

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

MAYRA SOARES PÍCCOLO

**BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Xanthosoma sagittifolium* E
DA POMADA CICATRIZANTE OBTIDA DO EXTRATO ETANÓLICO**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

MAYRA SOARES PÍCCOLO

**BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Xanthosoma sagittifolium* E
DA POMADA CICATRIZANTE OBTIDA DO EXTRATO ETANÓLICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Virgínia Ramos Pizziolo

Coorientadores: Marisa Alves Nogueira Diaz
Mariáurea Matias Sarandy Souza
Reggiani Vilela Gonçalves

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P591b Píccolo, Mayra Soares, 1991-
2023 Bioatividade dos extratos das folhas de *Xanthosoma sagittifolium* e da pomada cicatrizante obtida do extrato etanólico / Mayra Soares Píccolo. – Viçosa, MG, 2023.
1 tese eletrônica (96 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Virginia Ramos Pizziolo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.

Referências bibliográficas: f. 82-94.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.105>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Matéria médica vegetal. 2. Cicatrização de ferimentos.
3. Ferimentos e lesões - Tratamento. 4. Células -Proliferação.
5. Fibroblastos. I. Pizziolo, Virginia Ramos, 1961-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 615.32464

MAYRA SOARES PÍCCOLO

**BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Xanthosoma sagittifolium* E
DA POMADA CICATRIZANTE OBTIDA DO EXTRATO ETANÓLICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 25 de agosto de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **MAYRA SOARES PICCOLO**
Data: 12/03/2024 13:16:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mayra Soares Píccolo
Autor

Documento assinado digitalmente
 **VIRGINIA RAMOS PIZZIOLLO**
Data: 12/03/2024 14:25:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Virgínia Ramos Pizziolo
Orientadora

Ao meu filho Bento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me capacitar, iluminar e dar coragem e força para vencer os desafios e realizar meus sonhos.

Aos meus pais, Marco Antônio e Vilma exemplos de dedicação, cuidado, atenção, paciência e amor com seus filhos, que não medem esforços para nos ver felizes, estando presentes e apoiando em todas as etapas de nossas caminhadas.

Ao meu esposo Leandro, que esteve ao meu lado em mais essa etapa, sendo prestativo, paciente, incentivador e cuidadoso. Companheiro de todas as horas, você faz parte dessa conquista. Amo você.

Ao meu irmão Matheus, por ser um irmão presente, amigo e sempre pronto para ajudar.

Ao meu filho Bento, meu maior incentivo para ser cada dia melhor e mais forte para superar as dificuldades e realizar meus sonhos, pela nossa felicidade.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação em Bioquímica Aplicada.

À minha orientadora, Virgínia Ramos Pizzio, por ter confiado e aceito orientar o desenvolvimento deste trabalho, pela dedicação, confiança depositada e toda sabedoria transmitida.

Às minhas coorientadoras, Professoras Marisa Alves Nogueira Diaz, Reggiani Vilela Gonçalves e Dr^a. Mariáurea Matias Sarandy Souza, por todo suporte oferecido, solicitude, ensinamentos, incentivos e contribuição no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos membros da banca pela participação e por todas as contribuições ao trabalho.

Aos professores e técnicos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica aplicada da UFV.

Aos amigos do Laboratório de Química e Bioquímica de Produtos Naturais – BioNat.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*
(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

PÍCCOLO; Mayra Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2023. **Bioatividade dos extratos das folhas de *Xanthosoma sagittifolium* e da pomada cicatrizante obtida do extrato etanólico.** Orientadora: Virgínia Ramos Pizziolo. Coorientadores: Marisa Alves Nogueira Diaz, Mariáurea Matias Sarandy Souza e Reggiani Vilela Gonçalves.

