ácido gálico/100g e de  $0,53 \pm 0,05$  a  $5,26 \pm 0,06$  (casca) e  $0,75 \pm 0,01$  a  $2,04 \pm 0,03$  (madeira) g equivalentes de quercetina/100g, respectivamente. O ácido elágico foi identificado em EECSM, EEMSM, FACSM, FAMSM, FBCSM e FBMSM. Após 6 horas de tratamento, EECSM (53,83 a 63,06%), GEECSM (41,45 e 43,48%), EEMSM (37,51 a 49,30%) e GEEMSM (45,02 a 50,70%) inibiram a espessura do edema. Em 24 h, a espessura do edema foi inibida por EECSM (56,22 a 58,01%), GEECSM (44,79 a 60,67%), EEMSM (44,11 a 62,69%) e GEEMSM (49,38 a 62,88%). Neste tempo, os extratos e géis também reduziram a massa do edema e as atividades de MPO e NAG. Análises histopatológicas revelaram que os extratos e géis diminuíram o edema de orelha, migração de leucócitos e vasodilatação. Após 14 dias de tratamento, os extratos e géis produziram cicatrização completa com redução da área da lesão e aumento do grau de contração, diminuição da epiderme e polimorfonucleares, assim como aumento da proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno. Os resultados sugerem que os extratos e géis de *S. mombin* contêm substâncias ativas e apresentam atividades anti-inflamatórias e cicatrizantes, que sustentam os usos tradicionais e podem representar uma alternativa para o tratamento de inflamação e lesões cutâneas.

Palavras-chave: *Spondias mombin*. Ácido elágico. Inflamação. Agentes anti-inflamatórios. Lesão.

## ABSTRACT

*Spondias mombin* L. is a fruitful and medicinal plant traditionally used for the treatment of vomiting, diarrhea, dysentery, hemorrhoids, wounds and inflammation. In this study, chemical constituents and the topical anti-inflammatory and healing activities of extracts and gels from *S. mombin* were evaluated. EEBSM (bark) and EEWSM (wood) extracts were obtained by static maceration in ethanol. These extracts were partitioned to obtain hexane (HFBSM and HFWSM), dichloromethane (DFBSM and DFWSM), in ethyl acetate (EFBSM and EFWSM) and butanol (BFBSM and BFWSM) fractions. From EEBSM and EEWSM, the GEEBSM and GEEWSM gels were prepared. The total phenolic and flavonoid contents were determined by spectrophotometric methods. EEBSM, EEWSM, EFBSM, EFWSM, BFBSM and BFWSM were analyzed by TLC and HPLC-DAD-UV. Using extracts (0.1, 0.5 and 1mg/ear) and gels (1, 3 and 5%), the topical anti-inflammatory activity was assessed by ear edema induced by Croton oil, while the wound healing activity was performed by cutaneous lesions test. Histopathological analysis and myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) activities were assessed. The total phenolic and flavonoid contents ranged from  $0.27\pm 0.07$  to  $11.99\pm 0.80$  (bark) and  $0.82\pm 0.08$  to  $3.80\pm 0.15$  (wood) g gallic acid equivalents/100g and from  $0.53\pm 0.05$  to  $5.26\pm 0.06$  (bark) and  $0.75\pm 0.01$  to  $2.04\pm 0.03$  (wood) g quercetin equivalents/100g, respectively. Ellagic acid was identified in EEBSM, EEWSM, EFBSM, EFWSM, BFBSM and BFWSM. After 6 hours of treatment, EEBSM (53.83 to 63.06%), GEEBSM (41.45 and 43.48%), EEWSM (37.51 to 49.30%) and GEEWSM (45.02 to 50.70%) inhibited the edema thickness. In 24 h, the edema thickness was reduced by EEBSM (56.22 to 58.01%), GEEBSM (44.79 to 60.67%), EEWSM (44.11 to 62.69%) and GEEWSM (49.38 to 62.88%). In this time, the extracts and gels also diminished the edema mass and the MPO and NAG activities. Histopathological analysis revealed that the extracts and gels decreased the ear edema, leukocyte migration and vasodilation. After 14 days of treatment, the extracts and gels produced complete healing with reduction of the lesion area and increase in the degree of contraction, as well as decreased epidermis and polymorphonuclear, and increased fibroblast proliferation and collagen synthesis. The results suggest that the extracts and gels from *S. mombin* contain active substances and present anti-inflammatory and healing activities, which support the traditional uses and may represent an alternative for the treatment of cutaneous inflammation and lesions.

Keywords: *Spondias mombin*. Ellagic acid. Inflammation. Anti-inflammatory agents. Wound.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		P.
Figura 1 -	Aspectos gerais da morfologia externa de <i>Spondias mombin</i> L.....	05
Figura 2 -	Componentes voláteis identificados nos frutos de <i>Spondias mombin</i> .....	08
Figura 3 -	Fitoesteróis identificados na casca do caule de <i>Spondias mombin</i> .....	10
Figura 4 -	Constituintes químicos encontrados nas folhas de <i>Spondias mombin</i> .....	10
Figura 5 -	Esquema das principais células e tecidos da pele.....	11
Figura 6 -	Estrutura e componentes celulares da pele em camundongos e humanos..	12
Figura 7 -	Estrutura esquemática da barreira epidérmica com elementos morfológicos e funcionais.....	13
Figura 8 -	Fases da cicatrização correlacionadas com a especificidade imune celular.....	19
Figura 9 -	Eventos da fase proliferativa.....	22
Figura 10 -	Eventos da fase de remodelagem.....	23
Figura 11 -	Fluxograma do processo de extração e fracionamento do caule de <i>Spondias mombin</i> L.....	26
Figura 12 -	Curvas de calibração para determinação de fenóis e flavonoides totais....	38
Figura 13 -	Cromatograma do extrato EECSM obtido em 254 nm.....	39
Figura 14 -	Cromatograma do extrato EEMSM obtido em 254 nm.....	41
Figura 15 -	Cromatograma dos marcadores obtido em 254 nm.....	42
Figura 16 -	Espectros de ultravioleta dos marcadores usados na identificação de substâncias nos extratos etanólicos.....	42
Figura 17 -	Identificação do ácido elágico nos extratos e frações de <i>Spondias mombin</i> por cromatografia de camada delgada.....	43
Figura 18 -	Efeito anti-inflamatório do extrato e gel da casca de <i>Spondias mombin</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de Croton.....	46
Figura 19 -	Efeito do extrato e gel da casca de <i>Spondias mombin</i> sobre as atividades de mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase.....	46
Figura 20 -	Efeito anti-inflamatório do extrato e gel da madeira de <i>Spondias mombin</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de Croton.....	48
Figura 21 -	Efeito do extrato e gel da madeira de <i>Spondias mombin</i> sobre as atividades da mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase.....	48

Figura 22 -	Cortes histológicos representativos de fragmentos de orelhas com edema induzido por óleo de Croton após tratamento com EECSM e GEECSM...	50
Figura 23 -	Cortes histológicos de orelhas com edema induzido por óleo de Croton após tratamento com EEMSM e GEEMSM.....	51
Figura 24 -	Fotomicrografias representativas do tecido cicatrizado de ratos Wistar após 14 dias de tratamento com EECSM e GEECSM.....	59
Figura 25 -	Fotomicrografias representativas do tecido cicatrizado de ratos Wistar após 14 dias de tratamento com EEMSM e GEEMSM.....	60

## LISTA DE TABELAS

	P.
Tabela 1 - Principais tipos celulares e mediadores envolvidos na cicatrização.....	20
Tabela 2 - Diluições a partir da solução estoque de ácido gálico (1 mg/mL) para elaboração da curva padrão.....	27
Tabela 3 - Diluições a partir da solução estoque de quercetina (0,5 mg/mL) para elaboração da curva padrão.....	28
Tabela 4 - Formulações em gel dos extratos de <i>Spondias mombin</i> .....	31
Tabela 5 - Rendimento das frações obtidas por partição dos extratos EECSM e EEMSM.....	37
Tabela 6 - Teores de fenóis, equivalentes ao ácido gálico, e flavonoides totais, equivalentes à quercetina, nos extratos e frações de <i>Spondias mombin</i> .....	38
Tabela 7 - Análise dos constituintes do extrato EECSM por CLAE-UV.....	40
Tabela 8 - Análise dos constituintes do extrato EEMSM por CLAE-UV-DAD.....	41
Tabela 9 - Identificação da presença de ácido elágico nos extratos e frações do caule de <i>Spondias mombin</i> por CLAE-UV-DAD.....	44
Tabela 10 - Efeito dos extratos e géis da casca de <i>Spondias mombin</i> sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar durante 14 dias de tratamento.....	53
Tabela 11 - Efeito dos extratos e géis da madeira de <i>Spondias mombin</i> sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar durante 14 dias de tratamento...	54
Tabela 12 - Efeito dos extratos e géis de <i>Spondias mombin</i> sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar durante 14 dias de tratamento.....	56
Tabela 13 - Efeito dos extratos e géis de <i>Spondias mombin</i> sobre o grau de contração das lesões induzidas em ratos Wistar durante 14 dias de tratamento.....	57

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABTS -	[2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid)]
AIES -	Anti-inflamatório esteróidais
AINES -	Anti-inflamatório não esteróidais
BM-MØ -	Macrófagos derivados da medula óssea estimulada por lipopolissacarídeo
CCD -	Cromatografia em Camada Delgada
CEEA -	Comitê de Ética na Experimentação Animal
CLAE -	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
c - NOS -	NO – Sintase Constitutiva
COX -	Cicloxigenase
DAD -	Detector de arranjo de diodos
DES -	Destilação e extração simultânea
DMSO -	Dimetilsufóxido
DPPH• -	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EECSM -	Extrato etanólico de casca de <i>S. mombin</i>
EEMSM -	Extrato etanólico de madeira de <i>S. mombin</i>
EGF-	Fator de crescimento epidérmico
ERO -	Espécies Reativas de Oxigênio
FACSM -	Fração em acetato de etila da casca de <i>S. mombin</i>
FAMSM -	Fração em acetato de etila da madeira de <i>S. mombin</i>
FBCSM -	Fração butanólica da casca de <i>S. mombin</i>
FBMSM -	Fração butanólica da madeira de <i>S. mombin</i>
FDCSM -	Fração diclorometânica da casca de <i>S. mombin</i>
FDMSM -	Fração diclorometânica da madeira de <i>S. mombin</i>
FHCSM -	Fração hexânica da casca de <i>S. mombin</i>
FHMSM -	Fração hexânica da madeira de <i>S. mombin</i>
GEECSM -	Gel do extrato etanólico da casca de <i>S. mombin</i>
GEEMSM -	Gel do extrato etanólico da madeira de <i>S. mombin</i>
HTBA -	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IL-1-	Interleucina 1
IL-6-	Interleucina 6
INCQS -	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

i – NOS -	NO – Sintase induzível
MEFS -	Microextração em fase sólida
MPO -	Mieloperoxidase
NAG -	N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase
NO -	Óxido nítrico
PDGF -	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PKC -	Proteína quinase C
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PDGF -	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGs -	Prostaglandinas
TGF- $\beta$ -	Fator de crescimento de transformação beta
TNF- $\alpha$ -	Fator de necrose tumoral alfa
TPA -	12- <i>O</i> -Tetradecanoilforbol acetato
TTC -	Trifeniltetrazolio
TXs -	Tromboxanas

## SUMÁRIO

		P.
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1	FAMÍLIA ANACARDIACEAE - GÊNERO <i>Spondias</i> .....	3
2.2	ESPÉCIE <i>Spondias mombin</i> L.....	4
2.2.1	<b>Distribuição, Morfologia e Usos Etnomedicinais.....</b>	<b>4</b>
2.2.2	<b>Aspectos nutricionais, Constituintes químicos e Atividades farmacológicas.....</b>	<b>7</b>
2.3	ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DA PELE.....	11
2.4	RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA PELE.....	14
2.5	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO E MODELOS DE INFLAMAÇÃO.....	16
2.6	CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA.....	18
2.6.1	<b>Fases da cicatrização.....</b>	<b>19</b>
2.6.1.1	<i>Fase inflamatória ou exsudativa</i> .....	19
2.6.1.2	<i>Fase proliferativa ou reconstitutiva</i> .....	21
2.6.1.3	<i>Fase de remodelagem ou maturação</i> .....	22
2.7	HIPÓTESES DO ESTUDO.....	23
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
4.1	COLETA E MATERIAL VEGETAL.....	25
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO E FRACIONAMENTO.....	25
4.3	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS.....	26
4.4	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	27
4.5	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	28
4.6	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	29
<b>4.6.1</b>	<b>Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com ácido elágico.....</b>	<b>30</b>
4.7	PREPARO DO GEL DOS EXTRATOS DO CAULE DE <i>Spondias mombin</i> L.....	30
4.8	ANIMAIS.....	31
4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA.....	31
4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE.....	32

4.11	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	33
4.12	AVALIAÇÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	34
4.12.1	<b>Obtenção do Sobrenadante.....</b>	<b>34</b>
4.12.2	<b>Dosagem de Proteínas Totais.....</b>	<b>34</b>
4.12.3	<b>Ensaio da Atividade da Mieloperoxidase.....</b>	<b>35</b>
4.12.4	<b>Ensaio da Atividade da N-acetil-<math>\beta</math>-D-Glucosaminidase.....</b>	<b>35</b>
4.13	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
5.1	RENDIMENTO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO.....	37
5.2	TEORES DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS.....	37
5.3	ANÁLISES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	39
5.4	ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	43
5.5	IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	43
5.6	EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO E GEL DA CASCA DE <i>Spondias mombin</i> .....	45
5.7	EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO E GEL DA MADEIRA DE <i>Spondias mombin</i> .....	47
5.8	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO CUTÂNEO INDUZIDO POR ÓLEO DE CROTON.....	49
5.9	EFEITO CICATRIZANTE DOS EXTRATOS E GÉIS DE <i>Spondias mombin</i> SOBRE LESÕES INDUZIDAS EM RATOS.....	<b>52</b>
<b>5.9.1</b>	<b>Análise Macroscópica das Lesões.....</b>	<b>52</b>
<b>5.9.2</b>	<b>Efeito dos Extratos e Géis de <i>Spondias mombin</i> sobre a Área e o Grau de Contração das Lesões.....</b>	<b>55</b>
<b>5.9.3</b>	<b>Perfil Histopatológico de Tecidos Cicatrizados após Tratamento com Extratos e Géis de <i>Spondias mombin</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Durante milhares de anos, os seres humanos têm contado com a natureza para atender suas necessidades básicas e, as plantas medicinais, em particular, têm integrado uma das bases dos sistemas tradicionais de terapia. Nesses sistemas, a fitoterapia atual integra conhecimentos que foram passados de geração a geração com evidências científicas obtidas por métodos modernos que utilizam estudos químicos, farmacológicos, pré-clínicos, clínicos, de tecnologia farmacêutica e outras áreas específicas para garantir a ação terapêutica, a efetividade e a segurança dos fitoterápicos e plantas medicinais (OLIVEIRA; ROPKE, 2016; VALERIANO et al., 2017).

Do ponto de vista da biodiversidade vegetal, o Brasil apresenta um potencial para as pesquisas em produtos naturais e para o desenvolvimento da fitoterapia como ciência aplicada, uma vez que possui a maior extensão de floresta equatorial e tropical úmida do planeta (SALES et al., 2015). Aliada a este fato, a rica diversidade étnica e cultural, que detém um valioso conhecimento tradicional, associado ao uso de plantas medicinais faz do Brasil um grande promissor das aplicações fitoterapêuticas junto à população. Além disso, a investigação de produtos naturais é uma das áreas estratégicas e de vasta atuação de um número expressivo de pesquisadores brasileiros e de países da América Latina como observado em eventos científicos nacionais e internacionais (PINTO et al., 2002).

Outro fato relevante para a pesquisa de plantas medicinais e fitoterápicos é que, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 1979, cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento utiliza práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% desta utilizam plantas ou preparações fitoterápicas. A OMS também reconhece que grande parte das pessoas destes países depende do conhecimento tradicional para sua atenção primária à saúde. Assim, a OMS criou o Programa de Medicina Tradicional que recomenda aos estados-membros o desenvolvimento de políticas públicas para facilitar a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde, assim como promover o uso racional dessa integração (BRASIL, 2006).

Com base nos aspectos citados, em 1991, a OMS reforçou a importância da contribuição da medicina tradicional, especialmente às populações que têm pouco acesso aos sistemas de saúde. Sugeriu também que os produtos naturais, em particular os derivados de plantas, poderiam conduzir ao descobrimento de novas substâncias terapêuticas e que a etnobotânica/etnofarmacologia associada com os estudos químicos e farmacológicos seria uma importante ferramenta na bioprospecção (BRASIL, 2006). Muitos estudos têm sido

relacionados às informações sobre o uso tradicional de plantas medicinais a fitoquímica e estudos farmacológicos para o desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos fitoterápicos (GUILHERMINO et al., 2012). No entanto, é importante destacar que a quimiosistemática constitui outra ferramenta de pesquisa que permite o conhecimento químico de famílias de plantas ou diferentes partes do vegetal, direcionando as atividades farmacológicas (ISODORO et al., 2012; REYNOLDS, 2007).

Entre as plantas medicinais encontradas na biodiversidade brasileira, *Spondias mombin* L., pertencente à família Anacardiaceae, é uma espécie vegetal muito comum nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde é utilizada popularmente como cicatrizante, anti-inflamatória, antitérmica, antidiarreica, antidesintérica, antiblenorrágica e anti-hemorroidiária (LUZ, 2014). Em particular, as cascas do caule são usadas na Nigéria no auxílio ao parto infantil e no tratamento de inflamação, febre, dor de estômago e malária (ADEDOKUN et al., 2010). Outras espécies do gênero *Spondias*, como a *S. purpurea*, apresentam atividades anti-ulcerogênicas (ALMEIDA, 2011) e antidiarreica (RAMOS, 2013).

Considerando o aproveitamento das partes resultantes da poda das árvores (casca e caule) e as considerações acima a investigação química e a avaliação das atividades anti-inflamatória e cicatrizante dos extratos e formulações de *S. mombin* L. podem contribuir para as suas aplicações terapêuticas por meio de estudos de quantificação e identificação química e modelos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*, bem como para utilização dos galhos resultantes da poda da árvore, que comumente são descartados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FAMÍLIA ANACARDIACEAE - GÊNERO *Spondias*

A família Anacardiaceae pertence à ordem Sapindales que compreende cerca de 80 gêneros e 600 espécies predominantes distribuídas na região Pantropical, sendo também observadas representantes nas áreas temperadas da Europa, Ásia e América do norte. No Brasil, são encontrados cerca de 15 gêneros e aproximadamente 68 espécies, pertencentes a três diferentes tribos: Mangiferae, Spondiaceae e Rhoae (CORREIA et al., 2006).

Segundo Correia et al (2006), cerca de 25% dos gêneros da família Anacardiaceae são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa, sendo as espécies venenosas restritas às tribos Anacardiaceae, Rhoae e Semecarpeae. A dermatite de contato provocada por essas plantas é atribuída principalmente a compostos fenólicos e catecólicos ou a mistura destas substâncias, denominada lipídios fenólicos. Estas substâncias podem estar presentes em diferentes partes do material vegetal, ocorrendo principalmente em espécies do gênero *Rhus*. Nos últimos anos, a origem dos lipídios fenólicos derivados também tem sido objeto de investigação. Além disso, espécies da família Anacardiaceae têm se mostrado bastante promissoras na busca de substâncias bioativas (CORREIA et al., 2006).

Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados nesta família são *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondia*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea*. Os gêneros *Mangifera*, *Rhus* e *Anacardium* destacam-se pelo número de investigações relativas à composição química de suas espécies e atividades biológicas de seus extratos e metabólicos (CORREIA et al., 2006).

O gênero *Spondias* foi criado por Linnaeus em 1753, contendo a espécie *Spondia mombim* (cajazeira) (CARVALHO et al., 2008). O gênero é composto por 15 espécies, sendo sete delas encontradas no Brasil e todas apresentando frutos comestíveis: *Spondias mombim* L. (cajá), *Spondias lutea* L. (cajá ou taperebá), *Spondias cythereasonn.* (cajá-manga), *Spondias venulosa* (cajá-mirim), *Spondias purpurea* L. (ciriguela), *Spondia tuberosa* Arr. (umbu) e *Spondias sp* (umbu-cajá) (SILVA, 2003).

## 2.2 ESPÉCIE *Spondias mombin* L.

### 2.2.1 Distribuição, Morfologia e Usos Etnomedicinais

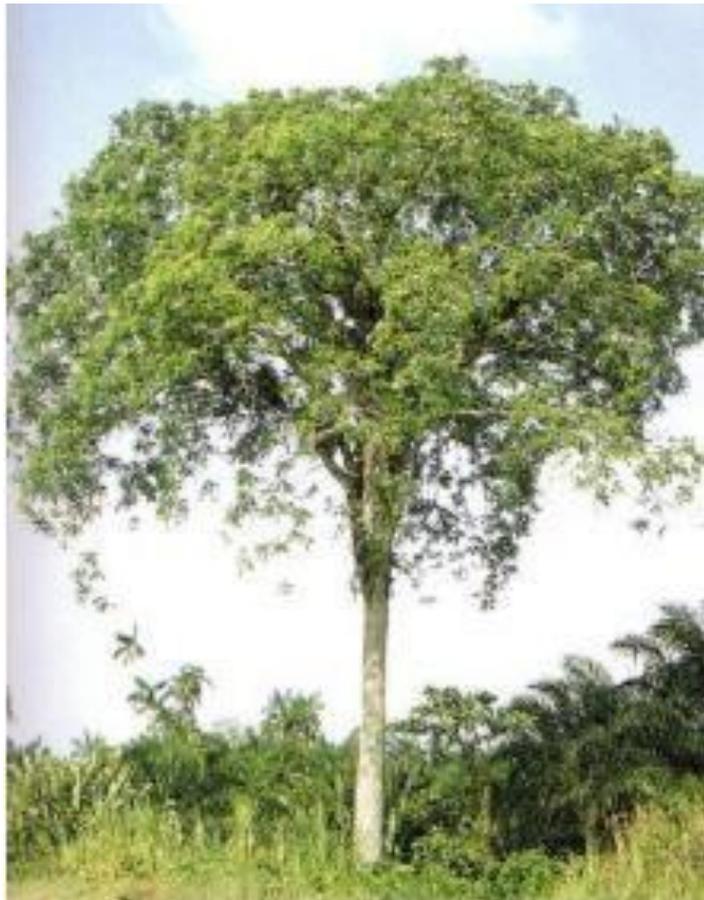
*Spondias mombin* L. (Cajazeira) é uma espécie frutífera que foi identificada por Prance e Silva (1975), sendo procedente da América do Sul e Antilhas. Encontra-se dispersa desde o Sul do México até o Brasil. No entanto, os centros de diversidade da cajazeira são a mata atlântica, a Amazônia Ocidental, no estado do Acre, e nas regiões limítrofes do Peru e da Bolívia (CARVALHO; ALVES, 2016). No Brasil, é encontrada principalmente nos estados do Norte e Nordeste, onde seus frutos recebem diferentes denominações, como: cajá, cajá verdadeiro, cajá-mirim ou taperebá. Estes são utilizados no preparo de polpas, sucos, picolé, sorvetes e geleias e desempenham um importante papel na saúde humana, contribuindo para o ganho de calorias, sais minerais, vitaminas, fibras e água (SACRAMENTO; SOUZA, 2000).

Com base nos aspectos morfológicos, *S. mombin* apresenta tronco ereto, casca acinzentada ou brancacenta, rugosa, fendida e muito grossa, copa de forma capitata corimbiforme dominante que alcança até 30 m de altura (Figura 1) (SACRAMENTO; SOUZA, 2000). A copa varia de 8 a 24 cm de diâmetro e apresenta tronco de até 2 m de circunferência, revestido por casca grossa e rugosa (SACRAMENTO; SOUZA, 2000; SILVA, 2015). As folhas são compostas, alternas, imparipinadas, com 5 a 11 pares de folíolos, espiraladas  $\frac{1}{4}$ , pecioladas, pecíolo curto de 5 cm de comprimento, folíolos opostos ou alternos, lâmina oblonga cartácea, de 5 a 11 cm de comprimento por 2 a 5 cm de largura, margem inteira, ápice agudo, base arredondada, desigual, glabra nas duas faces; nervura mediana, promínula na face superior, glabra, no dorso proeminente, com muitos pêlos, nervação do tipo camptódromo-cladódromo, com 16 a 18 pares de nervuras secundárias, promínulas na face ventral, proeminentes na face dorsal; raque de 20 a 30 cm de comprimento, tereto, pilosos, sem glândulas (SACRAMENTO; SOUZA, 2000).

Considerando ainda a morfologia de *S. mombin*, as flores são dispostas em inflorescências do tipo panículas terminais piramidais de 20 a 60 cm de comprimento, são unissexuais e hermafroditas na mesma planta, actinomorfas, apopétalas, diclamídeas, cálice de 0,5 cm de diâmetro; receptáculo arredondado, superfície pilosa, pedicelo cilíndrico, com 1 a 4 mm de comprimento; bractéola caduca; 5 sépalas, concrecentes com os lóbulos diminutos, verdes, 5 pétalas, livres valvares induplicatas amarelo-claros, 0,3 cm de comprimento; estames em número de 10 com dois verticilos, os 5 primeiros inseridos num disco, alternos às pétalas, os outros 5 são epipétalos; anteras subglobosas, basifixas, rimosas,

ovários súpero 4-carpelar, uniovulado, sobre um disco; óvulo anátropo de placentação axial; estigma fimbriado. O número de flores por panícula é variável, podendo atingir mais de 2.000, porém somente cerca de 10 frutos em cada panícula alcançam a maturação. O fruto é caracterizado como drupa de 3 a 6 cm de comprimento, ovóide ou oblongo, achatado na base, cor variando do amarelo ao alaranjado, casca fina e lisa, polpa pouco espessa também variando do amarelo ao alaranjado, succulenta, de sabor ácido-adocicado. O endocarpo, comumente chamado de caroço, é grande, branco, súbico-lignificado e enrugado, contendo 2 a 5 lóculos, e a ocorrência de 0 a 5 sementes por endocarpo, sendo mais freqüente a ocorrência de uma semente. A semente é claviforme a reniforme, medindo 1,22 cm de comprimento e 0,22 cm de largura, com os dois tegumentos de consistência membranácea, coloração creme e com superfícies interna do tégmen. O embrião é axial, de formato semelhante a semente e de coloração creme-claro, possuindo cotilédones planos, carnosos (SACRAMENTO; SOUZA, 2000).

Figura 1 - Aspectos gerais da morfologia externa de *Spondias mombin* L.



Fonte: SILVA et al., 2015.

Segundo a literatura etnobotânica, diferentes partes, frutos, flores, cascas, ramos, raízes e folhas de *S. mombin*, são utilizadas para o tratamento de diversas enfermidades (SACRAMENTO; SOUZA, 2000). As raízes, por exemplo, têm emprego em problemas de estômago, enquanto a casca do caule do cajá é usada popularmente como abortiva, com efeito emético, como antídoto para toxina de serpentes e para o tratamento de feridas (VILLEGAS et al., 1997). *S. mombin* é também destacada no tratamento da diabetes e na hipercolesteremia, devido a presença de esteróis na folha que podem ser responsáveis pela redução da glicose no sangue e do colesterol (ADEDIWURA; KIO, 2009).