Devido à rica flora disponível em nosso país e no conhecimento do potencial farmacológico de fitoterápicos disponíveis no mercado que atuam de diferentes formas, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial cicatrizante dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Xanthosoma sagittifolium*, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, além disso avaliou-se também a atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante uma vez que estas podem potencializar o efeito cicatrizante. Para avaliar a atividade antibacteriana *in vitro*, utilizou-se bactérias gram positivas e gram negativas para a determinação da concentração mínima inibitória (CIM) dos extratos. Para determinação da atividade anti inflamatória *in vitro* foram avaliadas a capacidade dos extratos em inibir a desnaturação proteica e a capacidade de inibir a produção de nitrito e nitrato, induzido por lipopolissacarídeos (LPS). Para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* utilizou-se o ensaio de captura do radical 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH). O potencial cicatrizante *in vitro* foi avaliado por meio dos testes de proliferação, citoproteção e migração celular. Para os testes *in vivo* foram manipuladas duas pomadas de diferentes concentrações (5 e 10% m/m) do extrato etanólico de *X. sagittifolium* que tiveram o potencial cicatrizante avaliado por meio da determinação de parâmetros como: índice de contração de feridas, análises histológicas de quantificação de fibras colágenas e celularidade, parâmetros hematológicos e atividade antioxidante tecidual, onde foram quantificadas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), além de marcadores como o malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (NO). A partir dos dados obtidos foi possível observar que o extrato etanólico é mais promissor quanto ao potencial cicatrizante quando comparado ao extrato hexânico nos testes *in vitro* de proliferação, citoproteção e migração celular, além de possuir maior capacidade antibacteriana e antioxidante *in vitro*. Na experimentação *in vivo* atestou-se a eficácia do extrato etanólico em promover a contração da ferida, aumento da produção de

colágeno e recrutamento de células para o tecido cicatricial, além de redução do estresse oxidativo. Dessa forma, após os testes *in vitro* e *in vivo*, observa-se que o extrato etanólico de *X. sagittifolium* pode atuar na modulação do processo cicatricial, e em ambas concentrações testadas os resultados foram satisfatórios, porém a pomada com concentração de 5% demonstrou melhor efeito.

Palavras-chave: Fitoterápico; Cicatrizante; Ferida; Proliferação; Fibroblasto.

ABSTRACT

PÍCCOLO, Mayra Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2023. **Bioactivity of extracts from *Xanthosoma sagittifolium* leaves and healing ointment obtained from ethanolic extract.** Adviser: Virgínia Ramos Pizzolo. Co-advisers: Marisa Alves Nogueira Diaz, Mariáurea Matias Sarandy Souza e Reggiani Vilela Gonçalves.

Due to the rich flora available in our country and the knowledge of the pharmacological potential of herbal medicines available on the market that act in different ways, the objective of this work was to evaluate the healing potential of ethanolic and hexane extracts from the leaves of *Xanthosoma sagittifolium*, through in-house tests. *vitro* and *in vivo*, in addition, antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity was also evaluated, as these can enhance the healing effect. To evaluate the antibacterial activity *in vitro*, gram positive and gram negative bacteria were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts. To determine the anti-inflammatory activity *in vitro*, the ability of the extracts to inhibit protein denaturation and the ability to inhibit the production of nitrite and nitrate, induced by lipopolysaccharides (LPS), were evaluated. To evaluate *in vitro* antioxidant activity, the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical capture assay was used. The *in vitro* healing potential was evaluated using proliferation, cytoprotection and cell migration tests. For *in vivo* tests, two ointments of different concentrations (5 and 10% m/m) of the ethanolic extract of *X. sagittifolium* were manipulated and their healing potential was evaluated by determining parameters such as: wound contraction index, histological analysis of quantification of collagen fibers and cellularity, hematological parameters and tissue antioxidant activity, where the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) were quantified, in addition to markers such as malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO). From the data obtained, it was possible to observe that the ethanolic extract is more promising in terms of healing potential when compared to the hexane extract in *in vitro* tests of cell proliferation, cytoprotection and migration, in addition to having greater antibacterial and antioxidant capacity *in vitro*. *In vivo* experiments demonstrated the effectiveness of the ethanolic extract in promoting wound contraction, increasing collagen production and recruiting cells into the scar tissue, in addition to reducing

oxidative stress. Thus, after in vitro and in vivo tests, it was observed that the ethanolic extract of better effect.

Keywords: Phytotherapy; Healing; Wound; Proliferation; Fibroblast.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Imagens das folhas e flor de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott (taioba)	20
Figura 2 – Representação da planta de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) (taioba), sendo A - folha, B - caule, C - rizoma, D - flor e E – raiz	21
Figura 3 - Etapas da cicatrização de feridas, com destaque para o número relativo das principais células presentes durante as três etapas do processo cicatricial	22
Figura 4 - Estrutura química de compostos com atividade cicatrizante.	25
Figura 5 - Exsicata da folha de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> e identificação da exsicata no herbário da UFV.	28
Figura 6 - Etapas do modelo experimental para avaliação do efeito cicatrizante <i>in vivo</i> , das pomadas contendo extrato etanólico de <i>X. sagittifolium</i> nas concentrações de 5 e 10% (m/m).	36
Figura 7 – Divisão dos animais de acordo com o grupo experimental.	39
Figura 8 - Determinação da área da ferida por meio da medição com paquímetro nos dois sentidos, horizontal e vertical, formando um ângulo de 90°.	40
Figura 9 – Concentração de fibras colágenas no decorrer das fases do processo cicatricial. (Adaptado de ISAAC et. al., 2010).	45
Figura 10 - Inibição da desnaturação proteica em porcentagem. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	49
Figura 11 - Produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS 10µg/mL (controle negativo), Dexametasona 200µg/mL (controle positivo), extrato hexânico de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> e extrato etanólico de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> . Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	50
Figura 12 - Eliminação do radical DPPH em porcentagem. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	52
Figura 13 - Porcentagem de viabilidade celular em fibroblastos NIH/3T3. Controle positivo: meio de cultura + células. Controle negativo: células tratadas com DMSO 0,8%. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	53
Figura 14 - Porcentagem de viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7. Controle positivo: meio de cultura + células. Controle negativo: células tratadas com DMSO 0,8%. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	54
Figura 15 - Efeito citoprotetor (%) em fibroblastos NIH/3T3. Controle positivo: células + meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10%, sem tratamento com peróxido de hidrogênio. Controle negativo: células + meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10% + peróxido de hidrogênio 2mM. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	55
Figura 16 - Efeito citoprotetor (%) em macrófagos RAW 264.7. Controle positivo: células + meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10%, sem tratamento com peróxido de hidrogênio. Controle negativo: células + meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10% + peróxido de hidrogênio 2mM. Os	

resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	55
Figura 17 - Migração celular de fibroblastos NIH/3T3. Controle positivo: meio de cultura + células + mitomicina C. Efeito dos tratamentos com extrato etanólico de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> nas concentrações de 200 e 400 µg/mL. Os resultados apresentam a média ± desvio padrão e letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).	56
Figura 18 - Taxa de migração dos fibroblastos NIH/3T3, submetidos ao tratamento com extrato etanólico de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> nas concentrações de 200 e 400 µg/mL e para o controle: meio de cultura + células + mitomicina C, nos tempos 8 e 24 horas. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	57
Figura 19 - Índice de contração das feridas (%), nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	59
Figura 20 - Cicatrização das feridas induzidas em camundongos, nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. G1 - Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata; G2 - Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada; G3 - Grupo tratamento pomada 5%; G4 - Grupo tratamento pomada 10%.	59
Figura 21 - Análise hematológica de Leucócitos (mil/ mm ³) do G1 - Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	61
Figura 22 - Análise hematológica de Hemácias (milhões/mm ³) do G1 - Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	61
Figura 23 - Análise hematológica de Plaquetas (mil/mm ³) do G1 - Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	62
Figura 24 - Celularidade, em porcentagem, nos dias 3, 8 e 12 pós ferida. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	63
Figura 25 - Fotomicrografias representativas da celularidade aos 8 dias pós ferida (coloração hematoxilina-eosina). Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	63
Figura 26 - Histomorfometria do colágeno tipo III e I, em porcentagem, nos dias 3, 8 e 12 pós ferida. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	64
Figura 27 - Fotomicrografia obtida sob microscopia de polarização com coloração Picrosirius red, que mostra a distribuição das fibras de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde), em 3, 8 e 12 dias. G1 - Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata; G2 - Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada; G3 - Grupo tratamento pomada 5%; G4 - Grupo tratamento pomada 10%.	65
Figura 28 - Concentração tecidual de malondialdeído (MDA) (µmol/L/mg de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	66
Figura 29 - Concentração tecidual de óxido nítrico (NO) (µmol/L) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	67

Figura 30 - Concentração tecidual de superóxido dismutase (SOD) (U/mg de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

.....68

Figura 31 - Concentração tecidual de glutathione S-transferase (GST) (U/mg de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

.....68

Figura 32 - Concentração tecidual de catalase (CAT) (U/mg de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

.....69

Figura 33 - Cromatograma do extrato etanólico de *Xanthosoma sagittifolium* mostrando os principais compostos observados: (1) Undecano, (2) (4H)-Benzofuranona, (3) 2-Hexadecen-1-ol (4) 2-Pentadecanona, (5) Pentadecanal, (6) Ácido hexadecanóico, (7) Ácido 9,12,15-octadecatrienóico, (8) Citronelol (9) Ciclohexanol, 5-metil-2-(1-metiletil), (10) Ácido octadecanóico, (11) z-7-Hexadecenal, (12) Z,Z-8,10-Hexadecadieno-1-ol, (13) z, z, z-7,10,13-Hexadecatrienal.