As folhas e cascas do caule são utilizadas na medicina popular para o tratamento de distúrbios infecciosos possuindo propriedades antidisentérica. As folhas também são usadas como anti-inflamatório para problemas da boca, garganta, herpes labial, além do uso reportado para o tratamento de prostatite, uretrite, cistite, conjuntivite, tumores e depressão (ALBUQUERQUE et al., 2007; LORENZI; MATOS, 2008). Além destas atividades, o uso das folhas foi descrito como estimulante uterino, para o controle da ansiedade e com atividade antifecundadora (OFFIAH; ANYANWU, 1989; AYOKA et al., 2005; UCHENDU; ISEK, 2008).

O uso das folhas também é relatado para o tratamento de infecções bacterianas, virais e fúngicas, além de ser eficaz contra parasitas intestinais. A atividade antifúngica de *S. mombin* é comumente utilizada na medicina tradicional, porém alguns estudos não confirmaram nenhum efeito de extrato desta espécie sobre a inibição do crescimento de fungos (ABO et al., 1999).

Estudo sobre a importância socioeconômica e utilização de *S. mombin* na Nigéria mostrou que as folhas são empregadas para auxiliar parto infantil, para o tratamento de tosse, dor de garganta, malária e problemas estomacais e como sabonete antisséptico. A casca ajuda no parto infantil e é usada em casos de inflamação, febre, problemas de estômago, malária. Os usos dos frutos incluíram cura para tontura, estômago e mioma. A semente também é empregada para auxílio ao parto infantil, miomas e problemas de estômago (ADEDOKUN et al., 2010).

Em Belize, o suco e o pó das folhas secas são empregados como cataplasmas em feridas e locais inflamados, enquanto no México, o pó da casca é aplicado diretamente na ferida (AYOKA et al., 2008).

## 2.2.2 Aspectos Nutricionais, Constituintes Químicos e Atividades Farmacológicas

Os frutos de *S. mombin* recebem diferentes denominações, como: cajá, cajá verdadeiro, cajá-mirim ou taperebá. Sua utilização comercial tem aumentado nas últimas décadas, devido a sua acessibilidade, disponibilidade durante todo o ano, e o fácil preparo. Têm sido comumente preparados como polpas congeladas e sucos pasteurizados (HAMANO; MERCADANTE, 2001). A composição nutricional por 100 g de polpa de frutos é a seguinte: vitamina A (64 mg), vitamina B1 (50 mg), vitamina B2 (40 mg), Vitamina C (35,9 mg), caloria (45 Kcal), glicídio (11,6 g), proteína (0,8 g), lipídio (0,2 g), cálcio (56 mg), fósforo (67 mg) e ferro (0,3 mg). Além disso, os frutos são ricos em carotenoides, contendo como principal a  $\beta$ -criptoxantina, seguido da luteína (HAMANO; MERCADANTE, 2001).

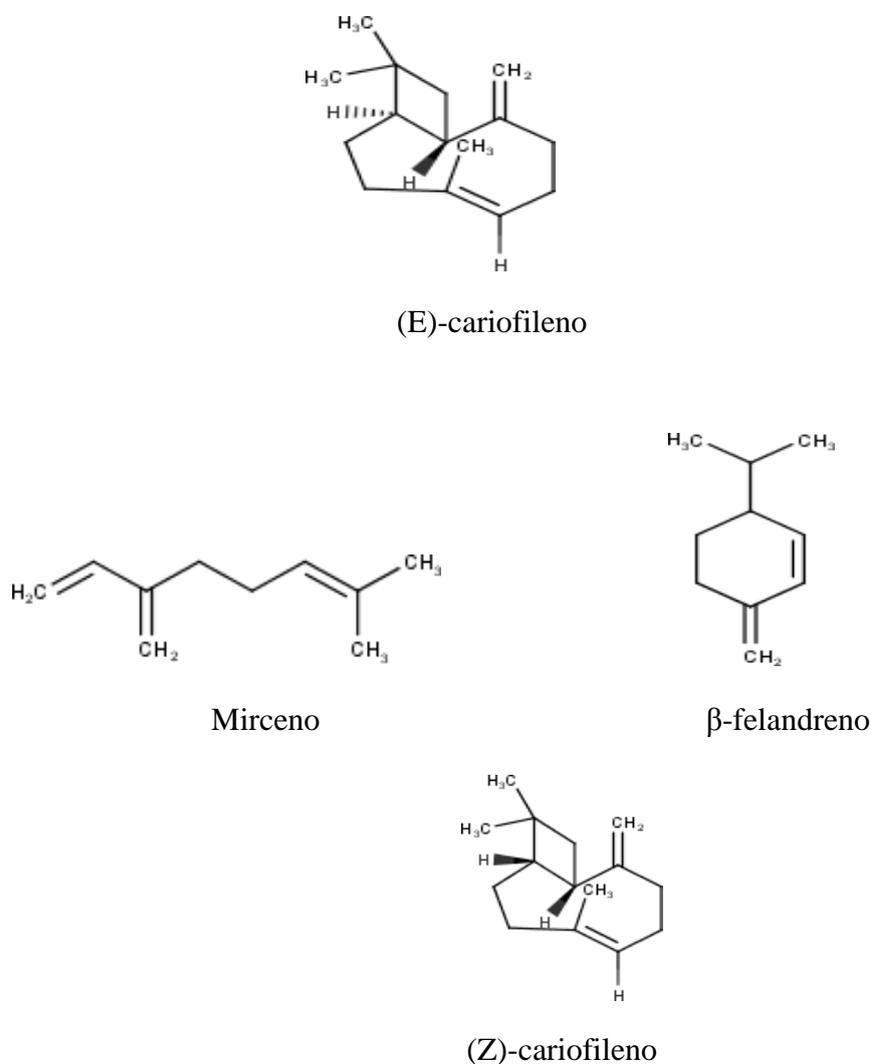
A caracterização física dos frutos de cajá revelou um comprimento médio de 2,93 cm e peso médio de 7,19 g. O fruto é constituído em maior parte por sementes, que correspondem a 51,76% do peso total. A polpa de cajá pode ser considerada ácida (pH de 2,53 e acidez titulável de 1,86%), com baixo teor de açúcar (4,54 g.100/g) e alta umidade (89,42% de umidade). Possui baixos teores de proteínas e lipídios, além de cinzas. Em relação à fibra dietética, a polpa apresentou 1,18% em sua totalidade, sendo que a fração solúvel correspondeu à maior parte (0,75%). A polpa também se destacou quanto aos teores de taninos (299,81 mg.100g/1) e carotenoides (28,30  $\mu$ g.100 g/1). As polpas extraídas nos dois tipos de equipamentos diferiram entre si, sendo que o extrator do tipo escovas apresentou maior rendimento em polpa (33,25%) e esta, maior teor de carotenoides totais (38,56  $\mu$ g.100/g); houve menor quebra de sementes (12 pontos/5 g) e, conseqüentemente, a polpa extraída com o equipamento do tipo escovas apresentou um menor teor em taninos (314,78 mg.100/g), quando comparada à polpa extraída com o equipamento de pás. A análise colorimétrica realizada na polpa *in natura* e após extração mecânica (tipo escovas) mostrou que o processo de extração afetou de maneira significativa a cor da polpa obtida, com redução significativa da luminosidade ( $L^*$  de 61,02 a 57,37) e das coordenadas ( $a^*$  de 14,73 a 12,12 e  $b^*$  de 41,50 a 38,96) (MATTIETTO; LOPES; MENEZES, 2010)

O fruto é extremamente aromático, apresentando quantidades expressivas de carotenoides e compostos fenólicos ao ser comparado com outros frutos, como o maracujá e o abacaxi (CARVALHO et al., 2008).

Estudo realizado por Ceva-Antunes et al. (2003) mostrou que substâncias voláteis do cajá e frutos de taperebá, ambos classificados como *S. mombin*, mas de diferentes origens geográficas, foram extraídos (e analisados) utilizando microextração em fase sólida (MEFS) e

destilação e extração simultânea (DES). Quarenta e oito substâncias foram identificadas em taperebá e 47 em cajá por MEFS utilizando uma fibra DVB/CAR/PMDS. (*E*)-Cariofileno (18,7%), butirato de etila (10,0%) e hexanoato de etila (7,0%) foram os componentes voláteis mais abundantes em taperebá extraídos pela MEFS, enquanto o mirceno (41,1%) e o beta-felandreno foram os principais constituintes do cajá (Figura 2). No extrato de taperebá DES, foram identificadas 46 substâncias, predominando o (*Z*)-cariofileno (13,2%) e o limoneno (9,5%) (Figura 2). Das 42 substâncias encontradas no extrato DES do cajá, os principais componentes foram o mirceno (38,0%) e o *p*-cimeno (6,2%) (Figura 2). Os dois frutos apresentaram cromatogramas semelhantes com o uso de DES e MEFS.

Figura 2 – Componentes voláteis identificados nos frutos de *Spondias mombin*.



A composição fitoquímica revelou que não há diferença significativa entre folhas, caule e raiz, sendo todos de grande significância medicinal. O caule é rico em alcaloides e saponinas, enquanto que as folhas são ricas em flavonoides e taninos. Já a raiz apresenta um alto teor de saponinas, porém menor que o encontrado no caule. Em função da composição química das partes de *S. mombin*, o caule, raiz e as folhas possuem um grande potencial medicinal (ALOBÍ et al., 2017).

As folhas foi atribuída atividade antiviral, sendo encontrados elagitaninos e ésteres do ácido cafeíco, bem como atividade antibacteriana e moluscicida atribuída a ácidos fenólicos (CORTHOOUT et al., 1994). Além disso, os extratos das folhas apresentam quercetina e ácido elágico que podem estar diretamente correlacionados com a cicatrização da ferida e propriedade anti-inflamatória (SILVA et al., 2012).

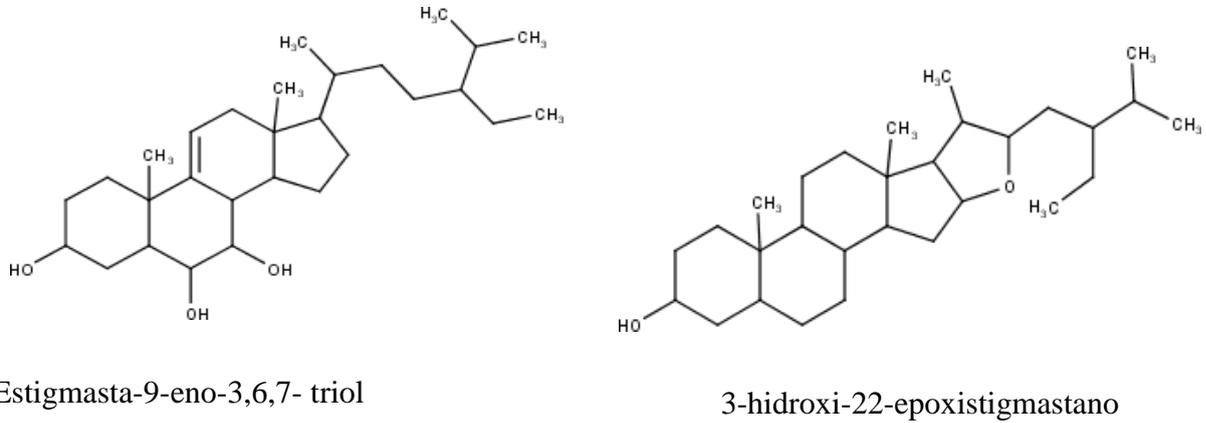
Os extratos das folhas de *S. mombin* contêm fenóis, taninos hidrolisados, flavonas, flavonoides, leucoantocianidinas e saponinas (SILVA et al., 2012), estando de acordo com Corthout (1992) que demonstrou a presença de taninos hidrolisados em *S. mombin*.

Outro estudo do extrato das folhas realizado por Njoku et al. (2007) revelou a presença de taninos (3,82%), saponinas (7,6%), flavonoides (3,00%), alcaloides (6%) e outros compostos fenólicos. De acordo com Nworu et al., (2011), o extrato metanólico possui propriedades anti-inflamatórias, uma vez que inibe significativamente a produção de TNF- $\alpha$  e NO, importantes mediadores do processo inflamatório.

Testes realizados com os radicais DPPH e ABTS mostraram que o extrato de *S. mombin* apresentou resultado satisfatório quanto ao seu potencial de diminuição da formação de radicais livres, sendo atribuída a presença de compostos com boa atividade antioxidantes, como ácido elágico e a quercetina, encontrados nos extratos (SILVA et al., 2012).

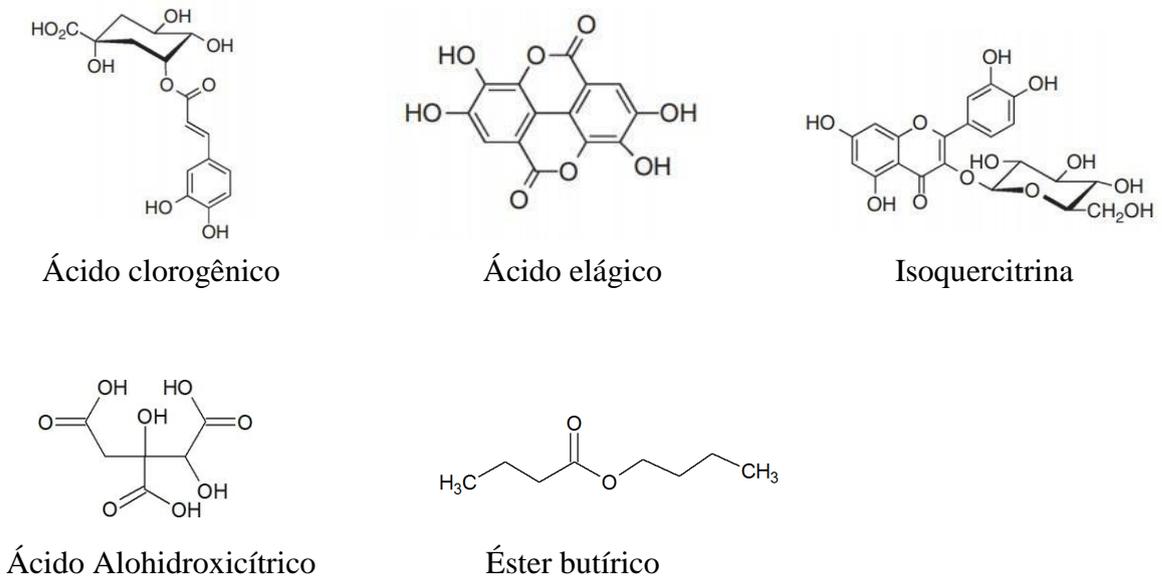
Em relação à casca do caule, um estudo realizado por Olugbuyiro et al. (2013) verificou a presença de dois fitoesteróis com atividade antimicobacterianos, identificados como estigmasta-9-eno-3,6,7- triol e 3-hidroxi-22-epoxystigmastano (Figura 3), sendo a fração que contêm estes compostos, responsável pela inibição contra o *M. tuberculosis* em 92,8% , um pouco inferior à encontrada na rifampicina (99,7%) (OLUGBUYIRO et al., 2013).

Figura 3 – Fitoesteróis identificados na casca do caule de *Spondias mombin*.



Cabral et al. (2016) observaram a presença de ácidos fenólicos e flavonoides no extrato das folhas de *S. mombin*. A análise qualitativa do extrato etanólico apresentou três compostos fenólicos: ácido elágico, ácido clorogênico e a isoquercetrina (Figura 4). Éster butírico e ácido alohidroxicítrico, compostos derivados do ácido clorogênico e ácido cafeico, respectivamente, foram isolados também das folhas (CORTHOOUT et al., 1992).

Figura 4 – Constituintes químicos encontrados nas folhas de *Spondias mombin*.



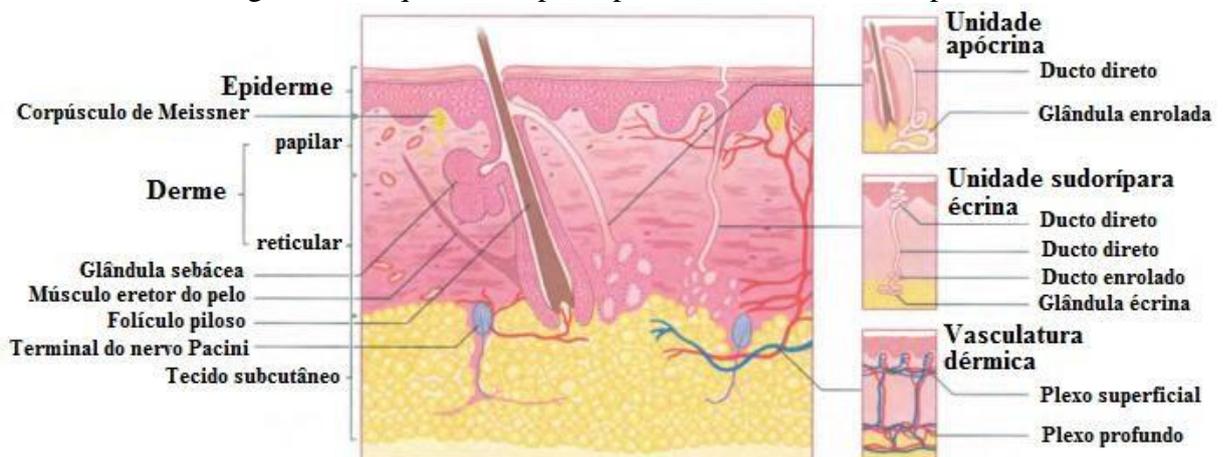
Nos trabalhos de Brito et al (2018) verificou-se a presença de ácido gálico e ácido elágico no extrato etanólico das folhas, sendo atribuída a estes protetores gástricos, a capacidade antiulcerogênica devido atividade antioxidante, estimulação da produção de muco, atividade antissecretora e atividade anti- *Helicobacter pylori*.

Frações das folhas de *S. mombin* apresentaram atividade inibitória das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, importantes no metabolismo dos açúcares, sendo promissora nos estudos relacionados ao controle dos níveis de glicose no sangue (OJO et al., 2018)

### 2.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DA PELE

A pele constitui o maior órgão do corpo humano e apresenta uma extensão de aproximadamente 2 m<sup>2</sup>, peso de cerca de 4,5 kg, espessura entre 0,5 e 4 mm, com cerca de 20% do conteúdo total de água do organismo, constituindo a principal barreira física contra o meio externo correspondendo de 10 a 15% do peso corporal (KOLARSICK et al., 2011). A estrutura da pele é complexa, pois contém diferentes tecidos que se integram para exercer suas funções, formando diversas camadas, como a epiderme, camada mais superficial; a derme, camada intermediária e a hipoderme, camada mais profunda (Figura 5) (WILLIAMS; KUPPER, 1996; CHUONG et al., 2002).

Figura 5 – Esquema das principais células e tecidos da pele.

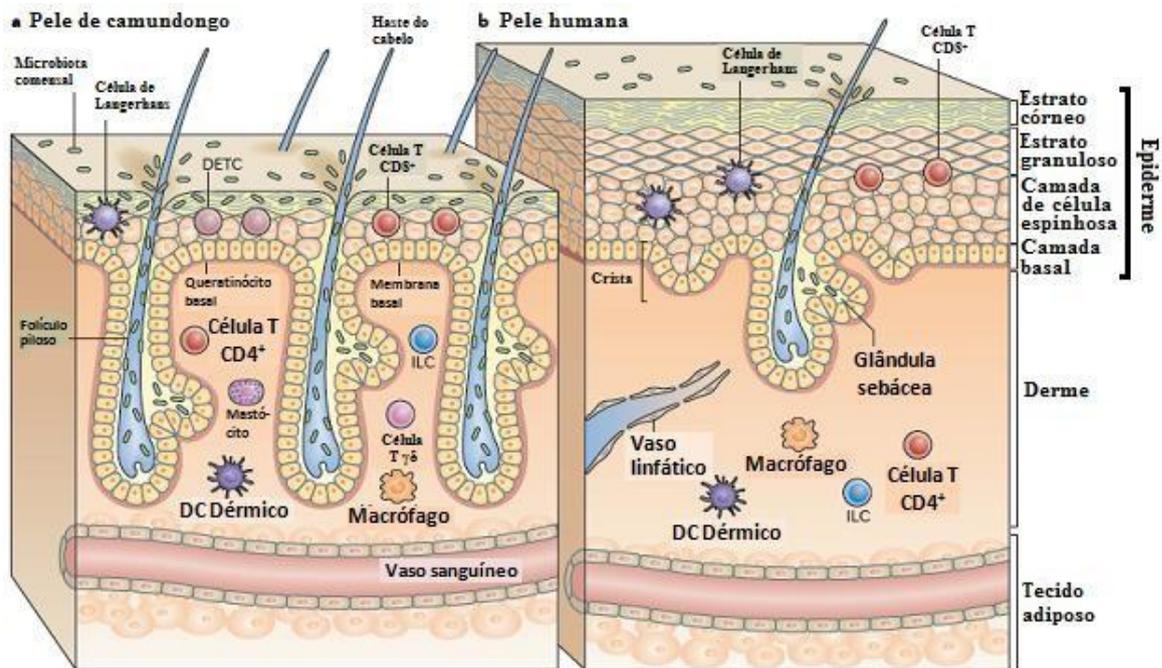


Fonte: KOLARSICK et al., 2011.

A epiderme é a camada mais superficial da pele e é constituída por um epitélio estratificado, pavimentoso e queratinizado, e subdividida em estrato basal (estrato germinativo), estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo (estrato disjunto) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; PASPARAKIS et al., 2014; SEGRE, 2006). A

espessura, o tipo de camada córnea e a presença ou ausência do estrato lúcido são influenciados pela densidade da pelagem. A epiderme é formada por quatro tipos celulares: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (PROKSCH et al., 2008; SEGRE, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SOUZA et al., 2009). A quantidade de cada uma dessas células é variável, mas aproximadamente 85% delas são ceratinócitos, 5-8% são melanócitos e 5% são células de Langerhans (SOUZA et al., 2009; PASPARAKIS et al., 2014). Os queratinócitos migram constantemente para formar os diferentes estratos epidérmicos de modo que o estrato basal é o berço das células da epiderme e a queratina é o produto da diferenciação dos queratinócitos basais (Figura 6). Assim, a epiderme é uma estrutura dinâmica constantemente renovada pela descamação do estrato córneo (SOUZA et al., 2009; COSTA; SPERANCINI, 2001).

Figura 6 - Estrutura e componentes celulares da pele em camundongos e humanos.

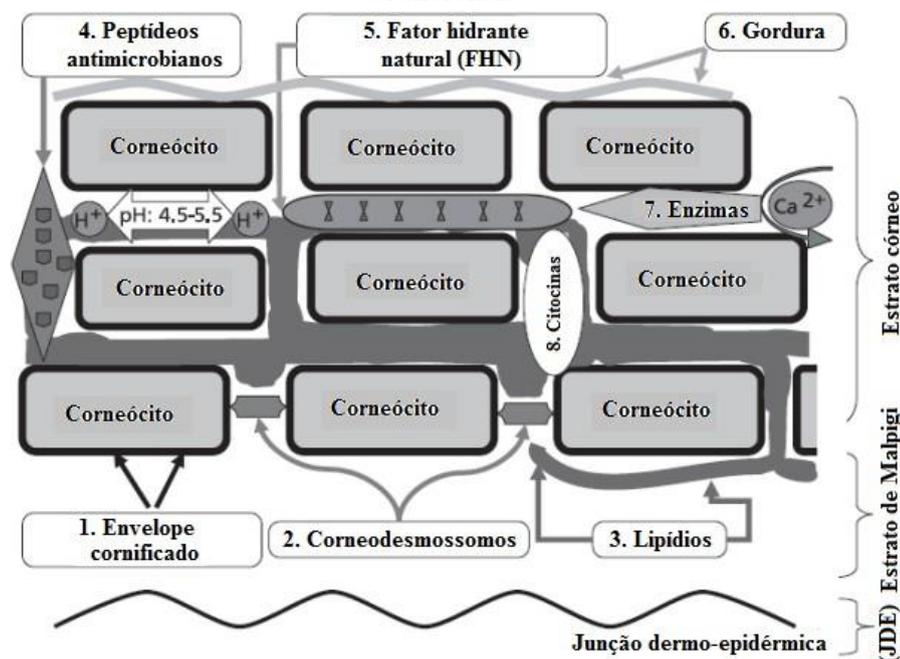


Fonte: Adaptado de PASPARAKIS et al. (2014).

Do ponto de vista fisiológico, a epiderme apresenta diferentes funções entre as quais podem-se destacar: protege contra traumas físicos e químicos; resiste às forças de tensão; previne a desidratação e perda de eletrólitos; restringe a passagem de corrente elétrica; protege contra entrada de substâncias tóxicas e dos efeitos nocivos do UV através da melanina (CUCÉ; NETO, 1990). No estrato córneo, as funções de defesa limitam a desenvolvimento de

micro-organismos em decorrência do baixo teor de água, pH ácido, presença de microbiota residente normal, bem como lipídeos e peptídeos antimicrobianos de superfície. A defesa dos micro-organismos é favorecida pelo pH ácido cutâneo que ocasiona uma resistência aos peptídeos antimicrobianos e secreta substâncias inibidoras, como os ácidos propiônico e acético, e antimicrobianas, como penicilina e ácido azelaico, que reduz o crescimento de substâncias patogênicas (Figura 7) (DARLENSKI et al., 2011; SPELLBERG, 2000). Além disso, a epiderme se encontra sobre a derme e a superfície de contato estimula as trocas de nutrientes e metabólitos (KOSTER; ROOP, 2004; KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004).

Figura 7 – Estrutura esquemática da barreira epidérmica com elementos morfológicos e funcionais.



Fonte: Adaptado de DARLENSKI et al., 2011.

A derme ou córion tem origem mesodérmica, está separada da epiderme pela membrana basal e é dividida em derme papilar (ou superficial) e derme reticular (ou profunda). A derme papilar se interdigitaliza com a epiderme através das papilas dérmicas e epidérmicas, enquanto a derme reticular localiza-se entre a derme papilar e o tecido subcutâneo (SOUZA et al., 2009). Uma variedade de células, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e matriz extracelular, produzida por fibroblastos, constituem a derme e sua espessura possui elasticidade, força e resistência mecânica (ECKES; KRIEG, 2004; DARLENSKI et al., 2011; SAMPAIO; RIVITT, 2001). Os leucócitos, macrófagos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos, apresentam funções contra infecção de micro-organismos, inflamação e cicatrização (WILLIAMS; KUPPER, 1996; RYAN, 2004). O sistema de inervação sensitiva e vegetativa da derme inerva glândulas sudoríparas, músculo piloerector e

vasos sanguíneos, auxilia no controle da temperatura corporal, conduz estímulos mecânicos, térmicos, químicos e dolorosos para o Sistema Nervoso Central através de neurônios aferentes que recebem os mais diferentes estímulos da periferia (GARLE; FRY, 2003; GOODWIN; WHEAT, 2004). Portanto, entre as diversas funções da derme destacam-se a flexibilidade da pele, a proteção contra traumas mecânicos; a manutenção da homeostase; o armazenamento de sangue para as necessidades do organismo; a determinação da cor da pele e proteção contra patógenos (CUCÉ; NETO, 1990).