.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL) dos EHXS* e EEXS*	47
Tabela 2 - Estudo de toxicidade de dose única (aguda) da pomada contendo extrato etanólico de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> na concentração de 10%.	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Catalase
CEUA/UFV	Comitê de Ética no Uso de Animais/UFV
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CNDB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS/UFV	Laboratório de Análises Clínicas/Universidade Federal de Viçosa
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEXS	Extrato Etanólico de <i>Xanthosoma sagittifolium</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EXHS	Extrato Hexânico de <i>Xanthosoma sagittifolium</i>
FGF a e b	Fator de crescimento derivado dos fibroblastos a e b
G1	Grupo controle com pomada comercial – Sulfadiazina de prata
G2	Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada
G3	Grupo tratamento pomada 5%
G4	Grupo tratamento pomada 10%
GST	Glutathione S-transferase
HE	Hematoxilina-Eosina
IC	Índice de Contração
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
MH	Mueller Hinton
MTT	Tetrazolium3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo
NIH/3T3	Células de fibroblasto de murino

NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PANCs	Plantas Alimentícias não Convencionais
PBS	Tampão fosfato salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEG	Propilenoglicol
RAW 264.7	Células de macrófagos murinos
RGB	Escala Red, Green and Blue
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
TMPO	N-oxil-2,2,2,6,6-tetrametilpiperidima
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
U	Unidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFV	Universidade Federal de Viçosa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Material vegetal e produção dos extratos	28
3.2. Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	29
3.3. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	30
3.3.1. Ensaio de captura do radical 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH).....	30
3.4. Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	31
3.4.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória por meio da inibição da desnaturação de proteína	31
3.4.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS)	31
3.5. Avaliação do efeito cicatrizante <i>in vitro</i>	32
3.5.1. Ensaio de viabilidade celular	33
3.5.1.1. Ensaio de viabilidade celular em fibroblasto e macrófagos.....	33
3.5.2. Efeito Citoprotetor	34
3.5.3. Ensaio de <i>Scratch</i> para avaliação do potencial migratório das células.....	35
3.6. Avaliação do efeito cicatrizante <i>in vivo</i>	36
3.7. Preparo das pomadas	37
3.7.1. Animais	37
3.7.2. Ensaio de Toxicidade Dérmica Aguda	38
3.7.3. Procedimento cirúrgico	38
3.7.4. Grupos experimentais	39
3.7.5. Eutanásia.....	40
3.8. Análise macroscópica das feridas	40
3.9. Análises hematológicas	41
3.10. Perfil oxidativo tecidual	41
3.10.1. Preparo do homogenato	41
3.10.2. Concentração de Malondialdeído (MDA)	41
3.10.3. Dosagem de óxido nítrico	42

3.10.4.	Atividade de superóxido dismutase (SOD).....	42
3.10.5.	Atividade de catalase (CAT)	42
3.10.6.	Quantificação de glutathione S transferase (GST)	43
3.10.7.	Dosagem de proteínas totais	43
3.11.	Análises histológicas.....	43
3.11.1.	Avaliação global do tecido	43
3.11.2.	Análise de Colágeno.....	44
4.	RESULTADOS.....	47
4.1.	Atividade antibacteriana	47
4.2.	Avaliação do potencial anti-inflamatório dos extratos <i>in vitro</i>	48
4.2.1.	Inibição de Desnaturação Proteica	48
4.2.2.	Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i> em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS)	50
4.3.	Potencial antioxidante <i>in vitro</i> dos pelo ensaio de DPPH.....	51
4.4.	Atividade cicatrizante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	52
4.4.1.	Efeito dos extratos na proliferação celular <i>in vitro</i>	52
4.4.2.	Efeito citoprotetor <i>in vitro</i>	54
4.4.3.	Potencial cicatrizante <i>in vitro</i> por ensaio de <i>Scratch</i>	56
4.4.4.	Toxicidade dérmica aguda	57
4.4.5.	Índice de contração da ferida	58
4.4.6.	Análises hematológicas	60
4.4.7.	Análise histológica	62
4.4.8.	Perfil oxidativo tecidual	65
5.	DISCUSSÃO.....	71
6.	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXO A – Certificado CEUA - UFV	95
	ANEXO B – Processo de depósito de pedido de patente.....	96