A hipoderme ou panículo adiposo é a camada mais profunda da pele, de espessura variável que está associada com a derme profunda, onde encontram-se porções secretoras das glândulas apócrinas ou écrinas e de pêlos, vasos e nervos (KOSTER; ROOP, 2004; KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004). Essa porção da pele é formada pelas camadas areolar, mais superficial e composta por adipócitos globulares e volumosos, e a lamelar (GUIRRO; GUIRRO, 2002). A hipoderme tem função de depósito nutritivo de reserva, participa no isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos e facilita a mobilidade da pele (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

As diferentes células que constituem as camadas da pele consentem que este órgão produza respostas para uma variedade de estímulos nocivos, frente ao meio externo, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação UV e variações de temperatura, favorecendo a manutenção da homeostasia cutânea e do organismo (WILLIAMS; KUPPER, 1996).

#### 2.4 RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA PELE

Um processo inflamatório pode ser desencadeado por múltiplos agentes, tais como biológicos (bactérias, vírus e protozoários), químicos (ácidos, álcalis, formaldeído, óleo de Croton, carragenina e substâncias cáusticas), físicos (temperaturas extremas, radiação UV e ionizante) e imunes, que estimulam o organismo a ativar mecanismo para combater o agente causador (LIEW, 2003; MEDZHITOV, 2008). A resposta inflamatória produzida objetiva eliminar a causa inicial da lesão celular, assim como as células e tecidos necróticos, e iniciar o processo de reparo (SHERWOOD, TOLIVER- KINSKY, 2004). Durante a ativação dos diferentes mecanismos, as células de defesa liberam mediadores inflamatórios na circulação sanguínea que aumentam a permeabilidade vascular, migração de leucócitos para os tecidos e mecanismos dolorosos, produzindo os sinais cardinais da inflamação denominados de calor,

rubor, dor e edema que podem ocasionar a perda da função do tecido (MEDZHITOV, 2008; PASPARAKIS et al., 2014). Embora a resposta inflamatória seja benéfica ao organismo ao defender e reparar danos teciduais ou perda de funções, essa pode resultar em fases aguda e crônica. A resposta aguda pode durar de horas a dias, enquanto a inflamação crônica decorre de uma resposta exagerada e descontrolada, podendo se perpetuar a longo prazo (LAWRENCE et al., 2002). Entretanto, para um melhor entendimento do processo, as etapas podem ser divididas em fase transitória aguda, a qual envolve uma vasodilatação localizada e um aumento da permeabilidade vascular; fase subaguda, que se caracteriza por infiltração dos leucócitos e células fagocitárias, e fase proliferativa crônica, na qual se verifica degeneração tecidual e fibrose (BANGERT et al., 2011; MUELLER, 2006). Além disso, na fase crônica, vários mediadores estão envolvidos, como complementos, cininas, fibrinolíticos e coagulantes estimulados juntamente com a ativação de fagócitos e das células endoteliais (KUNDU, SURH, 2008; REUTER et al, 2010).

Vários mecanismos celulares e moleculares são disparados durante a inflamação, produzindo os denominados mediadores químicos em resposta ao agente irritante. Esse processo envolve a percepção do agente nocivo por células residentes, especialmente os macrófagos, células dendríticas, mastócitos e outros tipos celulares que liberam citocinas e outras moléculas para regular a resposta inflamatória (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; O'NEILL, 2006; REUTER et al, 2010). Entre os mediadores liberados durante a resposta inflamatória destacam-se o óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador, moléculas de adesão (ICAM-1), moléculas de adesão vascular (VCAM-1 e Selectina-E), prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>); leucotrienos (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>), citocinas [fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10)], quimiocinas e outros, que coordenam os eventos de alterações vasculares inflamatórias e o recrutamento de células (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; O'NEILL, 2006).

No início do processo inflamatório, são liberados histamina e serotonina, pois são mediadores pré-formados que se localizam em grânulos, sendo, inicialmente, responsáveis pela vasoconstrição. Quando associados com outras moléculas inflamatórias, esses mediadores promovem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Na sequência da cascata de eventos, a fosfolipase A2 remove o ácido araquidônico a partir de fosfolípídeos de membrana, sintetizando prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina pela ação das enzimas ciclooxigenases (COX) (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Quando a inflamação é desencadeada, vários mediadores atuam sequencialmente: as

quimiocinas realizam quimiotaxia de leucócitos; as enzimas plasmáticas, como bradicinina e fibrinopeptídeos, aumentam a permeabilidade vascular; a plasminina degrada coágulos em produtos quimiotáticos e ativa proteínas do sistema complemento e seus derivados, como anafilotoxinas que induzem degranulação de mastócitos e a conseqüente liberação de histamina; as opsoninas induzem a opsonização de microrganismos, facilitando a fagocitose; os mediadores lipídicos como tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos participam do processo de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular; e as citocinas induzem efeitos locais, tais como indução da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas (BILATE, 2007; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; O'NEILL, 2006). Nessa cascata inflamatória, as espécies reativas do oxigênio (ERO) produzidas pelos leucócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos, têm como função destruir micro-organismos e outras substâncias em defesa do hospedeiro pela geração de superóxido que é convertido em  $H_2O_2$ . Esta molécula é, então, convertida a um composto hipoclorito altamente reativo pela enzima mieloperoxidase (MPO) presente nos leucócitos, especialmente os polimorfonucleares (CAROCHO, FERREIRA, 2013; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

Além dos mediadores já mencionados, o óxido nítrico (NO) é um radical livre reativo produzido pelos leucócitos e outras células. Ele pode reagir com o  $O_2\bullet$  e formar um composto altamente reativo, o peroxinitrito, que também participa da lesão celular (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; REUTER et al, 2010; ROVER JÚNIOR et al, 2001). O NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares e é biossintetizado a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima NO-sintase constitutiva (c-NOS) e induzível (i-NOS). Este mediador apresenta um papel dúbio, pois pode estar envolvido no relaxamento vascular e proteger o vaso sanguíneo e pode constituir um importante mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. NO é potencialmente tóxico, particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (DUSSE, VIEIRA, CARVALHO, 2003).

O entendimento dos mecanismos e dos eventos da inflamação constitui uma das bases científicas para a pesquisa de novas alternativas terapêuticas contra processos inflamatórios. Assim, associa-se, então, os conhecimentos da fisiopatologia celular e a ação de novos fármacos e produtos para beneficiar o tratamento de diferentes patologias relacionadas à inflamação.

## 2.5 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO E MODELOS DE INFLAMAÇÃO

A farmacoterapia do processo inflamatório, normalmente, está relacionada ao uso de agentes anti-inflamatórios esteroides ou glicocorticoides (AIEs) e/ou não esteroides (AINES). Os anti-inflamatórios esteroides possuem núcleo esteroidal lipofílico que é capaz de atravessar as membranas celulares e interagir com os receptores nucleares, estimulando ou inibindo a síntese de proteínas. Por meio desse mecanismo, ocorre a inibição da expressão de proteínas inflamatórias ou aumento da expressão de proteínas anti-inflamatórias com a redução da formação do edema, deposição de fibrina, migração leucocitária, atividade fagocitária e dilatação capilar, assim como as manifestações tardias do processo inflamatório, tais como proliferação fibrocapilar, acúmulo de colágeno e cicatrização (LONGUI, 2007). Os AINES são fármacos com ação analgésica, antitérmica e anti-inflamatória que inibem as enzimas ciclooxigenases (COX), de maneira específica (COX-2) ou não (COX-1 e COX-2), diminuindo a síntese de prostaglandinas e tromboxanos (HILÁRIO et al., 2006).

Os anti-inflamatórios usados na prática clínicas são eficazes contra a inflamação, entretanto, podem provocar efeitos adversos, tais como irritação gástrica, ulceração, hemorragia, insuficiência renal, nefrite intersticial, dor de cabeça, trombocitopenia, anemia hemolítica, asma, exacerbação, erupções cutâneas, angioedema e prurido, que limitam seu uso prolongado (LONGUI, 2007; HILÁRIO et al., 2006). Diante desses efeitos prejudiciais, uma das alternativas para o tratamento é o uso de produtos naturais e/ou plantas medicinais que tem sido bem tolerado pelos usuários ao longo do tempo (BOULLATA; NACE, 2000). Além dos preparados medicinais produzidos pela população, substâncias isoladas (alcaloides, glicosídeos, terpenos, polissacarídeos, flavonoides, compostos fenólicos, canabinoides, esteroides e ácidos graxos, entre outros) e extratos de plantas têm sido comprovados suas ações anti-inflamatórias cientificamente (SARWAR et al., 2011). Essas substâncias atuam por inibição das vias inflamatórias, principalmente das enzimas fosfolipase A2, lipoxigenases e ciclooxigenases, reduzindo a geração mediadores como prostanóides e leucotrienos (COSTA et al, 2012; DEEPA, RENUKA, 2014; FROST-MEYER; LOGOMARCINO, 2012; GOMES et al, 2008).

Visando a busca de novos agentes anti-inflamatórios, diferentes modelos *in vivo*, *in vitro* e *in situ* têm sido empregados em estudos experimentais. O ensaio do edema de orelha em camundongos, por exemplo, se fundamenta pela aplicação de agentes irritantes para medidas de espessura e massa da orelha inflamada após tratamento com uma amostra teste. Entre os agentes irritantes, destacam-se o óleo de Croton, o ácido araquidônico, o fenol, a

capsaicina e a histamina. Os fragmentos obtidos a partir da orelha podem ser avaliados do ponto de vista histopatológicos e determinação de marcadores inflamatórios (CRUMMEY et al, 1987; GÁBOR, RÁZGA, 1992; LIM, PARK, KIM; 2004; SCHIANTARELLI et al, 1982; YOUNG et al, 1984). Além de fornecer resultados rápidos, elevada reprodutibilidade e alto grau de confiabilidade, o modelo de edema de orelha é uma metodologia simples e rápida, sendo necessária pequena quantidade do material a ser testado (CALIXTO et al, 2004; GÁBOR, 2003).

O modelo do edema de orelha induzido por óleo de Croton foi usado no presente estudo. O óleo de Croton é um potente agente nocivo extraído da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae) usado em pesquisa de novos produtos anti-inflamatórios tópicos. Sua composição constitui de uma mistura de lipídeos cujo principal componente é o éster de forbol denominado 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA). O TPA induz um estresse oxidativo com produção de espécies reativas de oxigênio, proliferação e ativação de oncogenes nucleares e inflamação cutânea, que pode causar uma hiperplasia da epiderme (BILATE, 2007; CALIXTO et al, 2004; RAHMAN et al, 2008). Além disso, a fisiopatogenia do edema induzido pelo TPA é exercida pela ação das proglândinas, histamina e serotonina e está associada à resposta inflamatória, similar a algumas doenças de pele, como a psoríase. Após sua aplicação desencadeia-se uma resposta inflamatória aguda, caracterizada pela vasodilatação, infiltração de leucócitos polimorfonucleares e edema (CALIXTO et al, 2004; RAHMAN et al, 2008; SARAIVA et al, 2010).

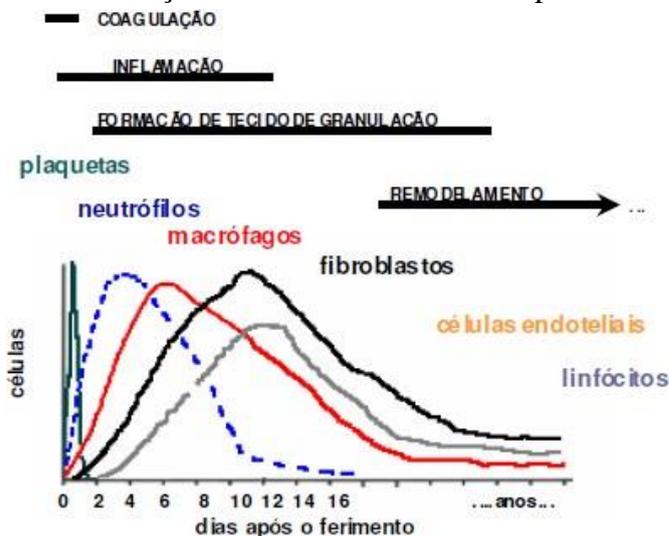
## 2.6 CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

Um dos problemas cutâneos que afetam cerca de 6 milhões de pessoas é a presença de feridas crônicas que atinge 4,5 casos por 1000 habitantes, enquanto as feridas agudas são encontradas em aproximadamente 10,5 casos por 1.000 habitantes. As condições precárias de higiene, as opções terapêuticas restritas e a dificuldade do acesso a medicamentos mais eficazes e seguros constituem as principais causas da frequência mais elevada dessas feridas nos países em desenvolvimento (SANDHYA et al., 2011). Um dos aspectos importantes para o tratamento de lesões é a sua classificação que deve considerar as condições de integridade da pele, assim como a causa, gravidade e limpeza do local lesionado. Feridas de espessura parcial, por exemplo, limitam-se à porção mais superficial da pele, cicatrizando-se por regeneração, com proliferação epitelial e migração, sem ocorrência de perda da sua função,

enquanto as feridas totais promovem destruição completa do tecido, podendo comprometer músculos e ossos (RAGHOW, 1994).

Do ponto de vista da cicatrização, o processo é complexo e envolve uma cascata de eventos celulares e moleculares para repavimentação e reconstituição da pele que consiste em um mecanismo dinâmico com fenômenos bioquímicos e fisiológicos que podem ser modulados por interações celulares, incluindo vias de neurônios sensoriais (FAZIO et al., 2000; SLOMINSKI; WORTSMAN, 2000). No entanto, pode ocorrer desequilíbrio no processo de cicatrização em situações de estresse e hiperestimulação simpática que levam a hiperatividade de glândulas e do aparelho pilossebáceo, modificando as propriedades bioelétricas e neurosecretoras da pele (PINTÉR et al., 1997; ZANCANARO et al., 1999; SAUERSTEIN et al., 2000). O processo de cicatrização, normalmente, segue uma sequência de estágios que compreendem a inflamação, quimiotaxia, proliferação celular, diferenciação e remodelação (TAZIMA et al., 2008). Além disso, esses estágios podem ser agrupados de três a cinco fases (coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação (FAZIO et al., 2000; TAZIMA et al., 2008) que podem ocorrer simultaneamente em determinado momento, permitindo a cicatrização (Figura 8) (FAZIO et al., 2000; HATANAKA; CURI, 2007).

Figura 8 - Fases da cicatrização correlacionadas com a especificidade imune celular.



Fonte: HATANAKA; CURI, 2007.

## 2.6.1 Fases da cicatrização

### 2.6.1.1 Fase inflamatória ou exsudativa

A fase inflamatória ou exsudativa tem duração de 48 a 72 horas e caracteriza-se pelo aparecimento dos sinais clássicos da inflamação como dor, calor, rubor e edema

(HATANAKA; CURI, 2007). Os mediadores químicos inicialmente liberados por plaquetas e mastócitos provocam vasodilatação, aumentam a permeabilidade dos vasos e favorecem a quimiotaxia dos leucócitos, principalmente neutrófilos e monócitos/macrófagos que tem como função, combater os agentes invasores e realizar a fagocitose dos produtos resultantes da lise tecidual (HATANAKA; CURI, 2007; MOLLINEDO et al., 1999). Após lesão do endotélio, a cascata de coagulação é ativada com liberação de grânulos do fator de crescimento de transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), prostaglandinas (PGs) e tromboxanas (TXs) (Tabela 1). Esses mediadores ocasionam a permeabilidade vascular que promove extravasamento de plasma e seus componentes formando o exsudato inflamatório (BALBINO et al., 2005). Em seguida, a lesão é preenchida por coágulos, fibrinas e exsudato, formando uma crosta que isola a ferida do meio externo. O coágulo formado é constituído por colágeno, plaquetas e trombina que servem de reservatório protéico para síntese de citocinas e fatores de crescimento (HATANAKA; CURI, 2007).

Tabela 1 - Principais tipos celulares e mediadores envolvidos na cicatrização.

Tipos celulares presentes no ferimento	Principais mediadores liberados	Principais efeitos desencadeados
Plaquetas	TGF- $\beta$ , PDGF (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD), PAF, fibrinogênio, fibronectina, tromboplastina	Formação de trombo plaquetário que tampona a lesão e recrutamento de neutrófilos, monócitos
Neutrófilos	IL-6, IL-8, IL-1, TNF- $\alpha$ , CTAP-III, TGF- $\beta$ , HGF, MIP, HLE	Recrutamento de monócitos/macrófagos
Monócitos/Macrófagos	TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , VEGF-A, IL-6, IL-8, IL-1, TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, HB-EGF, HGF, MIP, MSP	Quimiotaxia de monócitos e fibroblastos, proliferação de fibroblastos, angiogênese e síntese de colágeno
Células residentes:	(a) FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF10, IP-10, MCAF, IL-8, eotaxina, PLGF, TGF- $\beta$ , Cyr61	Maturação e remodelamento da matriz extracelular e angiogênese
(a) Fibroblastos	(b) MCP-1, FGF1, FGF2, TGF- $\beta$ , MIP-2, MSP	
(b) Queratinócitos	(c) MCP-A	
(c) Células endoteliais		

Fonte: Adaptado de HATANAKA; CURI, 2007.

As citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, são liberadas imediatamente após a lesão que ativam células endoteliais, induzindo a produção de óxido nítrico (NO), aumento de expressão de moléculas de adesão, o que permite a migração de mais fagócitos

para a área inflamada. A IL-6 também está relacionada aos processos de reparo dos efeitos quimioatrativos dos neutrófilos e indução mitótica de queratinócitos (SATO et al., 1999).

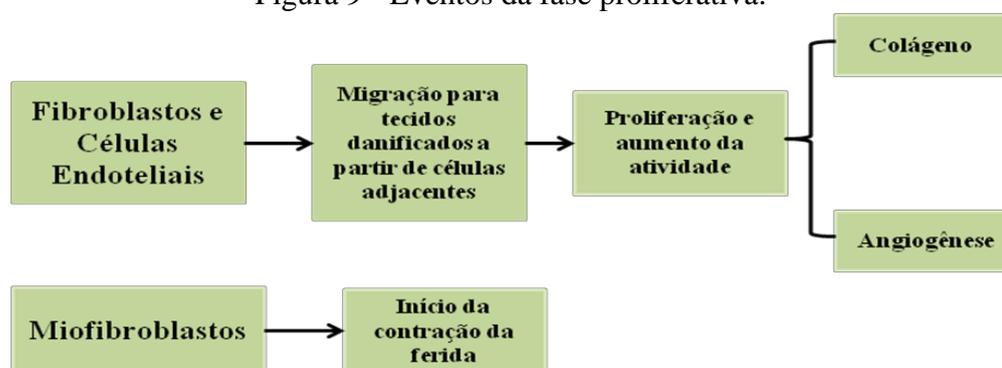
Devido à permeabilidade vascular, os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local da lesão, com maior concentração em 24 horas após início do processo. O mecanismo de migração de neutrófilos envolve a adesão à parede do endotélio por meio da interação as selectinas e a liberação de radicais livres que auxiliam na destruição dos micro-organismos. Os neutrófilos, então, são gradativamente substituídos por macrófagos, os quais migram para a ferida após 48-96 horas da lesão e apresentam papel fundamental na remoção do tecido morto (MARTINS et al., 2006). Secretam citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese, fibroplastia e síntese de matriz extracelular, fundamentais na transição para a fase proliferativa (BALBINO et al., 2005). Além disso, os macrófagos fagocitam as bactérias e se degeneram formando o pus com os tecidos necróticos (BROUGHTON et al., 2006; GROTE et al., 2011).

#### *2.6.1.2 Fase proliferativa ou reconstrutiva*

O fechamento da lesão é indicativo da fase de proliferação em que ocorre a troca do tecido lesionado pelo tecido de granulação, rico em colágeno, com preenchimento da lesão e contração das bordas da pele, tornando menor a área a ser re-epitelizada. A presença do exsudato permite a desagregação da crosta e o crescimento de micro-organismos, o que é um sinal de infecção na área (CAMPOS et al., 2008). Esse processo ocorre cerca de quatro dias após o início da lesão e persiste por 12 a 14 dias, compondo as etapas de re-epitelização, fibroplasia e angiogênese. Durante a fase proliferativa, os fibroblastos são responsáveis pela produção da nova matriz extracelular, uma vez que o fator de crescimento PDGF ativa o estado de quiescência com liberação do TGF- $\beta$  que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I. Os fibroblastos que se diferenciam em miofibroblastos promovem a contração da lesão (BROUGHTON et al., 2006) (Figura 9).

Entre as etapas do processo proliferativo, a re-epitelização promove o aumento da permeabilidade microvascular com extravasamento de proteínas, citocinas e elementos celulares, o que forma a matriz extracelular provisória (TAZIMA et al., 2008). Os queratinócitos viáveis, então, migram das bordas das lesões e dos anexos epiteliais, os quais permitem a aceleração dos mecanismos mitóticos com hiperplasia do epitélio. Em seguida, as células epiteliais migram em direção a superfície e camadas da epiderme são restauradas em três dias (MANDELBAUM et al., 2003).

Figura 9 - Eventos da fase proliferativa.



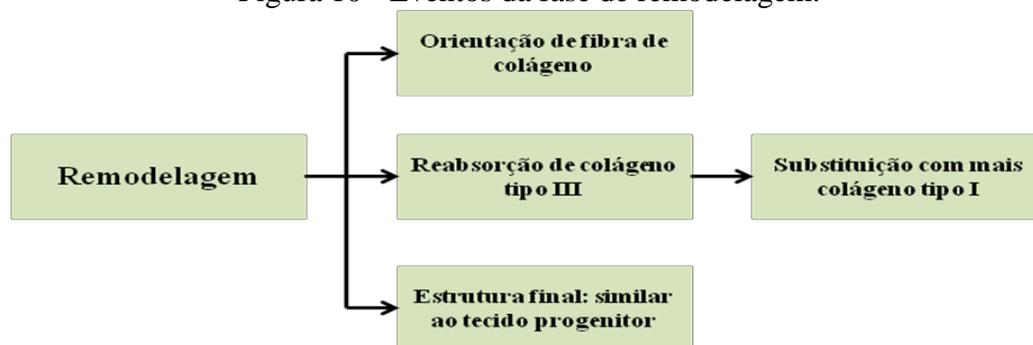
Fonte: Adaptado de SANDHYA et al., 2011.

Após a re-epitelização, a matriz extracelular é substituída por um tecido conjuntivo denso e elástico, constituindo-se assim a etapa da fibroplasia (HARTLAPP et al., 2001). Além disso, a ação de fatores de crescimento sobre as células endoteliais induz a angiogênese que ocorre, em parte, pela baixa tensão de oxigênio no centro da ferida, elevados níveis de ácido láctico e aminas bioativas (BALBINO et al., 2005; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009). É importante destacar que a angiogênese é uma etapa fundamental do processo de cicatrização, na qual novos vasos sanguíneos são formados e responsáveis por suprir nutrientes e oxigênio ao tecido em crescimento (JORGE; DANTAS, 2005).

### 2.6.1.3 Fase de remodelagem ou maturação

A etapa que promove a constituição da cicatriz é a fase de remodelagem ou maturação que é um processo longo com início na terceira ou quarta semana após a lesão e pode persistir por meses a anos dependendo do grau, extensão e local da lesão. A proliferação de fibroblastos com deposição de colágeno continua ocorrendo para comprimir os vasos e diminuir a vascularização e a produção de matriz extracelular. Nesta fase, ocorre o retrocesso do tecido de granulação com aumento da força tênsil e as fibras de colágeno são reorientadas para trocar o tecido de granulação por tecido conjuntivo denso para formação da epiderme. Entre os achados encontrados, os eosinófilos aparecem e podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento, enquanto a colagenase, a gelatinase e outras enzimas hidrofílicas, secretadas pelos fibroblastos, produzem uma lesão cicatrizada. Finalmente, tecido cicatrizado contém células imunológicas formadas, principalmente, por linfócitos que produzem fatores de crescimento para o funcionamento tecidual (Figura 10) (BALBINO et al., 2005; SANDHYA et al., 2011).

Figura 10 - Eventos da fase de remodelagem.



Fonte: Adaptado de SANDHYA et al., 2011.

À medida que o tempo passa, em torno de 30 a 90 dias, pode apresentar coloração rosada, aumento de volume e se tornar sintomática. Desse período até aproximadamente um ano, regride gradativamente, atingindo um aspecto um pouco mais claro que a pele, plana e discretamente mais larga que no seu estado inicial. Além desses eventos, ocorre também a retração da cicatriz ao longo de seu comprimento, sendo máxima aos três meses, regredindo, parcial ou totalmente, após um ano. O epitélio que recobre a cicatriz é geralmente mais fino que o normal e não apresenta papilas dérmicas (MANDELBAUM et al., 2003). Uma cicatriz cutânea completamente madura apresenta apenas 70% de resistência se comparada à pele normal (HATANAKA e CURI, 2007).

## 2.7 HIPÓTESES DO ESTUDO

Baseado nos usos tradicionais, como anti-inflamatório e cicatrizante, e na presença de substâncias com potencial terapêutico descritos para a espécie *S. mombin*, que podem estar presentes em diferentes partes do vegetal, as hipóteses testadas neste estudo foram as seguintes:

- 1 – Existem substâncias químicas na casca e madeira do caule de *S. mombin* que podem estar relacionadas às suas propriedades terapêuticas?
- 2 – Extratos etanólicos e formulações em gel da casca e madeira do caule de *S. mombin* possuem atividade anti-inflamatória tópica em modelo animal?
- 3 - Extratos etanólicos e formulações em gel da casca e madeira do caule de *S. mombin* possuem atividade cicatrizante em ensaio *in vivo*?

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

O estudo tem como objetivo investigar constituintes químicos e avaliar as atividades anti-inflamatória e cicatrizante de extratos e formulações tópicas da casca e da madeira do caule de *Spondias mombim* L, a fim de contribuir com suas propriedades medicinais para que esses produtos possam ser aplicados na terapêutica baseada em evidências científicas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar quimicamente extratos da casca e madeira do caule de *S. mombim*.
- Preparar géis dermatológicos a partir de extratos da casca e madeira do caule de *S. mombim*.
- Investigar a atividade anti-inflamatória tópica dos extratos e géis de *S. mombim* em modelo animal.
- Avaliar o efeito cicatrizante dos extratos e géis de *S. mombim* em modelo *in vivo*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COLETA E MATERIAL VEGETAL

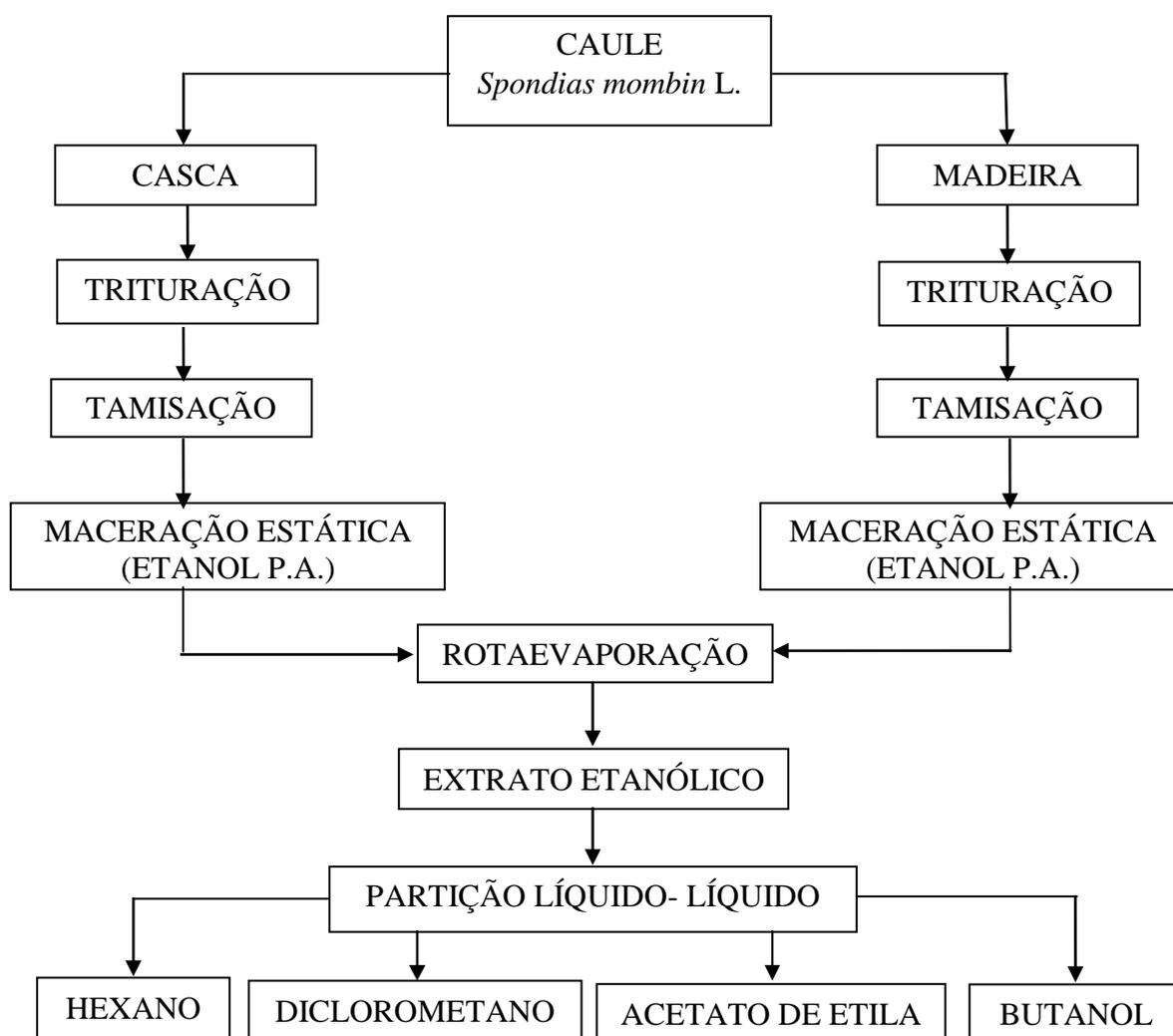
*Spondias mombin* L. foi coletada na Universidade Federal da Bahia (UFBA). Uma exsicata, identificada por Dr. Lázaro Benedito da Silva do Instituto de Biologia da UFBA, foi depositada no Herbário Alexandre Leal Costa sob nº 40/2016. A coleta ocorreu em 1 de Dezembro de 2016 e constou de corte dos galhos da planta que foram submetidas à secagem em temperatura de 50°C, com ventilação forçada até perda de 90 a 96% de umidade.

### 4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO E FRACIONAMENTO

Após coleta e secagem do caule, a casca foi removida da madeira e ambos materiais foram triturados separadamente em moinho elétrico, com peneira de granulação definida (tamis nº 20) para preparo dos extratos. As drogas vegetais foram submetidas a processo de extração em etanol PA (5,0 L) por maceração estática com renovação do solvente, à temperatura ambiente, até seu esgotamento para adquirir os extratos etanólicos das cascas (EECSM) e da madeira (EEMSM). A remoção do solvente foi realizada em rota-evaporador RII (Buchi Switzerland®).

Após obtenção dos extratos, cerca de 10 g de cada extrato seco (EECSM e EEMSM) foi ressuspendido em água: etanol (9:1) e submetido a um processo de fracionamento através de partição líquido-líquido com solventes orgânicos de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) para obter as frações hexânica (FHCSM e FHMSM), diclorometânica (FDCSM e FDMSM), em acetato de etila (FACSM e FAMSM) e butanólica (FBCSM e FBMSM) (Figura 11) (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998). Os extratos etanólicos e suas frações foram usados na investigação química, nos testes de avaliação das atividades farmacológicas e desenvolvimento de formulações.

Figura 11 – Fluxograma do processo de extração e fracionamento do caule de *Spondias mombin* L.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS

Os teores de fenóis totais foram determinados por espectrofotometria na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu (SOUSA et al., 2007). A partir da solução estoque de ácido gálico (1 mg/mL) em etanol, foram preparadas, em triplicata, concentrações (1,5 a 5 µg/mL) em tubos de ensaio. Alíquotas da solução estoque de ácido gálico foram transferidas para tubos de ensaio e, em seguida, foram adicionados 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (Tabela 2). Após 8 minutos, 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15% e água destilada foram adicionados para completar o volume de 10 mL. A reação permaneceu em temperatura

ambiente durante 30 minutos e, em seguida, as absorvâncias das soluções de ácido gálico foram medidas através de espectrofotômetro (SHIMADZU®, UV-1800) em 722 nm. Para realizar o “auto-zero” do espectrofotômetro, foi utilizado etanol e o branco das amostras foi composto por etanol e todos os reagentes, exceto as soluções de ácido gálico.

Com as médias das absorvâncias de cada concentração de ácido gálico foi construída a curva de calibração e após, através de análise de regressão linear foi traçada a reta entre os pontos e determinada a equação da reta, juntamente com o coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

Para quantificação dos teores de fenóis totais nas amostras, foi preparada solução estoque do extrato etanólico e frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) a 5 mg/mL em etanol. A partir dessa solução estoque, foram preparadas, em triplicata, três concentrações diferentes em tubos de ensaio. Alíquotas de 250 $\mu$ L das soluções das amostras foram transferidas para tubos de ensaio. A reação e leitura espectrofotométrica foram realizadas da mesma forma descrita para o padrão.

Tabela 2 – Diluições a partir da solução estoque de ácido gálico (1 mg/mL) para elaboração da curva padrão.

Tubo	Volume S.E. ( $\mu$ L)	Folin-Ciocalteu ( $\mu$ L)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 15% (mL)	Água (mL)	Concentração ( $\mu$ g/mL)
1	15	500	2	7,485	1,5
2	20	500	2	7,480	2,0
3	25	500	2	7,475	2,5
4	30	500	2	7,470	3,0
5	40	500	2	7,460	4,0
6	45	500	2	7,455	4,5
7	50	500	2	7,450	5,0
Branco	-	500	2	7,500	-

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FLAVONOIDES TOTAIS

A quantificação de flavonoides totais foi realizada por espectrofotometria na região do visível utilizando cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) (SOBRINHO et al., 2008). Solução estoque de quercetina (0,5 mg/mL) em etanol foi usada como padrão para a obtenção da curva de

calibração com diluições entre 1 a 10 µg/mL. Conforme Tabela 3, foram transferidos volumes de solução-estoque, 0,4 mL de etanol, 0,12 mL de ácido acético, 2 mL de solução de piridina a 20% em etanol, 0,5 mL de AlCl<sub>3</sub> a 8% em etanol e água destilada para tubos de ensaio. Após 30 minutos em temperatura ambiente, as absorvâncias das soluções de quercetina foram registradas em espectrofotômetro (SHIMADZU<sup>®</sup>, UV-1800) a 419,4 nm. Para realizar o “auto-zero” do espectrofotômetro, foi utilizado etanol e o branco das amostras conteve etanol e os reagentes, exceto soluções de quercetina. Com as médias das absorvâncias de cada concentração de quercetina foi construída a curva de calibração e, após análise de regressão linear, foi traçada a reta entre os pontos e determinada a equação da reta, juntamente com o coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>).

Tabela 3 - Diluições a partir da solução estoque de quercetina (0,5 mg/mL) para elaboração da curva padrão.

Tubos	Volume S.E. (µL)	Etanol (µL)	Ácido acético (µL)	Sol. Piridina (mL)	Sol. AlCl <sub>3</sub> (mL)	Água (mL)	Concentração (µg/mL)
1	10	400	120	2	0,5	1,97	1
2	20	400	120	2	0,5	1,96	2
3	40	400	120	2	0,5	1,94	4
4	60	400	120	2	0,5	1,92	6
5	80	400	120	2	0,5	1,90	8
6	100	400	120	2	0,5	1,88	10
Branco	-	400	120	2	0,5	1,98	-

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018.

Para determinação dos teores nas amostras, foi preparada solução-estoque em etanol do extrato etanólico, frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica, todas a 5 mg/mL. A partir de alíquotas de 200 µL destas soluções que foram transferidas para tubos de ensaio, procedeu-se a reação e leitura da mesma forma descrita para o padrão.

#### 4.5 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Os extratos e frações butanólica e em acetato de etila da casca e madeira foram analisados previamente por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando como fase

estacionária sistemas de eluentes diversos de acordo com a classe de metabólitos de interesse (WAGNER; BLADT, 2001). Extratos, frações e padrão foram preparados utilizando 1 mg da amostra, que foram posteriormente dissolvidas em 1 mL de piridina. A fase móvel foi constituída de tolueno, acetato de etila e ácido fórmico, nas concentrações de 5:5:1. Os cromatogramas foram visualizados sob luz UV 365 nm. Para a identificação dos constituintes presentes nos extratos e frações foi utilizado o padrão ácido elágico adquirido na Sigma Aldrich®.

#### 4.6 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos EECSM e EEMSM foi realizada na Central analítica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). O cromatógrafo líquido, modelo Waters® equipado com detector de arranjo de diodos (Waters® 2998), bomba binária (Waters® 1525), injetor automático (Waters® 2707) foi utilizado nesta análise. Para realização do procedimento, foram empregadas água ultrapurificada e metanol grau HPLC (marca Dinâmica). A taxa de fluxo foi mantida constante a 1,0 mL/min e o volume de injeção foi de 30µL. As amostras e os padrões de referência foram filtrados antes da injeção com membrana marca PALL GHP de 0,45 µm. Coluna analítica de fase reversa C<sub>18</sub> (Sun Fire 4,6 x 250 mm, 5 µm) com gradiente de eluição de fase binária composta de água (acidificada até pH 3 com ácido acético 0,1%) e metanol (MeOH) 20 a 100% foi mantida por 60 minutos. Em seguida, em sistema isocrático com MeOH 100 % permaneceu por mais 10 minutos. O fluxo utilizado foi 1 mL/min, o volume de injeção foi 30 µL e a temperatura da coluna mantida a 40 °C.

Em relação ao preparo das amostras (triplicata) para serem injetadas em CLAE, os extratos (2 mg) foram solubilizados em solução de MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1) na concentração de 2 mg/mL e homogeneizado em ultrassom (Marca Sanders Medical, modelo Soniclean 2) aquecido a 35 °C por 15 minutos. Em seguida, foram centrifugados em microcentrífuga (marca Kasvi) por 5 minutos a 10.000 rotações por minuto (rpm) e filtrados em membrana de poro 0,45 µm. Os padrões quercetina, rutina e ácido clorogênico foram preparados da mesma forma, porém na concentração de 1 mg/mL.

O *Software* Empower 3 foi utilizado para obtenção do cromatograma numa varredura de 190 a 400 nm, tempo de retenção e espectros na região do ultravioleta. A partir desses parâmetros, foi possível analisar o perfil químico das amostras.

#### 4.6.1. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com ácido elágico

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das amostras EECSM, EEMSM, FBCSM, FACSM, FBMSM e FAMSM foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). O cromatógrafo líquido utilizado foi do modelo Agilent Technologies 1200 series, injetor automático. Para realização do processo de CLAE, foram utilizados água ultrapurificada e metanol grau HPLC (marca Dinâmica). A taxa de fluxo para todas as amostras e padrões foram mantidas constantes a 0,6 mL/min e o volume de injeção foi de 30 µL. Antes da injeção, as amostras e o padrão de referência foram purificados em membrana filtrante (marca PALL GHP de 0,45 µm).

Padrão, extratos e frações foram analisados utilizando-se coluna analítica de fase reversa C<sub>18</sub> (Zorbax SB 4,6 x 150 mm, 5 µm), em equipamento cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector DAD em 254 nm. A eluição consistiu de uma fase composta de metanol 50% em água ultrapurificada (sem acidificação), mantendo este sistema isocrático por 10 minutos. O fluxo utilizado foi 0,6 mL/min, o volume de injeção foi 30 µL e a coluna mantida a temperatura ambiente. A análise de dados foi feita a partir do *Software Chemstation*.

Em relação ao preparo das amostras (triplicata) para serem injetadas em CLAE, os extratos (1 mg) foram solubilizados em solução de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) na concentração de 1 mg/mL e colocados em ultrassom (Marca Sanders Medical, modelo Soniclean 2) e filtrados em unidade filtrante de poro 0,45 µm. O padrão ácido elágico foi preparado da mesma forma.

#### 4.7 PREPARO DO GEL DOS EXTRATOS DO CAULE DE *Spondias mombin* L.

Os extratos etanólicos (EECSM e EEMSM) foram usados no preparo dos géis. O gel foi preparado conforme procedimento descrito no formulário médico farmacêutico (2011): foram dissolvidos 0,2g de metilparabeno (NIPAGIN) em água aquecida a 70°C. Adicionou-se 2,2g de hidroxietilcelulose aos poucos sob agitação lenta e constante, até completa dissolução. Em seguida, a preparação foi resfriada a 40°C, intercalando a agitação com períodos de repouso. Adicionou-se imidazolidinil uréia, previamente solubilizado em pequena quantidade de água. Para a determinação das atividades anti-inflamatória e cicatrizante, foi incorporado

ao gel os extratos nas concentrações conforme Tabela 4, utilizando como umectante o propilenoglicol.

Tabela 4 – Formulações em gel dos extratos de *Spondias mombin*.

<b>Formulação Básica</b>	<b>Formulações GEECSM</b>	<b>Formulações GEEMSM</b>
Nipagin ----- 0,2%	Gel de natrosol 2% + EECSM 1%	Gel de natrosol 2% + EEMSM 1%
Hidroxietilcelulose ---2,2%	Gel de natrosol 2% + EECSM 3%	Gel de natrosol 2% + EEMSM 3%
Imidazolidinil ureia - 0,1%	Gel de natrosol 2% + EECSM 5%	Gel de natrosol 2% + EEMSM 5%
H <sub>2</sub> O destilada qsp - 100 mL		

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018.

#### 4.8 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (150-250 g), machos, com 60-70 dias de idade, e camundongos (25-30 g), machos, com 45-50 dias de idade, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração comercial tipo Nuvilab<sup>®</sup> e água *ad libitum* a temperatura ( $22 \pm 4$  °C). Os animais foram acondicionados em gaiola de polipropileno, de dimensão 340 mm de largura x 490 mm de comprimento x 160 mm de altura, com tampa gradeada em aço inox e comedouro embutido em “V”, contendo aproximadamente 3 cm de cama de maravalha previamente autoclavada. A maravalha foi trocada a cada 2 dias. Em cada gaiola, foram acondicionados seis animais no máximo. Os protocolos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo n° 001/2017).

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA

O edema de orelha induzido por óleo de Croton em camundongos como descrito por Schiantarelli et al. (1982) com pequenas modificações. O edema de orelha foi induzido em grupos com oito camundongos cada (n = 8) usando 20 µL de óleo de Croton 2,5% (v/v, diluído em acetona) na superfície interna da orelha direita. Foi determinada uma linha de base na orelha esquerda aplicando 20 µL de acetona (veículo). Após 60 minutos, o tratamento foi

realizado na orelha direita com extratos (EECSM e EEMSM – 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha), géis (GEECSM e GEEMSM - 1, 3 e 5,0%) e dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo), enquanto o controle negativo (não tratado) recebeu 20 µL de solução salina. A espessura da orelha (mm) foi medida após 6 e 24 horas para acompanhar a evolução do edema, enquanto que o peso (massa em mg) foi quantificado após eutanásia com fragmentos de orelha (discos de 6mm). Uma parte destas amostras (fragmentos) foi conservada em formaldeído 10% (v/v) para análise histopatológica e outra parte foi utilizada para determinar os marcadores inflamatórios (mieloperoxidase e N-acetil-β-D-glucosaminidase).

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE

Para cada ensaio, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos (n = 6): um grupo controle (não tratado) dois controles negativos (solução fisiológica e gel), dois controles positivos (dexametasona e Dersani<sup>®</sup>) e três experimentais tratados com cada amostra (1,0;3,0 e 5,0%). Após distribuição, os animais foram anestesiados com cetamina 10% (75 mg/kg) e xilazina 2% (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Em seguida, o pelo da área dorsocostal próxima ao pescoço de cada animal foi removido e, com auxílio de um *punch* (Richter<sup>®</sup>) contendo lâmina cortante na borda inferior, foram produzidas incisões para retirada de fragmentos cutâneos com diâmetro de 6 mm com exposição da fáscia muscular dorsal, (PACHALY 2006). Após remoção da pele, os animais foram tratados com analgésico opioide (morfina, 2,5mg/kg, via subcutânea, a cada 4 horas por 5 dias) para evitar sofrimento doloroso.

No segundo dia de indução das incisões, as lesões foram tratadas com quantidade suficiente para cobrir a área lesionada (200 mg para formulações semissólidas e 200 µL para formulações líquidas), sendo que os grupos referentes ao controle negativo receberam gel e solução fisiológica (0,9%). O grupo controle positivo foi tratado com dexametasona 1mg/g e outro grupo controle positivo com Dersani<sup>®</sup> (Loção cicatrizante à base de ácidos graxos essenciais, com vitaminas A e E). Nos grupos experimentais, foram aplicadas as amostras (1,0; 3,0 e 5,0%) (OKAMOTO, 2010).

Os animais foram examinados diariamente quanto ao aspecto geral, para avaliação macroscópica da lesão, observando-se a presença ou ausência de hemorragia, exsudato e crosta. Ao final do tratamento (14 dias), os animais foram eutanasiados com aprofundamento da anestesia (cetamina 140 mg/kg e xilazina 15 mg/kg) por via intraperitoneal. As lesões

foram avaliadas com o uso de lupa, para verificação de crostas, secreções, cicatriz hipertrófica e verificação da ferida tecidual.

Para a análise morfométrica, as lesões foram medidas e fotografadas nos dias zero, 4, 8, 12 e 14, utilizando-se de uma câmera digital e as imagens foram digitalizadas em computador. A área foi calculada pela fórmula ( $A = \pi \times R \times r/2$ ), onde R representa o eixo crânio-caudal e o r corresponde ao eixo látero-lateral da lesão (RIELLA et al., 2012). O grau de contração da área (GC) da lesão foi calculado por meio da fórmula demonstrada por Oliveira et al. (2000/2001):

$$GC = \frac{(\text{Área } T^0 - \text{Área } T^{\text{dia medição}}) \times 100}{\text{Área } T^0}$$

Onde:  $T^0$  = dia zero;  $T^{\text{dia}}$  = dia da medição (4, 8, 12 ou 14).

As lesões foram excisadas com 6 mm de raio de pele íntegra, em torno da lesão, em profundidade até a fáscia muscular, após 14 dias de estudo. Cada exemplar foi identificado individualmente, um de cada subgrupo foi colocado em solução de formalina 10% seguida de análise histopatológica (GARROS et al., 2006; AMORIM et al., 2006). As demais foram direcionadas para medição da atividade de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG).

#### 4.11 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Amostras dos discos de tecido das orelhas excisadas no teste anti-inflamatório e as lesões excisadas no teste cicatrizante foram obtidas e conservadas conforme descrito anteriormente. Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) em um período de 16 horas, e em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. Os materiais histológicos foram posteriormente desidratados, emblocados em parafina, seccionados em cortes de 5  $\mu$ m em um micrótomo e corados com hematoxilina e eosina. O edema (espessura do corte histológico), infiltração de leucócitos, vasodilatação e espessura da epiderme e derme foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 10x e 20x. Nesses mesmos aumentos, foram realizadas fotografias dos cortes histológicos

utilizando microscópio (Olympus BX41) acoplado a câmera fotográfica digital utilizando o *software* Imagepro-Plus 4.5 (Media Cybernetics).

#### 4.12 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Foram realizadas dosagens das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) das orelhas dos camundongos submetidos ao teste anti-inflamatório.

##### 4.12.1 Obtenção do Sobrenadante

Aos fragmentos de 6 mm das orelhas dos camundongos submetidos ao teste anti-inflamatório foram adicionados 1 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4, contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTBA). Em seguida, foram triturados por 30 segundos em gral de porcelana. Os homogenatos foram transferidos para tubos de ensaio e adicionado mais 1 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4. As amostras (2 mL) permaneceram em banho de gelo a 4 °C e sonicadas em ultrassom Ultra Cleaner 1600A (Unique<sup>®</sup>) por 10 minutos seguida de centrifugação a 3.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e utilizado na dosagem de proteínas totais e nos ensaios da atividade enzimática de MPO e NAG (DE YOUNG et al., 1989; SANCHEZ; MORENO, 1999).

##### 4.12.2 Dosagem de Proteínas Totais

O método utilizado para dosagem de proteínas foi descrito por Lowry e colaboradores (1951) e modificado por Sargent (1987). O ensaio foi realizado em triplicata, colocando-se 20  $\mu$ L do sobrenadante obtido no item 4.12.1 em cada tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 380  $\mu$ L de água destilada e 2 mL da mistura reativa, a qual foi composta por solução alcalina (1 g de NaOH mais 5 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 250 mL de água), tartarato de cobre e sulfato de cobre. Após adicionar água e mistura reativa no tubo de ensaio, esperou-se por 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados 200  $\mu$ L de solução Folin (1:5), aguardando 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS 1800 (Shimadzu<sup>®</sup>) em comprimento de onda 660 nm, zerando o branco com água destilada.

#### 4.12.3 Ensaio da Atividade da Mieloperoxidase

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido (CAMPA, 2009; PEREIRA et al., 2000). Para a avaliação da atividade da enzima foi utilizada a metodologia de Bradley e colaboradores (1982) modificada por De Young e colaboradores (1989). Triplicatas de 25  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, obtido do homogenato (item 4.10.1), foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 25  $\mu\text{L}$  de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina 1,6 mM em dimetilsulfóxido (DMSO), 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 0,003% v/v diluída em tampão fosfato de sódio 0,08 M (pH 5,4) para promover o início da reação. Posteriormente, a placa foi incubada a 37 °C por 5 minutos, adicionando 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 4 M a 4 °C em cada poço para interromper a reação. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando o leitor de placas Thermoplate TR-Reader<sup>®</sup>, cuja leitura de absorbância foi feita em 450 nm, sendo expressa em densidade óptica/mg de proteínas (dO/mg de proteínas), zerando o branco com água destilada.

#### 4.12.4 Ensaio da Atividade da N-acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidase

A atividade da enzima N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) foi utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares no tecido. Esta atividade foi avaliada utilizando a metodologia de Sanchez e Moreno (1999). Triplicatas de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, obtido do homogenato (item 4.10.1), foram colocados em placas de 96 poços, adicionando 100  $\mu\text{L}$  de *p*-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina 2,24 mM em tampão citrato/fosfato de sódio 0,1 M pH 4,5, para promover o início da reação. Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C por 10 minutos e a reação interrompida pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de tampão glicina 0,2 M pH 10,6 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando um leitor de placas Thermoplate TR-Reader<sup>®</sup>, cuja leitura da absorbância foi realizada em 405 nm, sendo expressa em densidade óptica/mg de proteínas (dO/mg de proteínas), zerando o branco com água destilada.

#### 4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram demonstrados através da média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman-Keuls foi utilizada para medir o grau de significância ( $p < 0,001$ ). Foi usado o programa estatístico Graphpad Prism versão 5.01 para avaliar os dados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 RENDIMENTO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

A partir do material seco e pulverizado, 287,88g da casca e 464,93g da madeira de *S. mombin* produziram 10,80 g do extrato etanólico bruto da casca (EECSM) e 14,36 g do extrato etanólico bruto da madeira (EEMSM), o que equivale a um rendimento de extração de 3,78% e 3,08%, respectivamente. Usando o processo de partição, 5 g de EECSM produziram 17,4, 15,47, 56,6 e 10,6% das frações hexânica (FBCSM), diclorometânica (FDCSM), em acetato de etila (FACSM) e butanólica (FBCSM) da casca, respectivamente (Tabela 5). Além disso, 5 g de EEMSM da madeira renderam 19,58, 11,40, 52,00 e 17,02% das respectivas frações hexânica (FHMSM), diclorometânica (FDMSM), em acetato de etila (FAMSM) e butanólica (FBMSM) (Tabela 5).

Tabela 5 - Rendimento das frações obtidas por partição dos extratos EECSM e EEMSM.

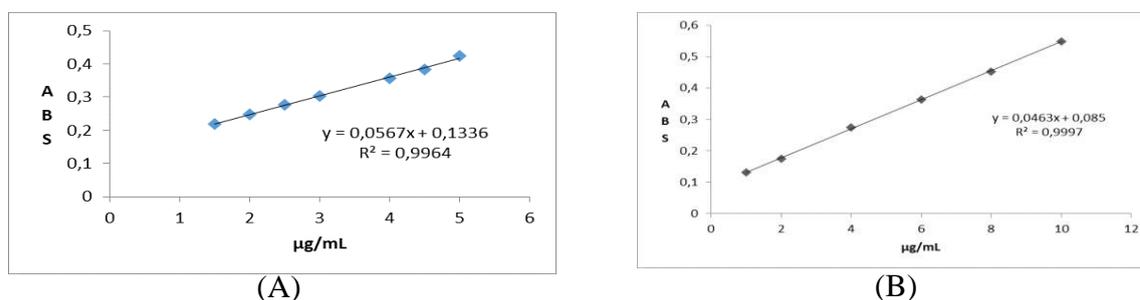
Fração	EECSM		EEMSM	
	Massa (g)	Rendimento (%)	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexânica	0,87	17,4	0,98	19,58
Diclorometânica	0,77	15,47	0,57	11,4
Em acetato de etila	2,83	56,6	2,60	52
Butanólica	0,53	10,6	0,85	17,02

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

### 5.2 TEORES DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS

Os teores de fenóis totais dos extratos e frações foram determinados a partir da equação da reta de calibração do ácido gálico (Figura 12A). Após análises de regressão linear, obteve-se a equação da reta  $y = 0,0567x + 0,1336$  com coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9964$  (Figura 12A). As absorvâncias das amostras foram substituídas no y para adquirir o valor de x que correspondeu a uma concentração inicial que foi ajustada de acordo com a diluição de cada amostra. Paralelamente, da mesma forma, foi adquirido a equação da reta ( $y = 0,0463x + 0,085$ ) da quercetina para quantificar os teores de flavonoides totais com coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9997$  (Figura 12B).