1. INTRODUÇÃO

Em todo o mundo muitas plantas são utilizadas para o preparo de medicamentos, sendo estas conhecidas por plantas medicinais. O uso de plantas com fins medicinais, oriundo do conhecimento tradicional ou popular, vem sendo documentado há milênios, fazendo parte da cultura de povos no Brasil e em diversos outros países, acompanhando assim a história da humanidade (ROCHA et al. 2021), mas foi apenas em 1978 que a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu a finalidade profilática e curativa dos fitoterápicos (PATRICIO et. al., 2022).

Os fitoterápicos podem ser definidos como produtos farmacêuticos obtidos a partir de plantas medicinais, ou derivados destas, que passaram por estudos laboratoriais e que tem a função, eficácia e segurança baseadas em evidências clínicas. São produtos industrializados que passaram por avaliação, determinação e quantificação do ativo vegetal, seguido do isolamento, armazenamento e comercialização do composto químico ativo em farmácias (SOUZA-MOREIRA, SALGADO e PIETRO, 2010; FERREIRA, et. al., 2019).

No Brasil, a regulamentação da indústria de medicamentos, inclusive dos fitoterápicos é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Essa regulamentação segue algumas normativas como a RDC 14/2010 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, estabelecendo os requisitos mínimos para o registro destes (BRASIL, 2010). Além desta, tem-se a RDC 26/2014 implementada em 2014 pela Anvisa, que dispõe que assim como qualquer outro medicamento, os fitoterápicos devem ser submetidos a testes e análises de controle de qualidade e além disso devem ser caracterizados pela constância da qualidade da matéria prima, dentre outras coisas (BRASIL, 2014).

De forma direta ou indireta, estima-se que cerca de 25% de todos os medicamentos disponíveis no mercado sejam derivados de plantas medicinais (CARVALHO, et.al., 2011; RODRIGUEZ VELOSO, et. al., 2023).

Assim como os medicamentos alopáticos, os fitoterápicos podem ser encontrados em diversas formas para administração, como em pomadas, géis, spray, cápsulas, cremes, soluções, xaropes, comprimidos e óleos essenciais, dependendo da finalidade e do efeito que se deseja obter. Os fitoterápicos podem ser administrados em conjunto com outros medicamentos ou como a única medicação do tratamento a depender da doença a ser tratada (GARLET, 2019).

Um dos principais benefícios dos fitoterápicos é que estes, em sua maioria, apresentam menos efeitos colaterais e apesar de poderem causar efeitos adversos graves a chance de isso ocorrer, quando consumido de maneira adequada, é menor se comparado ao uso de medicamentos alopáticos (CARVALHO, da COSTA LEITE e COSTA, 2021). Além disso, os fitoterápicos apresentam custo de produção e, consequentemente de venda, inferiores aos medicamentos alopáticos sintéticos. Dessa forma, a constante busca por extratos vegetais, óleos vegetais e óleos essenciais com atividade biológica é interessante e importante (de MOURA COSTA, et. al., 2019).

Extratos vegetais são preparações concentradas obtidas a partir de matérias-primas vegetais secas e preparadas por processos como a maceração, que envolvam um solvente de polaridade conhecida. Constituindo-se basicamente de duas etapas de preparação, a primeira delas sendo a separação dos compostos bioativos a partir de uma matéria prima complexa, pela utilização do solvente, e a segunda constituída pela evaporação deste solvente, utilizando métodos como por exemplo a rotaevaporação seguida de liofilização (GALERIANI, COSMO e BENETON, 2020). Os extratos vegetais podem apresentar propriedades biológicas importantes para a saúde humana, podendo ser antisséptico, bactericida, hidratante, emoliente, umectante, cicatrizante, analgésico, refrescante, antioxidante, anti-inflamatório, dentre outros (KOBAYASHI e AMARAL, 2018).