Figura 12 – Curvas de calibração para determinação de fenóis e flavonoides totais

(A) Curva padrão do ácido gálico. (B) Curva padrão da quercetina.  
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Os teores de fenóis totais, equivalentes ao ácido gálico, variaram de 11,99 a 0,27 g/100g no extrato etanólico e frações da casca de *S. mombin* (Tabela 6). As frações em acetato de etila e diclorometânica apresentaram maiores teores de fenóis totais quando comparadas com as demais amostras. A Tabela 6 também mostra que os teores de flavonoides totais, equivalentes à quercetina, variaram de 5,26 a 0,00 g/100g no extrato e nas frações. A fração em diclorometano contém o maior teor de fenóis totais ( $11,99 \pm 0,80$  g/100g) e flavonoides ( $5,26 \pm 0,06$  g/100g) em comparação com as demais amostras analisadas.

Quando analisados, os teores de fenóis totais variaram de 3,80 a 0,82g/100g no extrato etanólico e frações da madeira de *S. mombin* (Tabela 6). As frações butanólica e diclorometânica apresentaram maiores teores de fenóis totais quando comparadas as demais frações da madeira. Os teores de flavonoides totais variaram de 1,52 a 0,00g/100g no extrato e nas frações avaliadas. A fração butanólica apresentou o maior teor de flavonoides ( $2,04 \pm 0,03$  g/100g) em comparação com os demais produtos analisados (Tabela 6).

Tabela 6 - Teores de fenóis, equivalentes ao ácido gálico, e flavonoides totais, equivalentes à quercetina, nos extratos e frações de *Spondias mombin*.

Extrato/Frações	Casca (g/100 g)		Madeira (g/100 g)	
	Fenóis Totais	Flavonoides	Fenóis Totais	Flavonoides
Extrato etanólico	$7,73 \pm 0,01^A$	$0,53 \pm 0,05^A$	$2,84 \pm 0,03^A$	$0,75 \pm 0,01^A$
Fração hexânica	$0,27 \pm 0,07^B$	$0,00 \pm 0,00^{B,A}$	$0,82 \pm 0,08^B$	$0,00 \pm 0,00^{B,A}$
Fração diclorometânica	$11,99 \pm 0,80^C$	$5,26 \pm 0,06^C$	$3,80 \pm 0,15^C$	$1,52 \pm 0,02^C$
Fração em acetato de etila	$11,62 \pm 0,08^{D,C}$	$1,47 \pm 0,04^D$	$1,23 \pm 0,06^D$	$0,79 \pm 0,02^{D,A}$
Fração butanólica	$8,92 \pm 0,03^{E,A}$	$1,84 \pm 0,18^{E,D}$	$2,83 \pm 0,01^{E,A}$	$2,04 \pm 0,03^E$

Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). As médias diferem entre si, após análise de variância seguida do teste de Tukey para  $p < 0,05$ . Valores de médias com letras sobrescritas iguais indicam médias iguais.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

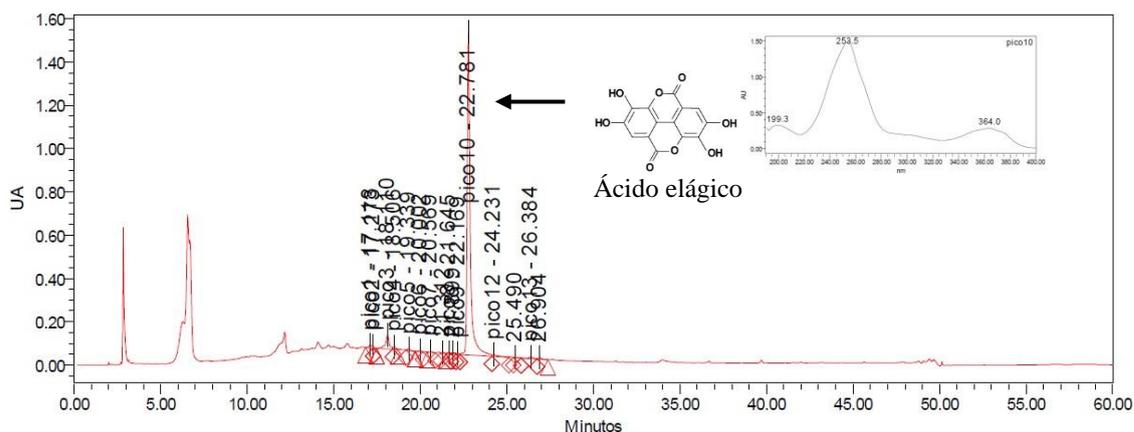
### 5.3 ANÁLISES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Análises dos extratos etanólicos EECSM e EEMSM foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência em 254 nm onde foi possível obter um cromatograma com diferentes picos que estão relacionados aos tempos de retenção e espectros de ultravioleta (Figuras 13 e 14).

Os marcadores usados, ácido clorogênico, rutina e quercetina (Figuras 15 e 16), não foram detectados nos extratos EECSM e EEMSM. No entanto, o pico 10 de EECSM (Figura 13), com tempo de retenção média de 22,79 minutos, absorção máxima nos comprimentos de onda em 199,3, 253,5 e 364,0 nm e 87,95% (EECSM) de área (Tabela 7), é indicativo do ácido elágico, uma vez que apresentou espectro de UV característico com aquele encontrado na literatura (BANSAL et al., 2014) e confirmado o padrão de ácido elágico (SIGMA Aldrich). De forma semelhante, o pico 10 de EEMSM (Figura 14) produziu tempo de retenção média igual a 22,84 minutos com absorção máximo nos comprimentos de onda de 200,5, 253,5 e 364,0 nm e área de 77,20% (Tabela 7). Esses dados também são sugestivos do ácido elágico na amostra analisada.

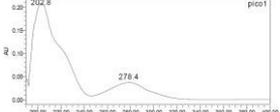
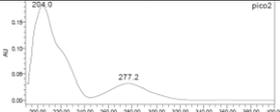
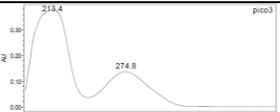
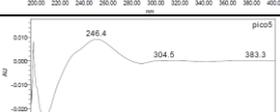
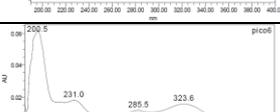
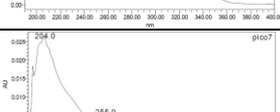
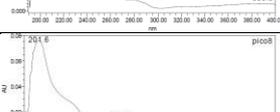
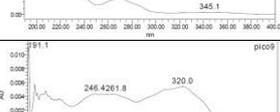
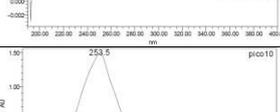
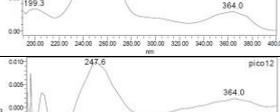
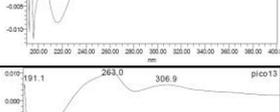
Considerando os constituintes em ambas as amostras (EECSM e EEMSM), os perfis dos espectros e tempos de retenção sugerem diferenças na composição das substâncias (Tabelas 7 e 8).

Figura 13 – Cromatograma do extrato EECSM obtido em 254 nm.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

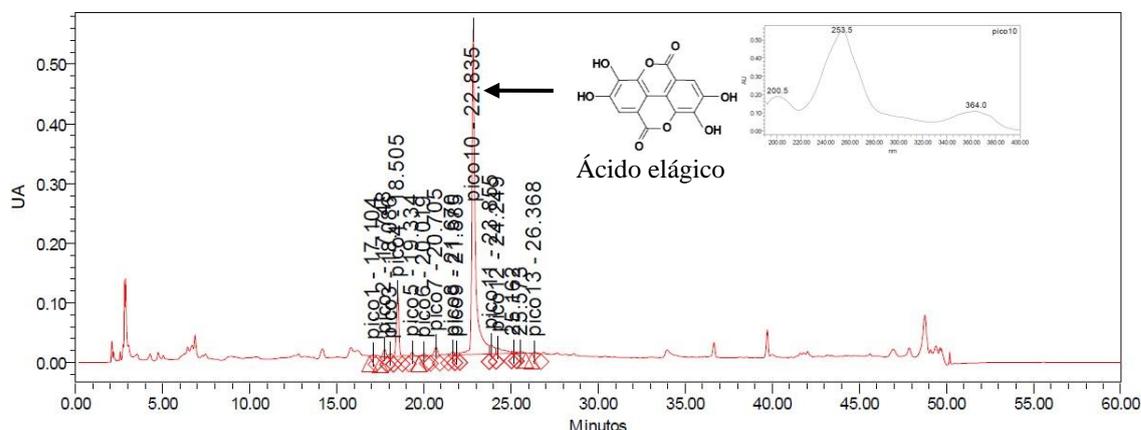
Tabela 7 – Análise dos constituintes do extrato EECSM por CLAE-UV.

Pico	TR	Espectro UV	Área (%)	$\lambda_{\text{absorção.max}}$ (nm)	Literatura
1	17,114		1,03	202,8; 278,4	Não identificado
2	17,43		0,185	204; 277,2	Não identificado
3	18,104		4,85	213,4; 274,8	Não identificado
4	18,505		0,96	205,2; 295,0; 343,9	Não identificado
5	19,34		0,58	246,4; 304,5; 383,3	Não identificado
6	20,002		0,32	200,5; 231,0; 285,5; 323,6	Não identificado
7	20,567		0,31	204; 255,9; 389,3	Não identificado
8	21,653		0,38	201,6; 270,1; 345,1	Não identificado
9	22,171		0,30	246,4; 261,8; 320,0	Não identificado
10	22,789		87,95	199,3; 253,5; 364,0	254; 367 (Bansal et al., 2014)
12	24,228		1,06	247,6; 364,0	Não identificado
13	26,374		0,71	263,0; 306,9	Não identificado

TR = Tempo de retenção.

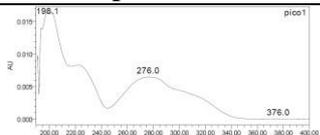
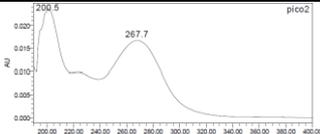
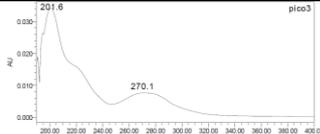
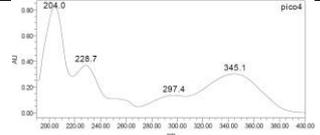
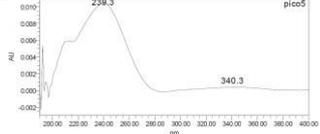
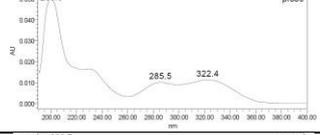
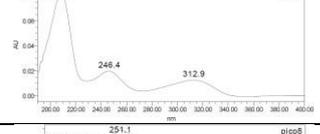
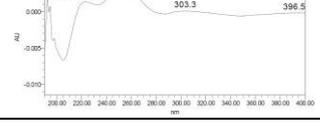
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

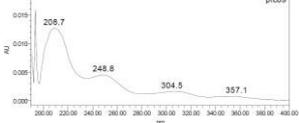
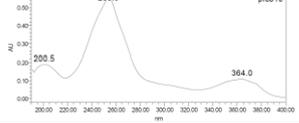
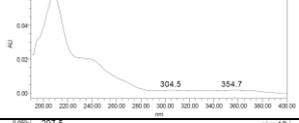
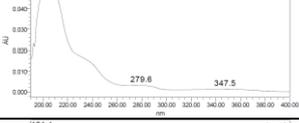
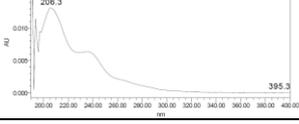
Figura 14 – Cromatograma do extrato EEMSM obtido em 254 nm.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Tabela 8 – Análise dos constituintes do extrato EEMSM por CLAE-UV-DAD.

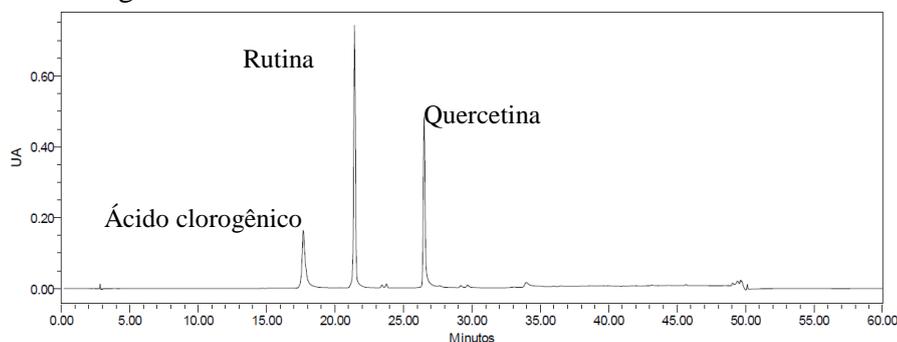
Pico	TR	Espectro UV	Área (%)	$\lambda_{\text{absorção.max}}$ (nm)	Literatura
1	17,107		0,42	198,1; 276,0; 376	Não identificado
2	17,749		1,61	200,5; 267,7	Não identificado
3	18,086		0,75	201,6; 270,1	Não identificado
4	18,506		11,47	204,0; 228,7; 297,4; 345,1	Não identificado
5	19,333		0,88	239,3; 340,3	Não identificado
6	20,018		0,54	200,5; 285,5; 322,4	Não identificado
7	20,703		2,05	208,7; 246,4; 312,9	Não identificado
8	21,669		0,52	192,2; 222,8; 251,1; 303,3; 396,5	Não identificado

9	22,307		0,52	208,7; 248,8; 304,5; 357,1	Não identificado
10	22,84		77,20	200,5; 253,5; 364,0	254; 367 (Bansal et al., 2014)
11	23,856		2,33	208,7; 304,5; 354,7	Não identificado
12	24,252		1,45	207,5; 279,6; 347,5	Não identificado
13	26,367		0,39	191,1; 206,3; 395,3	Não identificado

TR = Tempo de retenção.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Figura 15 – Cromatograma dos marcadores obtido em 254 nm.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

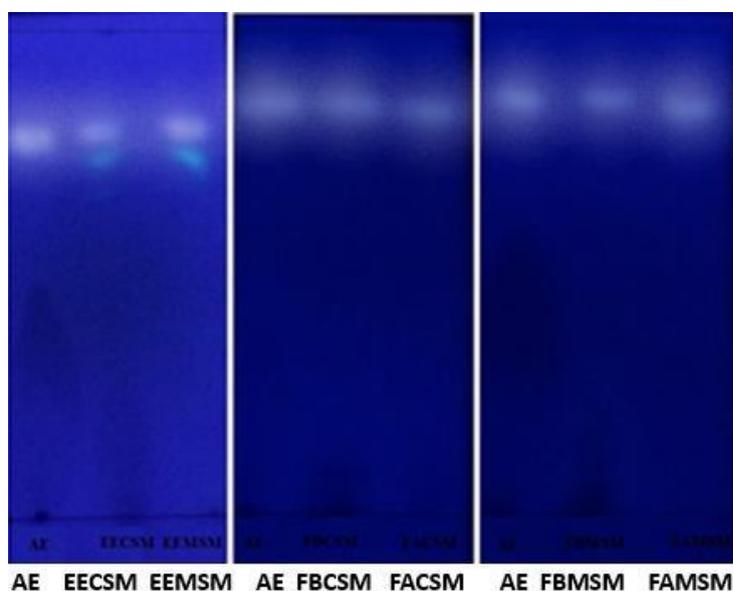
Figura 16 – Espectros de ultravioleta dos marcadores usados na identificação de substâncias nos extratos etanólicos.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

#### 5.4 ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Para comprovar a presença de ácido elágico detectado por cromatografia líquida de alta eficiência, os extratos EECSM e EEMSM e as frações FACSM, FBMSM, FAMSM e FBMSM foram analisados por CCD usando o padrão de ácido elágico (Figura 17). O perfil cromatográfico (Figura 17) mostrou que as amostras produziram bandas semelhantes ao do ácido elágico, assim como os valores de Rf 0,77;0,7;0,81;0,81;0,82;0,83 e 0,81 dos extratos EECSM e EEMSM e as frações FACSM, FBMSM, FAMSM, FBMSM e padrão, respectivamente.

Figura 17 – Identificação do ácido elágico nos extratos e frações de *Spondias mombin* por cromatografia de camada delgada.



AE = Ácido elágico; EECSM = Extrato etanólico da casca; EEMSM = Extrato etanólico da madeira; FBCSM = Fração butanólica da casca; FACSM = Fração em acetato de etila da casca; FBMSM = Fração butanólica da madeira; FAMSM = Fração em acetato de etila da madeira. Fase móvel: tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (5:5:1, v/v/v). Revelador: luz UV 365 nm.

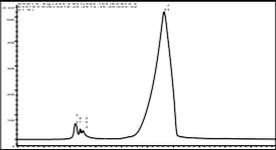
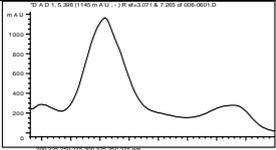
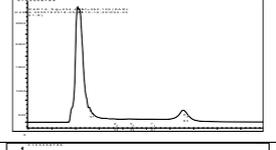
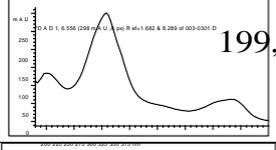
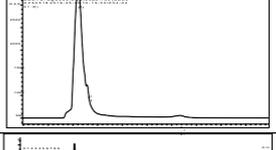
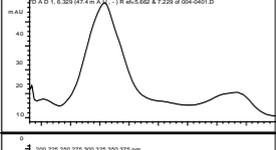
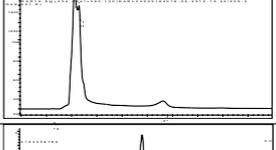
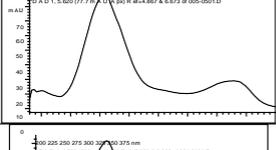
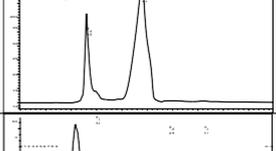
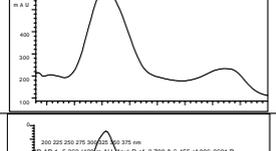
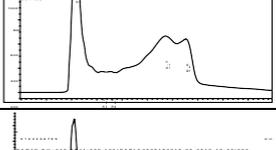
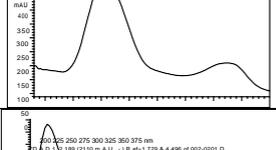
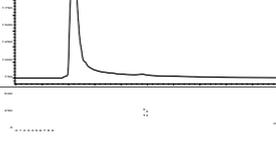
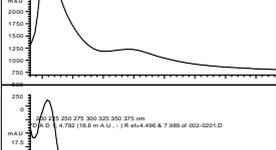
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

#### 5.5 IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para comprovar a presença de ácido elágico na casca e na madeira do caule de *S. mombin*, uma análise dos extratos EECSM e EEMSM e das frações FACSM, FBCSM,

FAMSM e FBMSM foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em 254 nm, utilizando com padrão o ácido elágico (Tabela 9). O espectro mostrou bandas características do ácido elágico, sendo possível a identificação deste nos extratos EECSM e EEMSM e nas frações FACSM, FBCSM e FAMSM (Tabela 9). Os espectros obtidos da fração FBMSM não corresponderam às características apresentadas pelo ácido elágico, indicando a ausência dessa substância.

Tabela 9 – Identificação da presença de ácido elágico nos extratos e frações do caule de *Spondias mombin* por CLAE-UV-DAD.

Extratos/Frações	TR	Cromatograma	Espectro no UV	$\lambda_{\text{absorção.max}}$ (nm)
Ácido Elágico (Padrão)	5,63			200;253,46;363,07
EECSM	6,55			199,62;253,46;362,31
FACSM	6,33			201,53;253,46;362,30
FBCSM	5,61			200;254,23;363,07
EEMSM (co-injeção)	4,79			202,69;253,84;360,00
FAMSM	5,36			190;253,84;358,46
FBMSM	2,18 9; 4,78			204,61;271,54
				203,46;228,85;252,69; 297,31;343,85

EECSM = Extrato etanólico da casca; EEMSM = Extrato etanólico da madeira; FBCSM = Fração butanólica da casca; FACSM = Fração em acetato de etila da casca; FBMSM = Fração butanólica da madeira; FAMSM = Fração em acetato de etila da madeira.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

## 5.6 EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO E GEL DA CASCA DE

### *Spondias mombin*

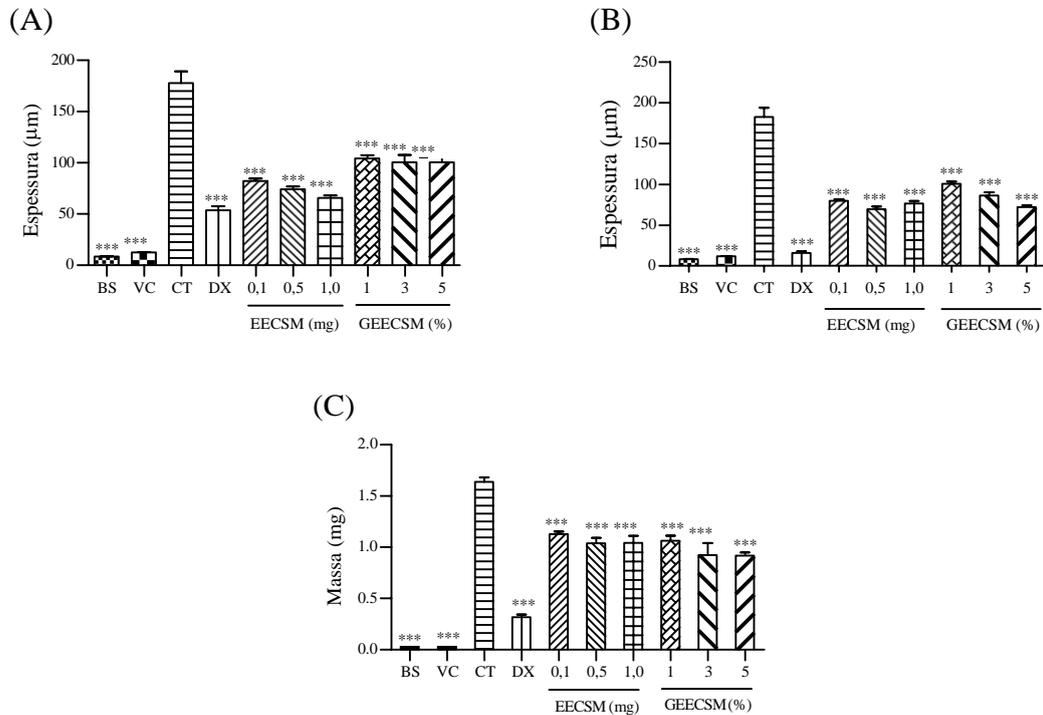
A Figura 18A mostra que, após 6 horas da indução do edema de orelha com óleo de Croton, ocorreu um aumento expressivo da espessura da orelha no grupo controle negativo. O tratamento com EECSM, nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ) a espessura do edema ( $\mu\text{m}$ ) em 53,83, 58,27 e 63,06%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. Com aplicação de 20  $\mu\text{L}$  de GEECSM a 1, 3 e 5%, a espessura do edema foi reduzida em 41,45, 43,48 e 43,42% nas respectivas concentrações. A dexametasona, usada como controle positivo, foi efetiva em 69,91% na diminuição do edema. Com intuito de acompanhar o efeito de EECSM e GEECSM sobre o processo inflamatório, a espessura do edema foi também avaliada após 24 horas da aplicação do óleo de Croton.

EECSM (0,1 mg/orelha = 56,22%, 0,5 mg/orelha = 61,18% e 1 mg/orelha = 58,01%) e GEECSM (1% = 44,79%, 3% = 52,61% e 5% = 60,67%) reduziram a formação do edema em comparação ao grupo controle negativo (Figura 18B). Neste tempo, EECSM diminuiu significativamente ( $p < 0,001$ ) a massa do edema (mg) em 21,90, 36,55 e 36,42% nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente, enquanto GEECSM reduziu em 35,02, 43,71 e 43,99% relativas as concentrações de 1, 3 e 5% (Figura 18C). Como esperado, a dexametasona reduziu a espessura (91,19%) e a massa (80,62%) do edema após 24 horas de tratamento.

O efeito do óleo de Croton sobre o edema de orelha também foi observado pela determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) que foi aumentada no grupo controle quando comparado aos grupos basal e veículo (Figura 19A). Nos grupos submetidos ao tratamento com EECSM, doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha reduziram a MPO em 85,17, 84,87 e 89,54%, respectivamente ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle. GEECSM também inibiu a MPO em 66,29, 87,20 e 76,74% nas concentrações de 1, 3 e 5%, respectivamente. Dexametasona produziu 81,90% de inibição da atividade da MPO.

O óleo de Croton aumentou significativamente a presença de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) no grupo controle negativo quando comparado aos grupos basal e veículo (Figura 19B). Após tratamento com EECSM, doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha de reduziram a atividade da NAG em 85,31, 79,86 e 79,23%, respectivamente, quando comparado com grupo controle negativo. Quando tratado com GEECSM, a atividade da NAG foi reduzida em 75,81, 76,86 e 77,95% nas concentrações de 1, 3 e 5%, respectivamente. Como esperado, a dexametasona foi efetiva em inibir a atividade da NAG.

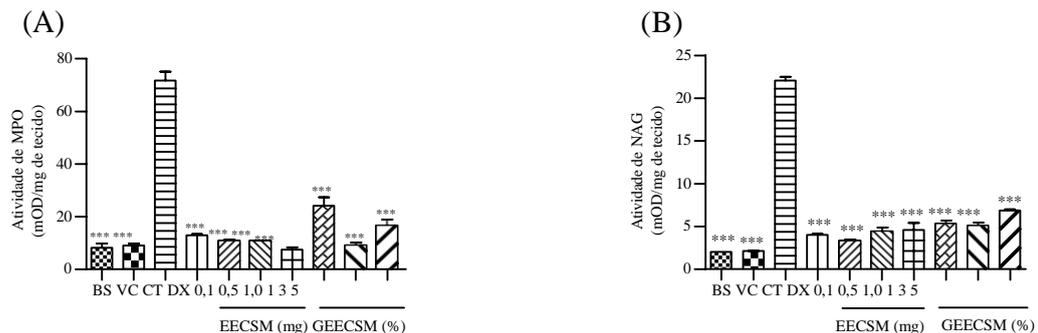
Figura 18 – Efeito anti-inflamatório do extrato e gel da casca de *Spondias mombin* sobre o edema de orelha induzido por óleo de Croton.



Os valores correspondem à média  $\pm$  E. P. M. (n = 8). \*\*\*  $p < 0,001$  diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste Student-Newman-Keuls. (A) Medidas da espessura após 6 horas de tratamento. (B) Medidas da espessura após 24 horas de tratamento. (C) Medidas da massa após 24 horas de tratamento. BS = Basal; VC: Veículo; CT: Controle negativo; DX: Dexametasona.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018.