Apesar da variedade de medicamentos disponíveis utilizados para o tratamento de feridas, os produtos naturais, produzidos a partir de plantas medicinais, continuam sendo uma grande fonte de medicamentos para este fim e para o tratamento de várias condições patológicas, tendo sua origem na medicina popular (SILVA, 2022; PAGAMICCE et. al., 2019). Isso porque o Brasil detém vasta gama de espécies de plantas que foram se adaptando ao longo do tempo às condições típicas de biodiversidade do país. Com isso, observa-se um grande potencial para a descoberta e aplicação de plantas na composição de novos fármacos (DUTRA et al., 2016; dos SANTOS, et. al., 2022). Entretanto, são escassos na bibliografia, quando comparado ao número de espécies vegetais existentes, os estudos que avaliam a fundo a viabilidade e aplicabilidade de espécies vegetais por meio de ensaios farmacológicos (VALLI et al., 2018).

Dentre as espécies de plantas alimentícias não convencionais (PANCs), temos a *Xanthosoma sagittifolium*, pertencente à família Araceae e popularmente conhecida de várias maneiras, como: taioba, taiá, malanga, manfafa, dentre outros. Esta hortaliça folhosa (Figura 1) é uma herbácea perene, cujas folhas são largas e alongadas, podendo atingir até dois metros de altura, com folhas carnosas, cerosas e de nervuras marcantes (BRASIL, 2010; CAMILI et al., 2013; ORIDUPA, FOLASIRE e OWOLABI, 2017; dos SANTOS, et. al., 2022).

Figura 1 – Imagens das folhas e flor de *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott (taioba)



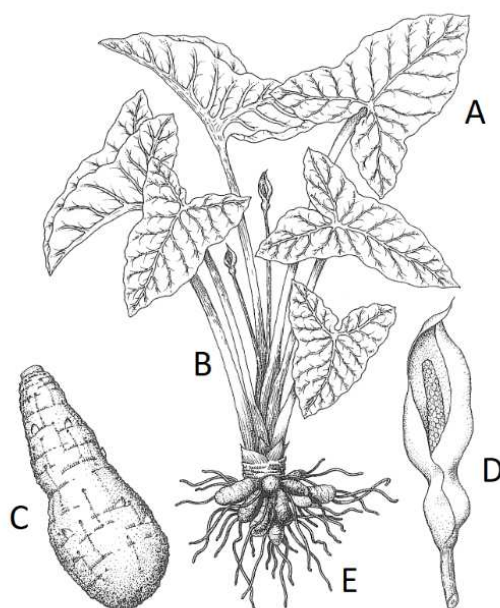
Fonte: Adaptado de EMBRAPA, 2017.

Principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, as folhas e caules (Figura 2) são utilizados em refogados e sopas, embora o rizoma também possa ser consumido, na forma de farinha ou cozido (NYADANU; LOWOR, 2015; SOUZA, 2018). Sua composição nutricional destaca-se pelo conteúdo de fibra alimentar, que resulta em efeitos fisiológicos positivos, dentre eles a diminuição da glicemia, do colesterol e a modulação da microbiota intestinal (de ALMEIDA JACKIX et al., 2013; SANTOS et. al., 2022).

Alguns estudos conferem atividades farmacológicas às folhas de *X. sagittifolium*, como analgésico, anti-inflamatório (HOSSAIN et. al., 2017; NOOR et. al., 2015) e antioxidante (NISHANTHINI & MOHAN, 2012; HOSSAIN et. al., 2015).

A matéria prima vegetal, para a produção do fitoterápico, precisa ser inicialmente, testada em relação à sua citotoxicidade, indicando a habilidade que esses compostos possuem em ocasionar ou não a morte celular, principalmente no que diz respeito às células alvo da terapia, para aí sim se definir, baseado nos resultados, se os estudos darão prosseguimento para a produção do medicamento fitoterápico (da SILVA CAMPELO, 2020).

Figura 2 – Representação da planta de *Xanthosoma sagittifolium* (L.) (taioba), sendo A - folha, B - caule, C - rizoma, D - flor e E – raiz



Fonte: Adaptado de BERMEJO e LEON, 1994.