Figura 19 - Efeito do extrato e gel da casca de *Spondias mombin* sobre as atividades de mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase.



Os valores correspondem à média  $\pm$  E. P. M. (n = 3). (A) Mieloperoxidase; (B) N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase. \*\*\*  $p < 0,001$ , diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste Student-Newman-Keuls. BS = Basal; VC = Veículo; CT = Controle; DX = Dexametasona.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018.

## 5.7 EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO E GEL DA MADEIRA DE *Spondias mombin*

Como descrito acima, o óleo de Croton induziu a formação do edema com aumento da espessura e da massa (Figura 20). Após 6 horas de tratamento, doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha de EEMSM reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ) a espessura do edema em 37,51; 39,48 e 52,23%, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 19A). O gel GEEMSM inibiu o edema de orelha em 45,02; 50,70; 47,33% após aplicação das concentrações de 1; 3 e 5%, respectivamente (Figura 20A).

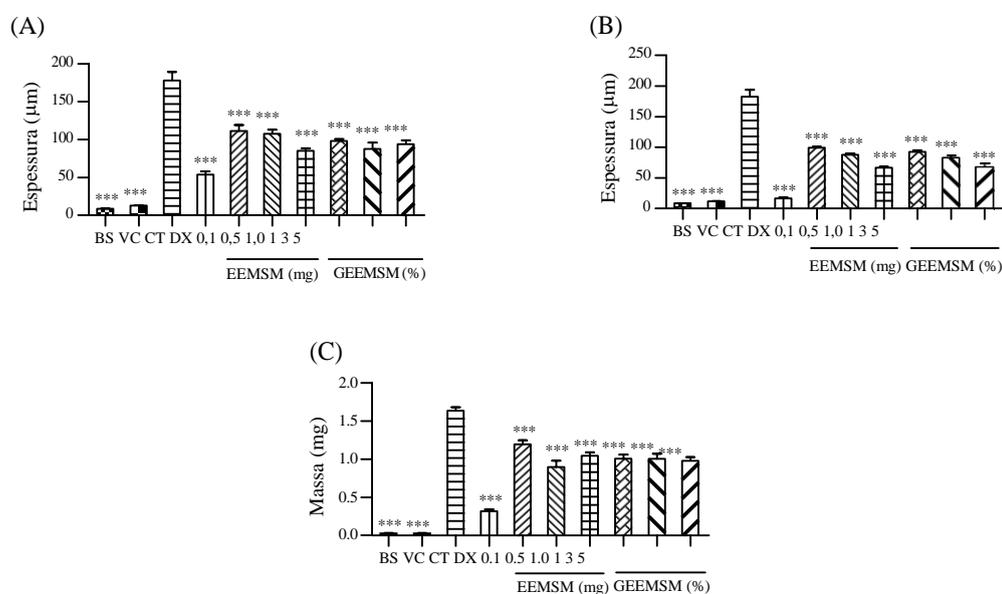
Após 24 horas de tratamento, em relação ao grupo controle, a aplicação tópica de EEMSM foi capaz de inibir significativamente ( $p < 0,001$ ) a espessura do edema em 45,58; 51,93 e 63,67% nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente, enquanto a resposta do gel GEEMSM foi de 49,38; 55,06 e 62,88% frente as concentrações de 1; 3 e 5%, respectivamente (Figura 20B). Neste tempo, houve inibição da massa (mg) do fragmento da orelha em 27,09 (0,1 mg/orelha), 45,35 (0,5 mg/orelha) e 36,24% (1,0 mg/orelha) por EEMSM, enquanto as concentrações de 1; 3 e 5% do gel GEEMSM ocasionou uma redução de 38,50; 38,74 e 40,27%, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 20C).

Após medidas de espessura e massa, fragmentos de orelha foram avaliados quanto à atividade da mieloperoxidase (MPO) (Figura 21A). A atividade de MPO foi reduzida significativamente ( $p < 0,001$ ) em 90,9; 52,15 e 51,62% após tratamento com EEMSM nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente, quando comparada ao grupo controle. Além disso, as concentrações de 1; 3 e 5% de GEEMSM inibiram a atividade de MPO em 89,73, 78,15 e 80,43%, respectivamente.

A resposta da atividade da enzima N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) também foi examinada nos fragmentos de orelhas após tratamento com EEMSM e GEEMSM que aumentou expressivamente no grupo controle (Figura 21B). Doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha de EEMSM foi capaz de inibir a atividade de NAG em 48,84; 45,99 e 47,39%, respectivamente, em relação ao grupo controle negativo. O tratamento com GEEMSM 1, 3 e 5% produziu uma resposta inibitória da atividade de NAG de 80,78; 72,69 e 88,79% nas respectivas concentrações.

Como descrito no item anterior, dexametasona, controle positivo dos experimentos, foi efetiva em inibir a atividade os parâmetros inflamatórios de espessura, massa, mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase.

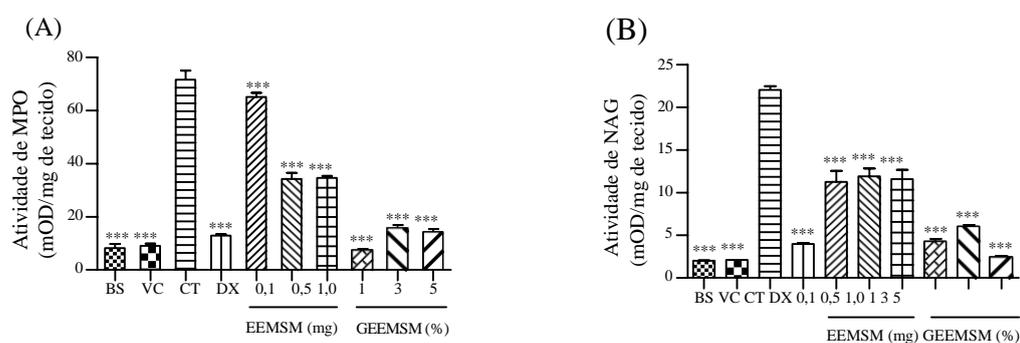
Figura 20 – Efeito anti-inflamatório do extrato e gel da madeira de *Spondias mombin* sobre o edema de orelha induzido por óleo de Croton.



Os valores correspondem à média  $\pm$  E. P. M. (n = 8). \*\*\*  $p < 0,001$  diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste Student-Newman-Keuls. (A) Medidas da espessura após 6 horas de tratamento. (B) Medidas da espessura após 24 horas de tratamento. (C) Medidas da massa após 24 horas de tratamento. BS = Basal; VC: Veículo; CT: Controle negativo; DX: Dexametasona.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018.

Figura 21 - Efeito do extrato e gel da madeira de *Spondias mombin* sobre as atividades da mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase.



Os valores correspondem à média  $\pm$  E. P. M. (n = 3). (A) Mieloperoxidase; (B) N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase. \*\*\*  $p < 0,001$ , diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste Student-Newman-Keuls. BS = Basal; VC = Veículo; CT = Controle; DX = Dexametasona.

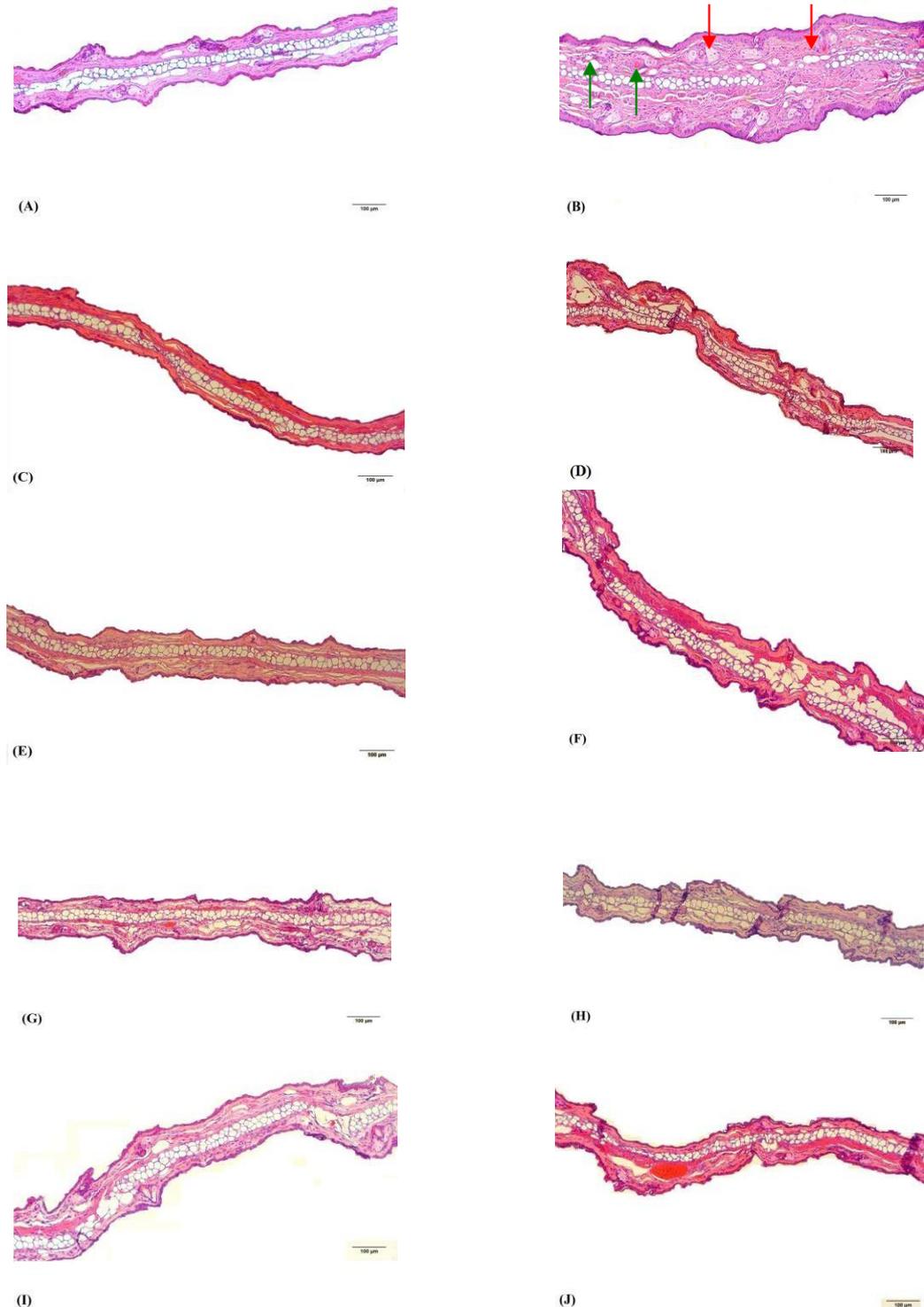
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018.

## 5.8 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO CUTÂNEO INDUZIDO POR ÓLEO DE CROTON

Para corroborar com os resultados de espessura e massa do edema, assim como atividades de mieloperoxidase e *N*-acetil- $\beta$ -*D*-glucosaminidase, fragmentos de orelha obtidos do modelo do óleo de Croton foram analisados histopatologicamente e cortes representativos são apresentados nas Figuras 22 e 23 após tratamento com EECSM, GEECSM, EEMSM e GEEMSM. O grupo basal (sem indução de edema) mostra ausência de edema e de processo inflamatório (Figuras 22A e 23A), enquanto que o grupo controle negativo (com indução do edema, sem tratamento) apresentou um aumento acentuado da espessura da orelha, caracterizando edema típico de processo inflamatório, presença expressiva de polimorfonucleares e vasodilatação (Figuras 22B e 23B). O tratamento com os extratos EECSM (0,1 0,5 e 1,0 mg/orelha, Figuras 22D, 22E e 22F, respectivamente) e EEMSM (0,1 0,5 e 1,0 mg/orelha, Figuras 23D, 23E e 23F, respectivamente) reduziram a espessura do edema, os polimorfonucleares e a vasodilatação induzidos pelo óleo de Croton.

A aplicação dos géis GEECSM (1, 3 e 5%; Figuras 22H, 22I e 22J, respectivamente) e GEEMSM (1, 3 e 5%; Figuras 23H, 23I e 23J, respectivamente) foram também ativos contra a formação do edema, inibindo a migração de polimorfonucleares e vasodilatação. A dexametasona 0,1 mg/orelha, controle positivo, foi bem efetiva em reduzir os parâmetros inflamatórios (Figuras 22C e 23C).

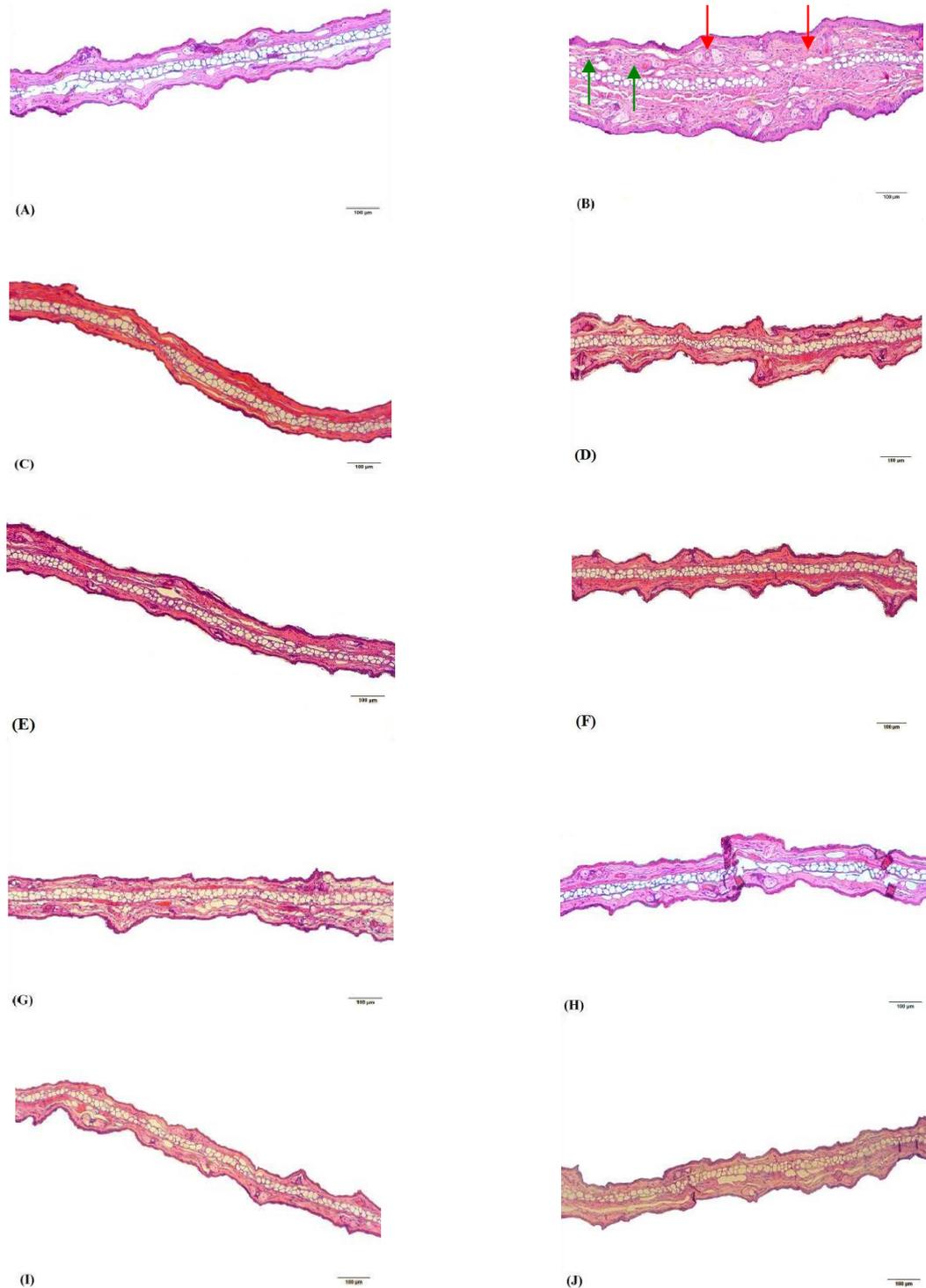
Figura 22 - Cortes histológicos representativos de fragmentos de orelhas com edema induzido por óleo de Croton após tratamento com EECSM e GEECSM.



Cortes histológicos de orelha de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (10x, escala de 100µm). (A) Basal (sem inflamação); (B) Controle negativo; (C) Dexametasona; (D) EECSM 0,1 mg/orelha; (E) EECSM 0,5 mg/orelha; (F) EECSM 1.0 mg/orelha; (G) Gel; (H) GEECSM 1%; (I) GEECSM 3% (J) GEECSM 5%. Seta verde para cima = Polimorfonucleares; Seta vermelha para baixo = Vasodilatação.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Figura 23 - Cortes histológicos de orelhas com edema induzido por óleo de Croton após tratamento com EEMSM e GEEMSM.



Cortes histológicos de orelha de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (10x, escala de 100µm). (A) Basal (sem inflamação); (B) Controle negativo; (C) Dexametasona; (D) EEMSM 0,1 mg/orelha; (E) EEMSM 0,5 mg/orelha; (F) EEMSM 1.0 mg/orelha; (G) Gel; (H) GEEMSM 1%; (I) GEEMSM 3%; (J) GEEMSM 5%.

Seta verde para cima = Polimorfonucleares; Seta vermelha para baixo = Vasodilatação.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

## 5.9 EFEITO CICATRIZANTE DOS EXTRATOS E GÉIS DE *Spondias mombin* SOBRE LESÕES INDUZIDAS EM RATOS

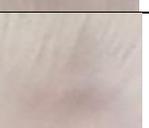
### 5.9.1 Análise Macroscópica das Lesões

A análise macroscópica das feridas tratadas com EECSM e GEECSM de *S. mombin* durante quatorze dias mostrou discreto edema em todas as feridas até o terceiro dia do pós-operatório, correspondendo às fases iniciais da resposta inflamatória. No entanto, não foi observado exsudato purulento nas feridas cutâneas induzidas na pele. A formação das crostas iniciou a partir do 3º dia, sendo que nos grupos tratados com EECSM e GEECSM e Dersani<sup>®</sup> apresentaram-se mais delgadas e umedecidas em relação ao grupo controle (não tratado), que demonstraram espessas e ressecadas. No 5º dia, iniciou-se, espontaneamente, o desprendimento das crostas, mostrando sinais de re-epitelização.

Macroscopicamente, no 8º e 12º dias, o processo de cicatrização ficou destacado nos grupos do extrato e gel, demonstrando um efeito cicatrizante melhor do que grupo controle (Tabela 10). EECSM e GEECSM apresentaram uma completa cicatrização das feridas no tratamento de 14 dias, incluindo a presença de pelos ao redor da lesão (Tabela 10). Embora seja um anti-inflamatório tópico, a dexametasona não produziu o efeito cicatrizante completo durante o tratamento.

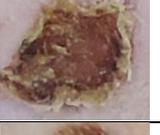
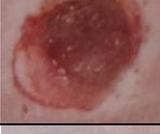
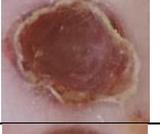
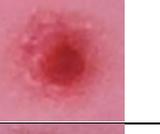
Embora menos intenso, o tratamento com o extrato e gel da madeira EEMSM e GEEMSM apresentaram características semelhantes ao demonstrado pelo EECSM e GEECSM no que se refere exsudação serosa, formação de crostas, desprendimento das crostas, re-epitelização e cicatrização (Tabela 11). No entanto, é importante destacar que entre o 4º e 12º dia, o processo de cicatrização nos grupos tratados com EEMSM e GEEMSM foi mais lento (Tabela 9), mas houve uma completa cicatrização no 14º dia.

Tabela 10 - Efeito dos extratos e géis da casca de *Spondias mombin* sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar durante 14 dias de tratamento.

Grupo	Dia 0	Dia 4	Dia 8	Dia 12	Dia 14
Controle					
Veículo (Salina)					
Dersani <sup>®</sup>					
Dexametasona					
EECSM 1%					
EECSM 3%					
EECSM 5%					
Veículo (Gel)					
GEECSM 1%					
GEECSM 3%					
GEECSM 5%					

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Tabela 11 - Efeito dos extratos e géis da madeira de *Spondias mombin* sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar durante 14 dias de tratamento.

Grupo	Dia 0	Dia 4	Dia 8	Dia 12	Dia 14
Controle					
Veículo (Salina)					
Dersani <sup>®</sup>					
Dexametasona					
EEMSM 1%					
EEMSM 3%					
EEMSM 5%					
Veículo (Gel)					
GEEMSM 1%					
GEEMSM 3%					
GEEMSM 5%					

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

### 5.9.2 Efeito dos Extratos e dos Géis de *Spondias mombin* sobre a Área e o Grau de Contração das Lesões

Para uma melhor análise do tamanho das lesões induzidas em ratos submetidos ao modelo de cicatrização cutânea, foi realizada a medição das lesões nos dias 4, 8, 12 e 14 do estudo. O tratamento por 8 dias, ocorreu uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) na área das lesões tratadas com EECSM e EEMSM 1 (66,42 e 34,97%), 3 (74,33 e 56,05%) e 5% (67,89 e 63,90%), respectivamente, quando comparado ao grupo controle (não tratado), enquanto GEECSM diminuiu a área das feridas em 56,12, 71,01 e 37,30% e GEEMSM reduziu em 67,55, 17,42 e 64,56% nesta mesma ordem de concentração (Tabela 12). No 12º dia de tratamento, mesmo com tendência de fechamento completo das lesões, GEECSM 1 e 3% reduziu a área em 53,84 e 90,10% em relação ao grupo não tratado ( $p < 0,05$ ) (Tabela 12). Um completo fechamento das feridas ocorreu no 14º dia de tratamento com EECSM, GEECSM e EEMSM e GEEMSM, produzindo área igual a zero, o que indicou fechamento das feridas.

Nas concentrações de 1, 3 e 5%, EECSM (91,06±1,50, 93,16±1,52 e 91,45±1,61%, respectivamente), GEECSM (83,32±1,01, 92,28±0,76 e 83,31±0,54%, respectivamente), EEMSM (82,70±1,17, 88,32±0,32 e 90,39±0,63%, respectivamente) e GEEMSM (91,36±1,00, 78,04±0,51 e 90,57±0,54%, respectivamente) aumentaram significativamente ( $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$ ) o grau de contração das lesões no 8º dia de tratamento em comparação ao grupo controle não tratado (73,40±1,72%) (Tabela 13). No 14º dia de tratamento o grau de contração foi de 100% para os grupos tratados com EECSM, GEECSM, EEMSM e GEEMSM (Tabela 13).

O dersoni, controle positivo, foi efetivo em reduzir a área e aumentar o grau de contração durante o tratamento, enquanto a dexametasona não foi totalmente eficiente nesses parâmetros de cicatrização, demonstrando não ser um cicatrizante adequado no tratamento de feridas.

Tabela 12 - Efeito dos extratos e géis de *Spondias mombin* sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar durante 14 dias de tratamento.

Grupo	Concentração	Área (mm <sup>2</sup> )			
		Dia 4	Dia 8	Dia 12	Dia 14
Não tratado	-	25,93±0,57	15,04±0,97	1,82±0,68	0,80±0,55
CN (salina)	0,9%	20,84±0,70 <sup>***</sup>	6,68±0,19 <sup>***</sup>	1,27±0,81	0
CN (Gel)	-	35,65±0,97 <sup>***</sup>	9,13±0,54 <sup>***</sup>	2,96±0,24	0
CP (Dersani)	-	17,20±0,43 <sup>***</sup>	8,34±0,85 <sup>***</sup>	0,45±0,45	0
Dexametasona	1 mg/g	46,66±0,87 <sup>§</sup>	19,45±0,68 <sup>§</sup>	7,09±0,42 <sup>§</sup>	4,32±0,66 <sup>§</sup>
EECSM	1%	29,80±0,72 <sup>***</sup>	5,05±0,84 <sup>***</sup>	0,93±0,58	0
	3%	24,11±0,54	3,86±0,86 <sup>***</sup>	1,28±0,52	0
	5%	23,64±0,59 <sup>*</sup>	4,83±0,91 <sup>***</sup>	1,70±0,39	0
GEECSM	1%	31,85±0,51 <sup>***</sup>	6,60±0,57 <sup>***</sup>	0,84±0,14 <sup>*</sup>	0
	3%	24,70±0,43	4,36±0,43 <sup>***</sup>	0,18±0,18 <sup>*</sup>	0
	5%	24,47±0,37	9,43±0,30 <sup>***</sup>	0,91±0,44	0
EEMSM	1%	28,36±0,58 <sup>***</sup>	9,78±0,66 <sup>***</sup>	0,86±0,55	0
	3%	19,10±0,41 <sup>***</sup>	6,61±0,22 <sup>***</sup>	0,26±0,16	0
	5%	20,64±0,53 <sup>***</sup>	5,43±0,35 <sup>***</sup>	0,17±0,17	0
GEEMSM	1%	35,88±4,46	4,88±0,56 <sup>***</sup>	1,97±0,18	0
	3%	43,92±3,17 <sup>**</sup>	12,42±0,29 <sup>**</sup>	3,20±0,10	0
	5%	38,85±1,30 <sup>*</sup>	5,33±0,30 <sup>***</sup>	1,54±0,24	0

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n = 6). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  diferente do grupo não tratado, §  $p < 0,001$  diferente do grupo não tratado com área ou grau de contração maior, após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN: controle negativo; CP: controle positivo; EECSM: Extrato etanólico da casca; GEECSM: Gel do extrato etanólico da casca.

EEMSM: Extrato etanólico da madeira; GEEMSM: Gel do extrato etanólico da madeira.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Tabela 13 - Efeito dos extratos e géis de *Spondias mombin* sobre o grau de contração das lesões induzidas em ratos Wistar durante 14 dias de tratamento.

Grupo	Concentração	Grau de contração (%)			
		Dia 4	Dia 8	Dia 12	Dia 14
Não tratado	-	54,15±1,02	73,40±1,72	96,78±1,22	98,58±0,98
CN (salina)	0,9%	63,14±1,24 <sup>***</sup>	88,17±0,33 <sup>***</sup>	97,74±1,44	100±0
CN (Gel)	-	36,96±0,97 <sup>***</sup>	83,85±0,96 <sup>***</sup>	94,75±0,42	100±0
CP (Dersani)	-	69,58±0,76 <sup>***</sup>	85,24±1,50 <sup>***</sup>	99,19±0,80	100±0
Dexametasona	1 mg/g	17,49±1,54 <sup>§</sup>	65,60±1,20 <sup>§</sup>	87,45±0,74 <sup>§</sup>	92,96±0,94 <sup>§</sup>
	1%	47,30±1,28 <sup>***</sup>	91,06±1,50 <sup>***</sup>	98,34±1,03	100±0
EECSM	3%	57,37±0,95	93,16±1,52 <sup>***</sup>	97,73±0,92	100±0
	5%	58,20±1,04 <sup>*</sup>	91,45±1,61 <sup>***</sup>	96,98±0,69	100±0
	1%	43,67±0,90 <sup>***</sup>	83,32±1,01 <sup>***</sup>	99,74±0,25 <sup>***</sup>	100±0
GEECSM	3%	56,32±0,77	92,28±0,76 <sup>***</sup>	99,68±0,31 <sup>*</sup>	100±0
	5%	56,73±0,66	83,31±0,54 <sup>***</sup>	98,38±0,79	100±0
	1%	49,85±1,03 <sup>***</sup>	82,70±1,17 <sup>***</sup>	98,48±0,97	100±0
EEMSM	3%	66,26±0,75 <sup>***</sup>	88,32±0,32 <sup>***</sup>	99,61±0,24	100±0
	5%	63,50±0,94 <sup>***</sup>	90,39±0,63 <sup>***</sup>	99,68±0,31	100±0
	1%	28,91±1,05 <sup>***</sup>	91,36±1,00 <sup>***</sup>	96,50±0,31	100±0
GEEMSM	3%	20,67±0,88 <sup>***</sup>	78,04±0,51 <sup>**</sup>	94,33±0,17	100±0
	5%	31,52±0,49 <sup>***</sup>	90,57±0,54 <sup>***</sup>	97,27±0,43	100±0

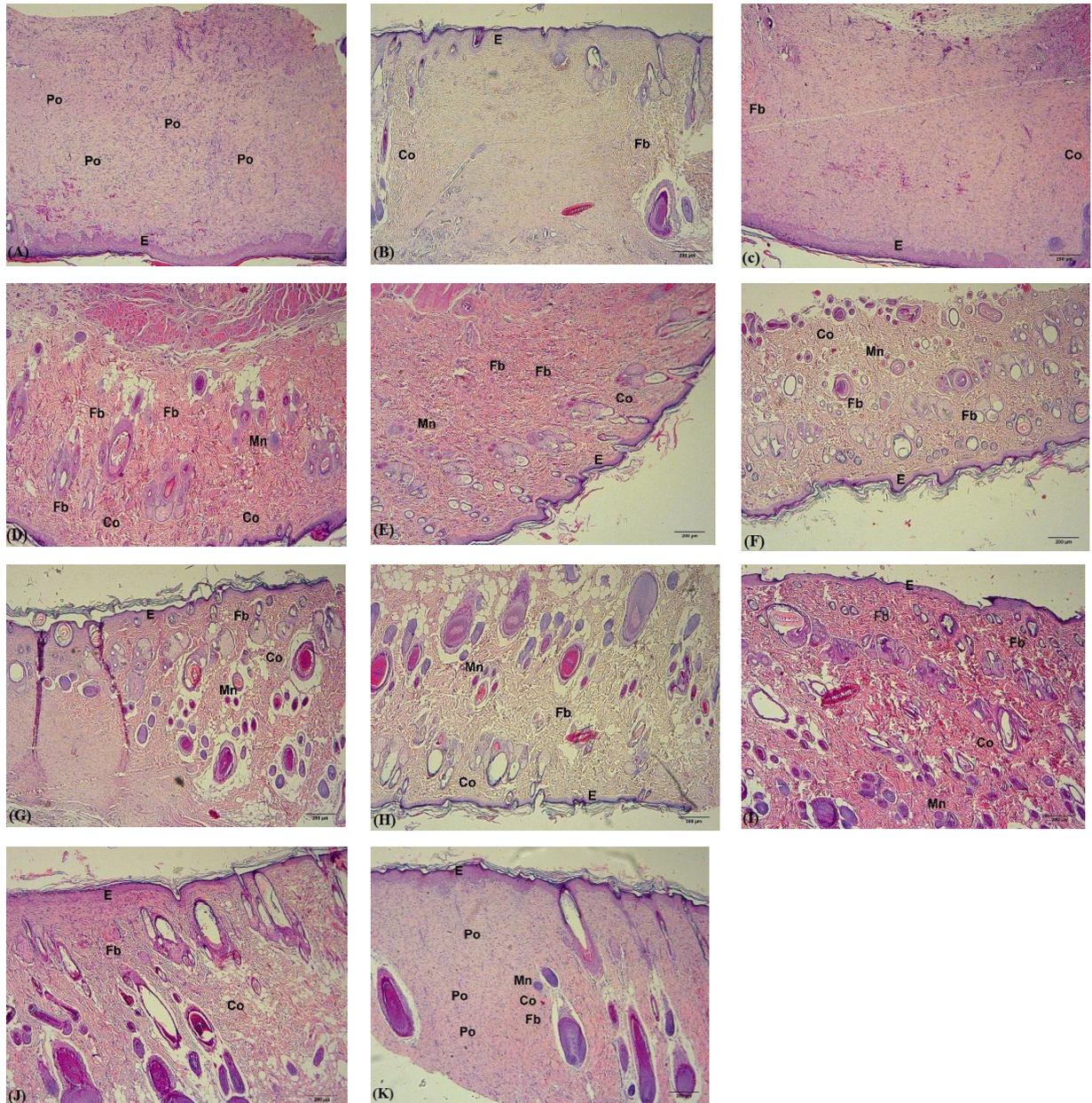
Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n = 6). \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  diferente do grupo não tratado, §  $p < 0,001$  diferente do grupo não tratado com área ou grau de contração maior, após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN: controle negativo; CP: controle positivo; EECSM: Extrato etanólico da casca; GEECSM: Gel do extrato etanólico da casca. EEMSM: Extrato etanólico da madeira; GEEMSM: Gel do extrato etanólico da madeira.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

### **5.9.3 Perfil Histopatológico de Tecidos Cicatrizados após Tratamento com Extratos e Géis de *Spondias mombin***

Com intuito de corroborar os dados do efeito dos extratos e géis sobre as lesões induzidas em ratos Wistar, o perfil histopatológico do tecido cicatrizado foi avaliado. O grupo controle (sem tratamento) e os grupos veículos (salina e gel) apresentaram epiderme (E) mais espessa hiperplásica, maior intensidade de polimorfonucleares (Po), colágeno (Co) em pouca densidade e baixa presença de fibroblasto (Figuras 24A, 24B, 24C, 25A, 25B e 25C) quando comparado aos demais grupos (Figuras 24 e 25). O tratamento com Dersani<sup>®</sup> (controle positivo) reduziu a espessura da epiderme, o processo inflamatório (pouca presença de mono e polimorfonucleares) e produziu uma maior proliferação de colágeno e fibroblastos, mostrando um melhor processo de cicatrização (Figuras 24D e 25D). Ao contrário, a dexametasona foi menos eficiente na redução dos parâmetros da cicatrização, pois apresentou uma epiderme mais espessa, menor quantidade de colágeno com presença de fibroblastos e células inflamatórias (Figuras 24E e 25E). Após 14 dias de tratamento com EECSM, GEECSM, EEMSM e GEEMSM, verificou-se uma redução da epiderme e do processo inflamatório (Figuras 24F a 24K e 25F a 25K). Neste período, EECSM, GEECSM, EEMSM e GEEMSM induziu um maior aumento da proliferação de colágeno e fibroblastos, mostrando uma completa cicatrização. Além disso, foram também observados outros tecidos e anexos, tais como tecido adiposo, folículos pilosos e tecidos glandulares (glândulas sebácea e sudorípara), mas que não estão relacionados diretamente com as etapas do processo de cicatrização.

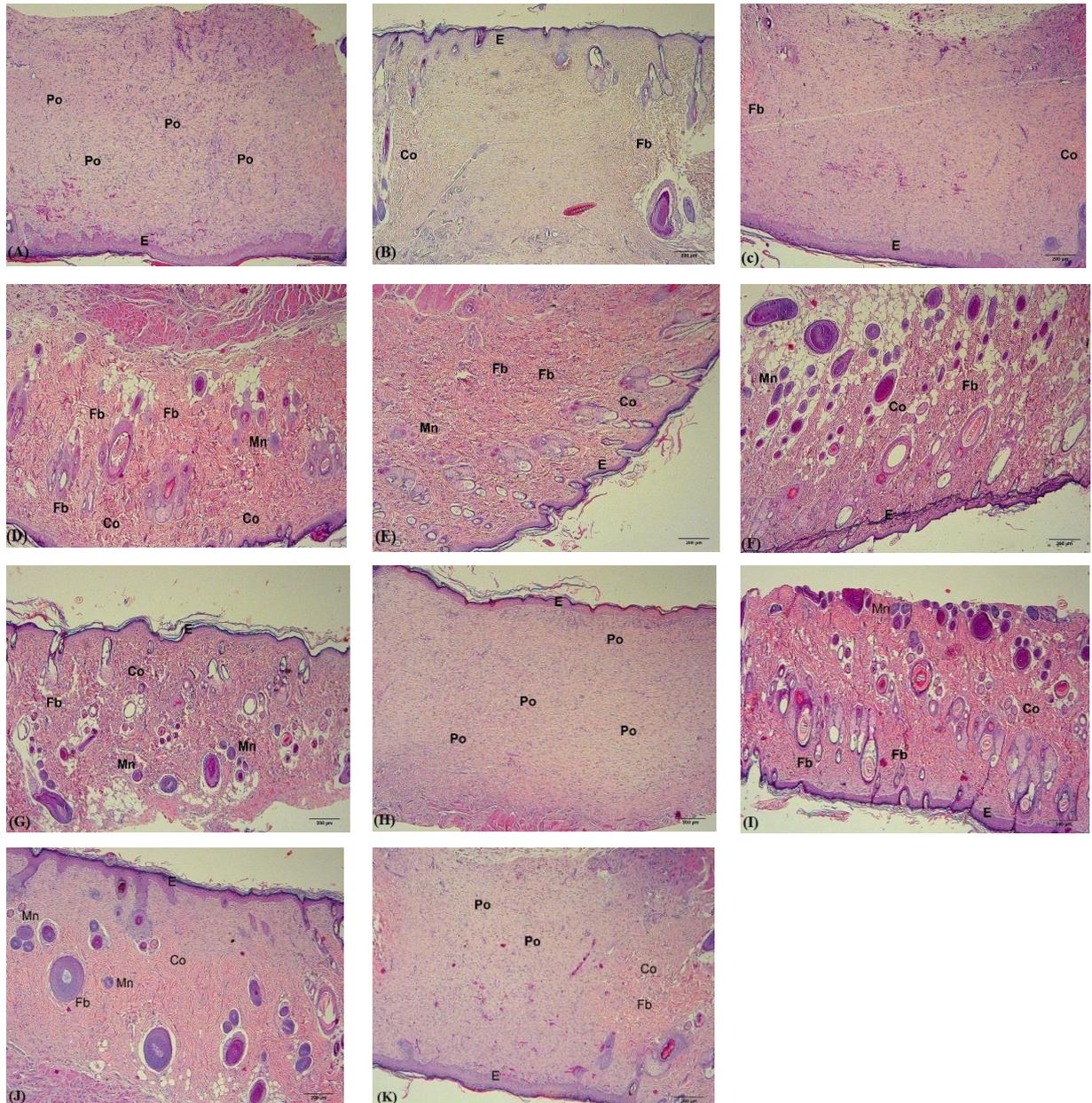
Figura 24 - Fotomicrografias representativas do tecido cicatrizado de ratos Wistar após 14 dias de tratamento com EECSM e GEECSM.



Cortes histológicos de feridas de ratos corados com hematoxilina-eosina. (A) Controle negativo (sem tratamento); (B) Veículo (Salina); (C) Veículo (Gel); (D) Controle positivo (Dersani<sup>®</sup>); (E) Dexametasona 1mg/g; (F) EECSM 1%; (G) EECSM 3%; (H) EECSM 5%; (I) GEECSM 1%; (J) GEECSM 3%; (K) GEECSM 5%. E = Epiderme; Mn = Mononucleares; Co = Colágeno; Fb = Fibroblasto; Po = Polimorfonucleares.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Figura 25 - Fotomicrografias representativas do tecido cicatrizado de ratos Wistar após 14 dias de tratamento com EEMSM e GEEMSM.



Cortes histológicos de feridas de ratos corados com hematoxilina-eosina. (A) Controle negativo (sem tratamento); (B) Veículo (Salina); (C) Veículo (Gel); (D) Controle positivo (Dersani<sup>®</sup>); (E) Dexametasona 1mg/g; (F) EEMSM 1%; (G) EEMSM 3%; (H) EEMSM 5%; (I) GEEMSM 1%; (J) GEEMSM 3%; (K) GEEMSM 5%. E = Epiderme; Mn = Mononucleares; Co = Colágeno; Fb = Fibroblasto; Po = Polimorfonucleares.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

## 6 DISCUSSÃO

A espécie *S. mombin* é bem conhecida por seu fruto comestível, o cajá, que é cultivado em quase todo o Brasil desde o descobrimento (MATTIETTO, LOPES, MENEZES, 2010). Tradicionalmente, esta planta é utilizada para o tratamento de várias doenças, por suas cascas, ramos e folhas apresentarem propriedades medicinais (SILVA, 2015). Por exemplo, as raízes têm sido empregadas para problemas de estômago e a casca do caule é usada popularmente como abortiva, com efeito emético, como antídoto para toxina de serpentes e para o tratamento de feridas (SILVA, 2015; VILLEGAS et al., 1997). O chá das folhas e flores é utilizado em processos inflamatórios e problemas estomacais, assim como é usado no tratamento de feridas e infecções e apresenta potente propriedade cicatrizante (OLUGBUYIRO et al., 2013). O suco e o pó das folhas secas são empregados como cataplasmas em feridas e locais inflamados, enquanto o pó da casca é aplicado diretamente da ferida (NWORU et al., 2011). A decocção da casca adstringente tem sido utilizada como um emético no tratamento de diarreias, disenteria, hemorroidas e gonorreia (AYOKA et al., 2008). Além disso, as folhas e a casca do caule do cajá cajazeira são utilizadas em desordens infecciosas, principalmente diarreias e disenterias (SILVA et al., 2014).

Do ponto de vista de constituintes químicos, taninos, saponinas, antraquinonas glicosiladas, alcaloides (CORTHOUT et al., 1991; ABO et al., 1999; NJOKU; AKUMEFULA, 2007; SILVA et al., 2011), triterpenos (FRED-JAIYESIMI et al., 2009), flavonoides (NJOKU; AKUMEFULA, 2007; SILVA et al., 2012) e glicosídeos (AYOKA et al., 2006) foram detectados nas folhas de *S. mombin*. Teores de saponinas (7,60%), alcaloides (6,00%), taninos (3,82%), flavonoides (3,00%) e compostos fenólicos (1,00%) foram quantificados nas folhas (NJOKU; AKUMEFULA, 2007). Além dessas substâncias, a casca do caule também contém quinonas e terpenos (DIBY et al., 2012). Elagitaninos (CORTHOUT et al., 1991), geranina e galoilgeranina, e presença de éster butírico do ácido clorogênico e do ácido 2-*O*-cafeoil-(+)-alohidroxícítrico (CORTHOUT et al., 1992), assim como de ácidos do tipo 6-*alquil*-salicílico foram identificados nas folhas e caules de *S. mombin* (CORTHOUT et al., 1994). Além disso, quercetina, ácido elágico, canferol, isoquercetina e rutina foram encontrados nas folhas da cajazeira (CABRAL, 2014; SILVA et al., 2012).

O vasto uso medicinal e o largo perfil químico citados para *S. mombin* demonstram que é uma espécie promissora para a investigação de seus constituintes e de suas propriedades farmacológicas. No entanto, para pesquisar e identificar a composição química de plantas medicinais, uma das ferramentas é o uso de solventes de polaridades crescentes que permite

uma melhor separação das classes dos metabólitos secundários (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Os solventes mais polares, como metanol, acetato de etila e butanol, são mais eficientes na extração de constituintes fenólicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Partindo deste princípio, nossos resultados revelaram que o solvente diclorometano foi capaz de extrair um maior teor de fenóis da casca e da madeira do caule de *S. mombin*, embora a soma dos rendimentos das extrações com acetato de etila e butanol tenha sido superior (Tabela 6). O diclorometano também extraiu maior teor de flavonoides da casca, entretanto, a eficiência do butanol foi mais elevada na madeira.

Considerando ainda o processo de extração, embora sejam partes diferentes do vegetal, os teores de fenóis (Tabela 6) encontrados na casca (7,73%) e na madeira (2,84%) foram maiores do que o valor descrito para folhas (1%) (NJOKU; AKUMEFULA, 2007). Ao contrário, os teores de flavonoides dos extratos etanólicos da casca e madeira de *S. mombin* foram inferiores aquele citado para as folhas (NJOKU; AKUMEFULA, 2007). Diante desses achados, pode-se perceber que a presença de constituintes fenólicos corrobora o perfil químico descrito para *S. mombin* (CORTHOOUT et al., 1991; ABO et al., 1999; NJOKU; AKUMEFULA, 2007; SILVA et al., 2011). Entre os metabólitos especiais quantificados, os fenóis, e especialmente os flavonoides, já foram descritos para esta espécie (CABRAL, 2014; SILVA et al., 2012). Assim, a variação do teor total de fenólicos e flavonoides nas frações foi influenciada pela polaridade do solvente, uma vez que o hexano facilita a extração de terpenos e esteroides, enquanto lignanas, flavonoides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, cumarinas e triterpenos são separadas pelo diclorometano (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). O uso de acetato de etila ocasiona a extração de flavonoides livres, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e compostos fenólicos e o butanol permite a remoção de flavonoides glicosilados, taninos, saponinas e carboidratos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Portanto, a variação nos teores de constituintes está associada com o solvente empregado e a classe de metabólito extraído.

O ácido elágico foi a substância identificada nos extratos da casca e madeira de *S. mombin* (Figuras 13 e 14 e Tabelas 7 a 9). Este constituinte é conhecido como um composto de lactona fenólica natural, produzido pela degradação de taninos hidrolisáveis nos vegetais (KHODADADI; NASRI, 2017). O ácido elágico e seus complexos derivados como os elagitaninos desempenham um papel importante na nutrição humana e dotados de inúmeras propriedades biológicas, incluindo propriedades antibacterianas, antioxidantes, anti-hepatotóxicas, anti-ateroscleróticas, anti-inflamatórias e atividades de replicação anti-HIV. Os interesses sobre o ácido elágico aumentaram devido às suas ações antimutagênicas e

anticancerígenas (KHODADADI; NASRI, 2017; LANDETE, 2011). Por ter sido o componente majoritário (Figuras 13 e 14) qualitativamente encontrado nos extratos etanólicos de *S. mombin*, é possível que as atividades anti-inflamatória e cicatrizante citadas em nossos resultados sejam decorrentes da ação do ácido elágico.

Os resultados indicam que os extratos e géis da casca e madeira de *S. mombin* apresentaram efeito anti-inflamatório tópico quando avaliado pelo modelo do edema de orelha em camundongos após indução com óleo de Croton (Figuras 18 a 23). Apesar de não haver estudos sobre a investigação dessa atividade na casca e madeira, existem indício que a casca do caule possui propriedade anti-inflamatória, sendo usada no tratamento de hemorroidas e como cicatrizante (AYOKA et al., 2008; NWORU et al., 2011). Além disso, o potencial anti-inflamatório das folhas de *S. mombin* foi confirmado em modelos de inflamação *in vivo*, assim como *in vitro* (CABRAL et al., 2016; NWORU et al., 2011). O extrato metanólico das folhas de *S. mombin* (100, 200 e 400 mg/kg), por exemplo, causou uma inibição significativa do edema de pata induzido por carragenina em ratos, reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  (sistêmicos) induzidos por LPS em camundongos e diminuiu a produção de TNF- $\alpha$  induzido por LPS e NO por BM-MØ em testes *in vitro* (NWORU et al., 2011). Cabral et al. (2016) mostraram que o ácido elágico (2,5, 5 e 10 mg/kg) inibiu a migração leucocitária para o sítio da inflamação, revelando ser um dos responsáveis pela ação anti-inflamatória das folhas de *S. mombin*, o que fundamenta os achados descritos no presente trabalho.

Conforme os resultados apresentados, a capacidade dos extratos e géis de *S. mombin* em reduzir o efeito do óleo de Croton demonstra o seu potencial inibitório sobre o estresse oxidativo que previne a geração de espécies reativas de oxigênio e permite a supressão da inflamação da pele e a proliferação do tecido epidérmico (CALIXTO et al., 2004; RAHMAN et al., 2008). Além da resposta inflamatória com estresse oxidativo, a aplicação do óleo de Croton sobre a pele, cujo componente majoritário é o 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoiforbol (TPA), promove uma resposta de vasodilatação, infiltração de leucócitos e edema e proliferação e ativação de oncogenes nucleares (GARG et al., 2008; SARAIVA et al., 2010). Como componente do óleo de Croton, o TPA ativa a proteína quinase C (PKC) que estimula a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinase) e fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) levando uma maior expressão gênica da ciclooxigenases (COX) e translocação/ativação da lipoxigenase (LOX). Dessa forma, ocorre a síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios associados à formação de edema, hiperproliferação celular e migração de leucócitos para derme (MURAKAWA et al., 2006; DE BERNARDIS et al., 1994). Em consequência, a ativação da via da MAP quinase induz a expressão de alguns fatores de

transcrição nuclear, como o NF- $\kappa$ B e a AP-1, os quais estão associados com a regulação da produção de diversas proteínas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS e metaloprotease) e moléculas de adesão (PASCUAL; GLASS, 2006; GLASS; OGAWA, 2006; GARCIA-PIÑERES et al., 2001; SANCHEZ; MORENO, 1999). Por sua vez, a PKC fosforila a PLA<sub>2</sub> que remove ácido araquidônico (AA) dos fosfolipídios de membrana para produção de prostaglandinas e leucotrienos pela ação das enzimas COX e LOX, respectivamente (YOUNG et al., 1984). É possível que o ácido elágico e outros componentes dos extratos EECSM e EEMSM de *S. mombin* sejam capazes de inibir uma dessas vias do processo inflamatório como já descritos por Nworu et al. (2011) e Cabral et al. (2016).

Os resultados no modelo de edema de orelha induzido por óleo de Croton demonstraram que os extratos e géis foram capazes de inibir o edema após 6 e 24 horas do experimento (Figuras 18 e 20), promovendo uma resposta parecida com a dexametasona (controle positivo). Essa ação antiedematogênica está relacionada à redução da permeabilidade vascular, pois as análises histopatológicas (Figuras 22 e 23) revelaram uma redução na vasodilatação e migração leucocitária (CHRISTY et al., 2013; GEERING et al., 2013). Além disso, a redução da atividade das enzimas MPO e NAG (Figuras 19 e 21) também corroborou estes resultados, uma vez que MPO é frequentemente associada à presença de polimorfonucleares (BRADLEY et al., 1982), enquanto a NAG é indicativa de mononucleares no sítio da inflamação, principalmente em processos inflamatórios crônicos (SANCHEZ, MORENO, 1999).

O efeito cicatrizante dos extratos etanólicos (EECSM e EEMSM) e géis (GEECSM e GEEMSM) da casca e madeira de *S. mombin* foram avaliados frente ao modelo de lesões induzidas na região dorsal de ratos (PACHALY, 2006). Esse modelo é prático, baixo custo, reprodutivo e confiável, enquanto a linhagem de rato Wistar foi usada pela facilidade de manuseio, acomodação e resistência à agressão cirúrgica e baixa mortalidade frente a infecções (MARTINS et al., 2006). Foram também escolhidos ratos machos e adultos a fim de evitar a interferência que, normalmente, ocorrem nas fêmeas devido às variações hormonais do ciclo estral, o que proporcionaria alterações no processo de reparação tecidual (GOLDENBERG; BELIVACQUA, 1981).

Fundamentando-se nas etapas de cicatrização de tecidos lesionados, o crescimento de micro-organismos e a resposta inflamatória iniciam o processo após ruptura do tecido epitelial e conjuntivo (MECKLENBURG et al., 2013). As características da inflamação como aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular com extravasamento do plasma, ativação de

plaquetas e a migração de leucócitos são seguidas da formação de fibrina e coágulo com crosta, recobrando a ferida e dando início ao processo de cicatrização (MECKLENBURG et al., 2013). Inicialmente os neutrófilos, macrófagos e fibroblastos migram para a região lesionada. Estas células são produtoras de substâncias quimiotáticas, como os eicosanoides (leucotrienos, TX e PGs) e as quimiocinas (IL-1 e TNF- $\alpha$ ), que possuem um papel importante no processo inflamatório (HATANAKA; CURI, 2007).

Tomando-se como base o exposto, os resultados apresentados na investigação podem sinalizar níveis baixos de infecção com formação de crostas mais delgadas e umedecidas em relação ao grupo controle (não tratado), bem como um desprendimento destas (iniciando-se no 5º dia), evidenciando sinais de re-epitelização; e uma maior rapidez na redução do processo inflamatório nos grupos tratados com EECSM, EEMSM, GEECSM e GEEMSM. Portanto, a ausência de um processo infeccioso drástico e a diminuição da inflamação, proporcionaram uma reparação mais rápida com o aparecimento de uma crosta que separou o tecido lesionado do meio ambiente. Macroscopicamente, o desprendimento da crosta ficou evidente no 8º dia. Considerando esses aspectos, a literatura etnofarmacológica de *S. mombin* relata que o pó da casca é aplicado diretamente da ferida como cicatrizante (NWORU et al., 2011), enquanto a decocção da casca adstringente e a casca do caule tem sido utilizada no tratamento de infecções (AYOKA et al., 2008; SILVA et al., 2014). Dessa forma, os resultados apresentados podem justificar o uso da casca na medicina tradicional.

Entre as substâncias encontradas em *S. mombin*, os taninos têm sido detectados e quantificados (teor = 3,82%) (NJOKU; AKUMEFULA, 2007). Esses constituintes são compostos fenólicos presentes na maioria das plantas, são muito reativas quimicamente e formam pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares. São facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções (MONTEIRO et al., 2005). São classificados em taninos hidrolisáveis (galitaninos e elagitaninos) e condensados, sendo os primeiros polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico e detectados em elevadas concentrações principalmente em madeiras, cascas de árvores, folhas e galhos (MUELLER-HARVEY, 2001). Considerando a espécie *S. mombin*, Cabral et al. (2016) detectaram e quantificaram estes compostos fenólicos como o ácido elágico nos extratos hidroalcolico das folhas, assim como Silva et al. (2012) no extrato hidrometanólico.

As aplicações de drogas com taninos estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes, uma vez que o complexo tanino-proteína funciona como uma camada protetora (crosta), que possibilita o processo de cicatrização naturalmente e que a área

lesionada contraia mais rapidamente (BRUNETON, 1991). A formação de crostas é um dos mecanismos envolvidos no processo de cicatrização, caracterizando-se pela deposição de tecido de granulação sobre a área lesionada para ser substituída por tecido conjuntivo denso, promovendo uma maior proliferação de fibroblastos e conseqüentemente a síntese de colágeno (MECKLENBURG et al., 2013). Nesta etapa, também ocorre a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos promovendo a contração da lesão (BROUGHTON et al., 2006). Com base no exposto, os resultados mostraram que as crostas das lesões induzidas nos animais foram desenvolvidas mais rapidamente nos grupos tratados com EECSM, EEMSM, GEECSM e GEEMSM, bem como o grupo tratado com dersenil, quando comparados com o grupo controle e dexametasona. Provavelmente o EECSM, EEMSM, GEECSM e GEEMSM induzam a formação e maturação do tecido de granulação, levando a uma maior organização das fibras no tecido e a contração da lesão, culminando com o fechamento mais rápido devido à presença de taninos, como o ácido elágico.

O uso da dexametasona durante o processo de cicatrização diminui a resistência da cicatriz, a densidade de colágeno tipo III no início e mais tarde do colágeno tipo I, além de reduzir o número de células inflamatórias (TENIUS et al., 2007), interferindo no processo de cicatrização. Neste sentido, as lesões dos animais tratados com dexametasona apresentaram um tempo de formação de crosta mais lento, crostas mais finas, sendo a contração da borda para o centro retardada, quando comparada aos demais grupos, incluindo o grupo controle (sem tratamento).

Um dos parâmetros avaliados no processo de cicatrização foi a área das lesões no decorrer do tempo. Com base nos resultados, quando comparados ao grupo não tratado, as lesões tratadas com EECSM, EEMSM, GEECSM e GEEMSM em 8, 12 e 14 dias, foram reduzidas significativamente em relação a área e ao grau de contração, demonstrando efeito cicatrizante promissor dos extratos e dos géis de *S. mombin*. No 14º dia pode-se observar o grau de contração das formulações (extrato e gel) maior que no 8º dia, entretanto, a diferença do 14º dia entre os grupos tratados com as formulações e o grupo não tratado foi reduzida, em função do processo natural da cicatrização. Outro importante achado observado foi a presença de crostas mais delgadas e úmidas nos grupos tratados com os extratos e os géis, o que corrobora com o efeito direto destas sobre a redução das lesões.

Os veículos (salina e gel) também reduziram a área das lesões e aumentaram o grau de contração, o que pode ser explicado pela ação protetora do gel e as “lavagens” da ferida pela salina, impedindo a colonização por micro-organismos.

Considerando a análise histopatológica, após 14 dias, foram observadas menor quantidade de polimorfonucleares e maior intensidade de fibroblastos e fibras colágenas nos grupos tratados com EECSM (concentrações 1, 3 e 5%) e com EEMSM (concentrações 1 e 3%), GEECSM (concentrações 1 e 3%) e GEEMSM (concentrações 1 e 3%), bem como uma redução da epiderme nestes grupos, contribuindo para o processo de reparação tecidual.

## 7 CONCLUSÕES

Considerando os resultados apresentado nesta dissertação, foi possível obter as seguintes conclusões:

Os extratos etanólicos e as frações da casca e madeira do caule de *Spondias mombin* L. apresentaram teores significativos de fenólicos e flavonoides, os quais variaram de acordo com a polaridade do solvente;

O ácido elágico foi a substância identificada nos extratos etanólicos e nas frações polares da casca e da madeira do caule de *Spondias mombin* L. e pode estar relacionado às atividades anti-inflamatória e cicatrizante.

Os extratos etanólicos e os géis da casca e madeira do caule de *Spondias mombin* L. apresentaram atividade anti-inflamatória ao reduzirem a espessura e a massa do edema de orelha induzido por óleo de Croton, bem como ao inibirem as atividades das enzimas mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase e diminuírem os parâmetros inflamatórios de vasodilatação e migração leucocitária por meio de análises histopatológicas;

Os extratos etanólicos e os géis da casca e madeira do caule de *Spondias mombin* L. apresentaram atividade cicatrizante por reduzirem a área das lesões e aumentarem o grau de contração das feridas, assim como por potencializarem os parâmetros cicatrizantes visualizados por meio de análises histopatológicas;

A casca e madeira do caule de *Spondias mombin* L. possuem constituintes fenólicos que podem estar associadas aos efeitos anti-inflamatório e cicatrizante, o que pode justificar os usos tradicionais;

Os géis produzidos a partir dos extratos da casca e madeira do caule de *Spondias mombin* L. constituem uma aplicação fitoterápica e podem representar uma alternativa para o tratamento de processos inflamatórios cutâneos e lesões de pele.

## REFERÊNCIAS

- ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 6, p. 494-497, 1999.
- ADEDIWURA, F-J.; KIO, A. Antidiabetic activity of *Spondias mombin* extract in NIDDM rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 3, p. 215-218, 2009.
- ADEDOKUN, M. O.; OLADOYE, A. O.; OLUWALANA, S. A.; MENDIE, I. I. Socio-economic importance and utilization of *Spondias mombin* in Nigeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 3, p. 232-234, 2010.
- AJAO, A.O.; SHONUKAN, O.; FEMI-ONADEKO, B. Antibacterial Effect of Aqueous and Alcohol. Extracts of *Spondias mombin*, and *Alchornea cordifolia* - Two Local Antimicrobial Remedies. **Pharmaceutical Biology**, v. 23, n. 2, p. 67-72, 1995.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS, E. M. F. N.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 325-354, 2007.
- ALMEIDA, C. L. F. **Atividade gastroprotetora de *Spondias purpúrea* L. (Anacardiaceae) em modelos animais**. 2013. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba, 2013.
- ALOBI, N. O.; BASSEY, G. A.; KALU, R. E.; ENYI-IDOH, K. H. Comparison of the phytochemical and nutritional properties of leaf, stem and root of *Spondias mombin* L. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.6, n.6, p.804-810, 2017.
- AMORIM, E.; MATIAS, J. E. F; COELHO, J. C. U.; CAMPOS, A. C. L.; STAHLKE Jr H. J.; TIMI, J. R. R.; ROCHA, L. C. A.; MOREIRA, A. T. R.; RISPOLI, D. Z; FERREIRA, L. M. Efeito do uso tópico do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu) na cicatrização de feridas cutâneas: estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p.67-76, 2006.
- AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; UKPONMWAN, O. E. Studies on the anxiolytic effect of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 2, n. 2, p. 153-165, 2005.
- AYOKA A. O.; AKOMOLAFE R. O.; IWALEWA E. O.; AKANMU M. A.; UKPONMWAN O. E. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 103, n. 2, p.166 – 175, 2006.
- AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; AKINSOMISOYE, O. S.; UKPONMWAN, O. E. Medicinal and economic value of *Spondias mombin*. **African Journal of Biomedical Research**, v. 11, n. 2, p. 129-136, 2008.

- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BANGERT, C.; BRUNNER, P. M.; STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**, v. 29, n. 4, p. 360-376, 2011.
- BANSAL, V.; SHARMA, A.; GHANSHYAM, C.; SINGLA, M. L. Coupling of chromatographic analyses with pretreatment for the determination of bioactive compounds in *Embllica officinalis* juice. **Analytical Methods**, n. 6, p. 410-418, 2014.
- BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, n. 2, p. 47-51, 2007.
- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Secretaria de Atenção a Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia em Insumos Estratégicos. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Brasília, DF, 2006.
- BRITO, S.A.; ALMEIDA, C.L.F.; SANTANA, T.I.; OLIVEIRA, A.R.S.O.; FIGUEIREDO, J.C.B. N.; SOUZA, I.T.; ALMEIDA, L.L.; SILVA, M.V.; BORGES, A.S.; MEDEIROS, J.W.; NETO, J.C.S.; GONÇALVES, R.C.R.; KITAGAWA, R.R.; SANT'ANA, A.E.G.; ROLIM, L.A.; MENEZES, I.R.A.; SILVA, T.G.; CALDAS, G.F.R.; WANDERLEY, A.G. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2018, p.20, 2018.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7, p. 12S-34S, 2006.
- BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. AS/Espanha: Ed. Acribia. 594p. 1991.
- BOULLATA, J. I.; NACE, A. M. Safety issues with herbal medicine. **Pharmacotherapy**, v. 20, n. 3, p. 257-269, 2000.
- CABRAL, B.; SIQUEIRA, E. M. S.; BITENCOURT, M. A. O.; LIMA, M. C. J. S.; LIMA, A. K.; ORTMANN, C. F.; CHAVES, V. C.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; ROCHA, H. A. O.; SCORTECCI, K. C.; REGINATTO, F. H.; GIORDANI, R. B., ZUCOLOTTO, S. M. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 304-311, 2016.
- CABRAL, B. **Caracterização dos marcadores químicos e avaliação de atividades biológicas do extrato de *Spondias mombin* (Anacardiaceae)**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande Norte, Natal, 2014.
- CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin: II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**, v. 70, n. 2, p. 93-103, 2004.

CAMPA, A. **Atividade de mieloperoxidase e formação de oxigênio singlete em monócitos, Macrófagos e células dendríticas: localização versus atividade.** 2009. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CAMPOS, A. C. L.; GROTH, A. K.; BRANCO, A. B. Assessment and nutritional aspects of wound healing. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 11, n. 3, p.281-288, 2008.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chemistry Toxicologic**, v.51, p.15- 25, 2013.

CARVALHO, A. V.; ALVES, R. M. **Caracterização física e físico-química de frutos de clones de cajazeira no Estado do Pará.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental. 25 p. 2006.

CARVALHO, P. C. L, RITZINGER, R.; SOARES FILHO, W. S.; LEDO, C. A. S. Características morfológicas, físicas e químicas de frutos de populações de umbu-cajazeira no Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 140-147, 2008.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CEVA-ANTUNES, P. M.; BIZZO, H. R.; ALVES, S. M.; ANTUNES, O. A. Analysis of volatile compounds of taperebá (*Spondias mombin* L.) and cajá (*Spondias mombin* L.) by simultaneous distillation and extraction (SDE) and solid phase microextraction (SPME). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1387-1392, 2003.

CHRISTY, A. L.; WALKER, M. E.; HESSNER, M. J.; BROWN, M. A. Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE. **Journal of Autoimmunity**, v. 42, p. 50-61, 2013.

CHUONG, C.M.; NICKOLOFF, B.J.; ELIAS, P.M.; GOLDSMITH, L.A.; MACHER, E.; MADERSON, P.A.; SUNDBERG, J.P.; TAGAMI, H.; PLONKA, P.M., THESTRUP-PEDERSON, K.; BERNARD, B.A.; SCHRODER, J.M.; DOTTO, P.; CHANG, C.M.; WILLIAMS, M.L.; FEINGOLD, K.R.; KING, L.E.; KLIGMAN, A.M.; REES, J.L.; CHRISTOPHERS, E. What is the 'true' function of skin? **Experimental Dermatology**, v. 11, n. 2, p. 159-187, 2002.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.

CORTHOUT J.; PIETERS L.; CLAEYS M.; GEERTS, S.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. J. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1129-30, 1991.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M.; VANDEN-BERGHE, D. A.; VILETINCK, A. J. Antiviral caffeoyl: esters from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 79-81, 1992.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; GEERTS, S.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. J. Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. **Planta Medica**, v. 60, n. 5, p. 460-463, 1994.

COSTA, C. R. M.; SPERANCINI, M. A. C. Atividade física e o processo de envelhecimento da pele. **Revista Mineira de Educação Física**, v. 9, n. 2, p. 73-88, 2001.

COSTA, G; FRANCISCO, V.; LOPES, M. C.; CRUZ, M. T.; BATISTA, M. T. Intracellular Signaling Pathways Modulated by Phenolic Compounds: Application for New Anti-Inflammatory Drugs Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 2876-2900, 2012.

CRUMMEY, A.; HARPER, G. P.; BOYLE, E. A.; MANGAN, F. R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, n. 1, p. 69-76, 1987.

CUCÉ, L.C.; NETO, C.F. **Manual de Dermatologia**. 1. ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 1990.

DARLENSKI, R.; KAZANDJIEVA, J.; TSANKOV, N. Skin barrier function: morphological basis and regulatory mechanisms. **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 1, p. 36-45, 2011.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V. M.; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents and Actions**, v. 42, n. 1-2, p. 29-33, 1994.

DEEPA, M.; RENUKA, D. Potential anti-inflammatory medicinal plants. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 43-49, 2014.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents & Actions**, v. 26, n. 3, p. 335-341, 1989.

DIBY, S. B; KONÉ, M; YAPO, A. Potentiel pharmacologique des écorces de tige de *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) sur la motricité in vitro du duodénum de lapin ; une plantemédicinale utilisée dans le traitement traditionnel des troubles digestifs. **Phytothérapie**, v. 10, p. 306-312, 2012.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

ECKES, B.; KRIEG, T. Regulation of connective tissue homeostasis in the skin by mechanical forces. **Clinical and Experimental of Rheumatology**, v. 22, n. 33, p. S73-S76, 2004.

FAZIO, M. J.; ZITELLI, J. A.; GOSLEN, J. B. Cicatrização de feridas. In: COLEMAN, W.P.; HANKE, C.W.; ALT, T.H.; ASKEN, S. **Cirurgia Cosmética – Princípios e Técnicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.

FRED-JAIYESIMI, A.; KIO, A.; RICHARD, W.  $\alpha$ -Amylase inhibitory effect of 3  $\beta$ -urs-12-en3-il (9z)-hexadec-9-enoato isolated from *Spondias mombin* leaf. **Food chemistry**, v. 116, n. 1, p. 285-288, 2009.

FROST-MEYER, N. J.; LOGOMARCINO, J.V. Impact of coffee components on inflammatory markers: A Review. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 819-830, 2012.

GÁBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation Protocols**. New Jersey: Humana Press, p. 129-131, 2003.

GÁBOR, M., RÁZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear o edema induced with capsaicin. **Agents and Actions**, v. 36, n. 1-2, p. 83–86, 1992.

GARG, R.; RAMCHANDANI, A. G.; MARU, G. B. Curcumin decreases 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 6, p. 1249-1257, 2008.

GARLE, M. J.; FRY, J. R. Sensory nerves, neurogenic inflammation and pain: missing components of alternative irritation strategies? A review and a potential strategy. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 31, n. 3, p. 295-316, 2003.

GARROS, I. C.; CAMPOS, A. C. L.; TÂMBARA, E. M.; TENÓRIO, S. B.; TORRES, O. J. M.; AGULHAM, M. A.; ARAÚJO, A. C. F.; SANTIS-ISOLAN, P. M. B.; OLIVEIRA, R. M.; ARRUDA, E. C. M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p.55-65, 2006.

GEERING, B.; STOECKLE, C.; CONUS, S.; SIMON, H. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 8, p. 398-409, 2013.

GLASS, C. K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews in Immunology**, v. 6, n. 1, p. 44-55, 2006.

GOLDENBERG, S.; BEVILACQUA, R.G. **Manual de Cirurgia**. 2. ed. São Paulo: EPU/Springer. p. 99-116. 1981.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C.; MIRA, L.; CORVO, M. L. Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 16, p. 1586-1605, 2008.

GOODWIN, A. W.; WHEAT, H. E. Sensory signals in neural populations underlying tactile perception and manipulation. **Annual Review Neurosciense**, v. 27, p. 53-77, 2004.

GROTE, K.; SCHÜTT, H.; SCHIEFFER, B. Toll-Like Receptors in Angiogenesis. **The Scientific World Journal**, v.19, n. 11, p. 981-991, 2011.

GUILHERMINO, J. F.; SIANI, A.C.; QUENTAL, C.; BOMTEMPO, J. Desafios e complexidade para inovação a partir da biodiversidade Brasileira. **Revista de pesquisa e inovação farmacêutica**, v.4, n.1, p.18-30,2012.

GUIRRO, E. C. O.; GUIRRO, R. **Fisioterapia Dermatofuncional: fundamentos, recursos, patologias**. 3. ed., São Paulo: Manole, 2002.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.

HARTLAPP, I.; ABE, R.; SAEED, R. W.; PENG, T.; VOELTER, W.; BUCALA, R.; METZ, C. N. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. **FASEB Journal**, v. 15, n. 12, p. 2215-2224, 2001.

HAMANO P. S.; MERCADANTE, A. Z. Composition of Carotenoids from commercial products of caja (*Spondias lutea*). **Journal of food composition and analysis**, v. 14, n. 4, p. 335-343, 2001.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 206-212, 2006.

ISIDORO, M. M.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; ARRUDA, A. C.; SILVA, S. C. Fitoquímica e quimiosistemática de *Euxylophora paraensis* (Rutaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2119-2124, 2012.

JORGE, S. A.; DANTAS, R. S. P. E. **Abordagem Multidisciplinar no Tratamento de Feridas**. São Paulo: Atheneu, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KHODADADI, S.; NASRI, H. An update on ellagic acid as a natural powerful flavonoid. **Annals of Research in Antioxidants**, v. 2, n. 2, p. 1-5, 2017.

KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and physiology of the skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, n. 4, p. 203-213, 2011.

KOSTER, M. I.; ROOP, D. R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **European Journal of Cell Biology**, v. 83, n. 11, p.625-629, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**. 8 ed. Skokie: Saunders, 2009.

KUNDU, J. K.; SURH, Y.- J. Inflammation: Gearing the journey to câncer. **Mutation Research**, p. 15 – 30. 2008.

KUPPER, T. S.; FUHLBRIGGE, R. C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 211-222, 2004.

- LANDETE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1150–1160, 2011.
- LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 787-795, 2002.
- LIEW, F. Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunology Letters**, v. 85, n. 2, p. 131-134, 2003.
- LIM, H., PARK, H., KIM, H. P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 4, p. 442–448, 2004.
- LONGUI, C. A. Corticoterapia: minimizando efeitos colaterais. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5, p. 163-171, 2007.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Nova Odessa, p. 544, 2008.
- LUZ, S. M. D. **Atividade analgésica e toxicidade da *Spondia mombin* L. em modelos animais**. Universidade Estadual da Paraíba. 2014. 34 p.
- LOWRY, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; **J. Biol. Chem.** 1951, 193, 265.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S.A. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003.
- 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.
- MATTIETTO, R. A.; LOPES, A. S.; MENEZES, H. C. Caracterização física e físico-química dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e de suas polpas obtidas por dois tipos de extrator. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 3, p. 156-164, 2010.
- MECKLENBURG, L.; KUSEWITT, D.; KOLLY, C.; TREUMANN, S.; ADAMS, E.T.; DIEGEL, K.; YAMATE, J.; KAUFMANN, W.; MÜLLER, S.; DANILENKO, D.; BRADLEY, A. Proliferative and non-proliferative lesions of the rat and mouse integument. **Journal of toxicologic pathology**, v. 26, n. 3, p. 27-57, 2013.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.
- MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p.257-262, 2009.

MOLLINEDO, F.; BORREGAARD, N.; BOXER, L. A. Novel trends in neutrophil structure, function and development. **Immunology Today**, v. 20, n. 12, p. 535-537, 1999.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892- 896, 2005.

MUELLER-HARVEY, I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, n.13, p.1097-0010, 2010.

MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 6, p. 735-744, 2006.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 1331-1336, 2006.

NJOKU, P. C.; AKUMEFULA, M. I. Phytochemical and nutrient evaluation of *Spondias mombin* leaves. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 6, n. 6, p. 13-615, 2007.

NWORU, C. S.; AKAH, P. A.; OKOYE, F. B.; TOUKAM, D. K.; UDEH, J.; ESIMONE, C. O. The leaf extract of *Spondias mombin* L. displays an anti-inflammatory effect and suppresses inducible formation of tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide (NO). **Journal of Immunotoxicology**, v. 8, n. 1, p. 10-6, 2011.

OFFIAH, V. N.; ANYANWU, I. I. Abortifacient activity of an aqueous extract of *Spondias mombin* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 317-320, 1989.

OJO, O. A.; AFON, A.A.; OJO, A.B.;AJIBOYE, B.O.;OYINLOYE, B.E.;KAPPO,A.P.Inhibitory effects of solventes-partitioned fractions of two Nigerian herbs (*Spondias smombin* linn. And *Mangifera indica* L.) on  $\alpha$ - amylase and  $\alpha$ -glycosidase.**Antioxidants**.v.7, p.73,2018.

OKAMOTO, M. K. H. **Estudo das Atividades Cicatrizante e Antimicrobiana do Extrato Glicólico e do Gel de *Psidium guajava* L. e Estudo da Estabilidade do Gel.** 2010. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OLIVEIRA, A. C. D.; ROPKE, C. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. 2016. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 10, n. 2, p.185-198, 2016.

OLIVEIRA, S. T.; LEME, M. C.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; MANFRON, M. P. Formulações do confrei (*Symphytum officinalis* L.) na cicatrização de feridas cutâneas emratos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 7-8, n. 1, p. 65-74, 2000/2001.

OLUGBUYIRO, J. Á.; MOODY, J. O.; HAMANN, M. T. Phytosterols from *Spondias mombin* Linn with antimycobacterial activities. **African Journal of Biomedical Research**, v. 16, n. 1, p. 19-24, 2013.

O'NEILL, L. A. J. Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**. 2006.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Alma-Ata 1978 – **Cuidados primários de saúde**. Relatório da conferência internacional sobre cuidados primários de saúde. Brasília: Organização Mundial da Saúde/Fundo das Nações Unidas para a Infância; 1979.

PACHALY, J. R. Terapêutica por extrapolação alométrica. In: Cubas, Z.S.; Silva, J.C.R.; Catão-Dias, J.L. (Orgs.). **Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.

PASCUAL, G.; GLASS, C. K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 8, p. 321-328, 2006.

PASPARAKIS, M.; HAASE, I.; NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. **Nature Review Immunology**, v. 14, n. 5, p. 289-301, 2014.

PEREIRA, C. C.; FONSECA, L. F.; SANTOS, M. V.; RODRIGUES, P. H. M.; BORELLI, P. Avaliação da atividade da mieloperoxidase neutrofílica em bovinos da raça Holandesa e sua correlação com níveis plasmáticos de ácido ascórbico. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 7, n. 3, p. 148-152, 2000.

PINTÉR, E.; HELYES, Z.; PETHÖ, G.; SZOLCSÁNYI, J. Noradrenergic and peptidergic sympathetic regulation of cutaneous microcirculation in the rat. **European Journal Pharmacology**, v. 325, n. 1, p. 57-64, 1997.

PINTO, C. A.; SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, suppl. 1, p.45-61, 2002.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JANSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063-1072, 2008.

RAGHOW, R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. **The FASEB Journal**, v. 8, n. 11, p. 823-831, 1994.

RAHMAN, S.; BHATIA, K.; KHAN, A. K.; KAUR, M.; AHMAD, F.; RASHID, H.; ATHAR, M.; ISLAM, F.; RAISUDDIN, S. Topically applied vitamin E prevents massive cutaneous inflammatory and oxidative stress responses induced by double application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 172, n. 3, p. 195-205, 2008.

RAMOS, K. R. L. P. **Avaliação da atividade antidiarreica de *Spondias purpúrea* L. (Anarcadiaceae) em modelos animais**. 2013. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba, 2013.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, p. 1603 – 1616. 2010.

REYNOLDS, T. The evolution of chemosystematics. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2887–2895, 2007.

RIELLA, K. R.; MARINHO, R. R.; SANTOS, J.S.; PEREIRA-FILHO, R. N.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; THOMAZZI, S. M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656-663, 2012.

ROVER JUNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2001.

RYAN, T. The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. **Journal Micron**, v. 35, n. 3, p. 161-171, 2004.

SACRAMENTO, C. K.; SOUZA, F.X. *Cajá (Spondias mombin L.)*. Jaboticabal: Funep. (Série Frutas Nativas, 4), p. 42, 2000.

SALES, M. D. C.; SARTOR, E. B.; GENTILLI, R. M. L. Etnobotânica e etnofarmacologia: medicina tradicional e bioprospecção de fitoterápicos. **Revista Salus - Journal of Health Sciences**, v. 1, n. 1, p. 17-26, 2015.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2. ed., São Paulo: Artmed, 2001.

SANCHEZ, T.; MORENO, J.J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 877-879, 1999.

SANDHYA, S. S.; SAI, K.; VINOD, K. R.; DAVID, B.; KUMAR, K. Plants as potent anti diabetic and wound healing agents - a review. **Hygeia Journal for Drugs and Medicines**, v. 3, n. 1, p. 11-19, 2011.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. F.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOME, A. R.; CAMPOS, A.R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3p. 504-510, 2010.

SARGENT, M. G.; Anal. **Biochemistry**. 1987, 163, 476.

SARWAR, B.; SWAIN, S.; HASAN, H.; BARKAT, M.A.; HUSSAIN, M.S. Systematic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspectives. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, n. 10, p. 120-137, 2011.

SATO, M.; SAWAMURA, D.; INAS, S.; YAGUCHI, T.; HANADA, K.; HASHIMOTO, I. In vivo introction of the interleukin 6 gene into human keratinocyte: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but, not by the alternatively spliced form. **Dermatological Research**, v. 291, n. 7-8, p. 400-404, 1999.

SAUERSTEIN, K.; KLEDE, M.; HILLIGES, M.; SCHMELZ, M. Electrically evoked neuropeptide release and neurogenic inflammation differ between rat and human skin. **Journal of Physiology**, v. 529, n. 3, p. 803-810, 2000.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Drug Research**, v. 32, n. 3, p. 230-235, 1982.

SEGRE, J. A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **Journal of Clinical Investigation**, v. 16, n. 5, p. 1150-1158, 2006.

SHERWOOD, E. D.; TOLIVER – KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 395 – 405. 2004.

SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; LIMA, D. M.; SANTOS, S. C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue virus. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. 406-413, 2011.

SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M. M.; MARQUES, M. M. M.; OLIVEIRA, D. F.; BARROS, C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 740-746, 2012.

SILVA, E. L. V. **Estudo toxicológico não clínico do extrato hidroalcoólico de *Spondias mombin* L.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. 75 p. 2015.

SILVA, G. A.; BRITO, N. J. N.; SANTOS, E. C. G.; LÓPEZ, J. A.; ALMEIDA, M. G. Gênero *Spondias*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Biofarma**, v. 10, n. 1, p. 27-41, 2014.

SILVA, L.M. **Superação de dormência de diásporos de cajazeira (*Spondias mombin* L.).** 2003. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 82 p. 2003.

SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J. Neuroendocrinology of the skin. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 5, p. 457-487, 2000.

SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

SOUZA, T.M.; FIGHERA, R.A.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 177-190, 2009.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel – A holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v. 67, n. 5, p. 477-502, 2000.

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

TENIUS, F.P.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; IOSHII, S.O. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 141-149, 2007.

UCHENDU, N. C.; ISEK, T. Antifertility activity of aqueous ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) in rats. **African Health Sciences**. v. 8, n. 3, p. 163-167, 2008.

VALERIANO, A. C. F. R.; SILVA JÚNIOR, E. X.; BEDOR, C. N. G.; COSTA, M. M. O uso da fitoterapia na Medicina por usuários do SUS: Uma revisão sistemática. **Multidisciplinary and Psychology Journal**, v. 10, n. 33, p. 219 – 236, 2017.

VILLEGAS, L. F.; FERNANDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; TORRES, R.; ZAVALETA, A.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 193-200, 1997.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2<sup>a</sup> ed., New York: Springer, 384p, 2001.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sciences**, v. 58, n. 18, p. 1485-1507, 1996.

WILLOUGHBY, D. A. **In vivo models of Inflammation**. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. *Inflammation Protocols*, New Jersey: Humana Press, p. 129-131, 2003.

YOUNG, J. M.; SPIRES, D. A.; BEDORD, C. J.; WAGNER, B.; BALLRON, S. J.; DE YOUNG, L. M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, n. 4, p. 367-371, 1984.

ZANCANARO, C.; MERIGO, F., CRESCIMANNO, C.; ORLANDINI, S.; OSCULATI, A. Immunohistochemical evidence suggests intrinsic regulatory activity of human eccrine sweat glands. **Journal of Anatomy**, v. 194, n. 3, p. 433-444, 1999.