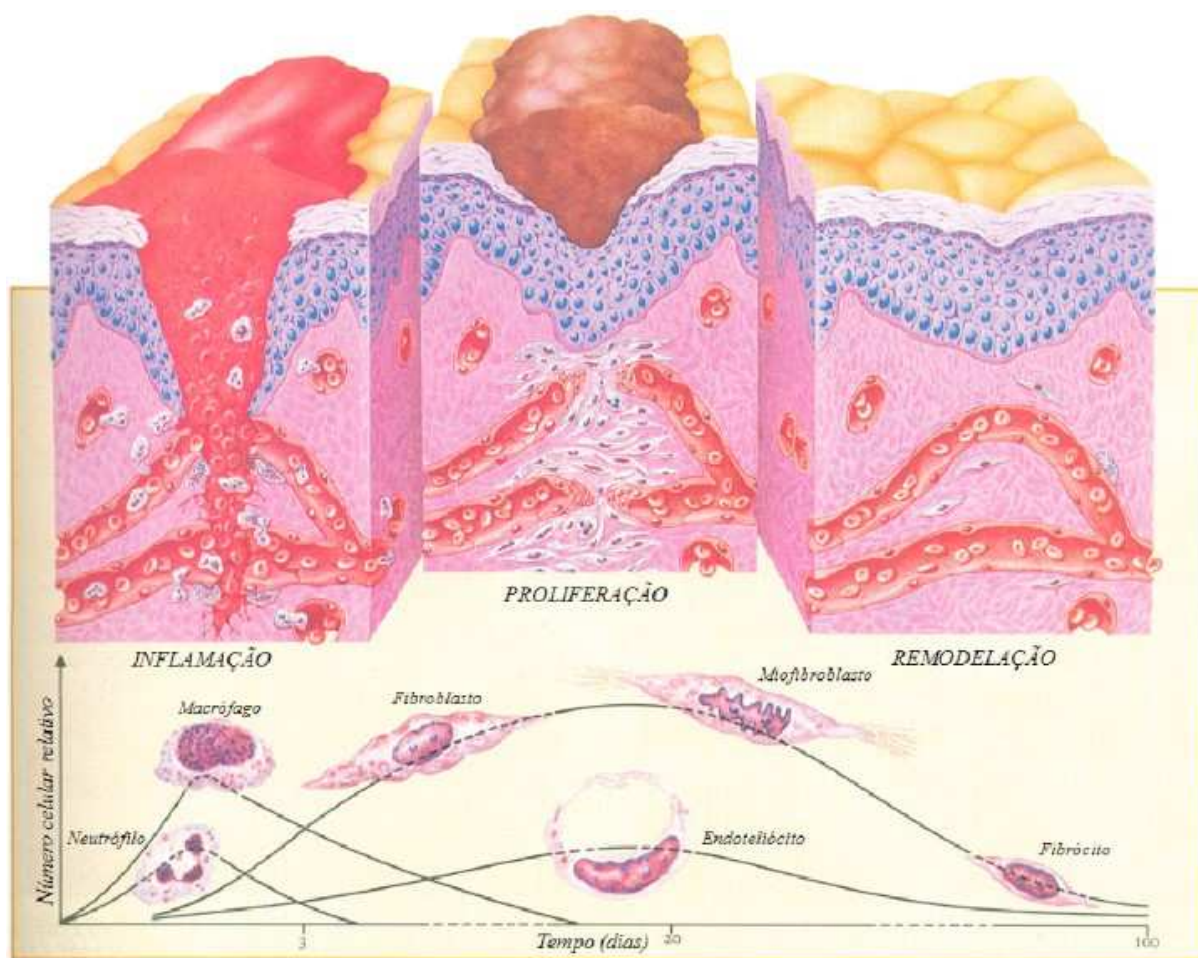
No caso da cicatrização, estão disponíveis no mercado medicamentos fitoterápicos que podem atuar desde promovendo a assepsia da ferida ou até mesmo intervindo nas fases da cicatrização de forma ativa, atuando na modulação do processo cicatricial (PIRIZ, et. al., 2014; MARTELLI, ANDRADE e SANTOS, 2018). As feridas são consideradas, no Brasil, problema de saúde pública uma vez que se tem um alto número de pacientes com comprometimento da integridade da pele, demandando atendimento e tratamento muitas vezes prolongado e de alto custo (CAMPOS, et. al., 2016; OLIVEIRA, et. al., 2019).

O processo de cicatrização de feridas ocorre por uma organizada sequência de eventos a nível celular e molecular que tem início imediatamente após a lesão ser formada, afim de substituir o tecido lesado por novo tecido conjuntivo vascularizado (RAMALHO, et. al., 2018). Quando o processo cicatricial demora a ocorrer, ultrapassando seis semanas de tratamento, têm-se um problema de saúde pública, uma vez que causa impacto social, econômico e psicológico para o paciente (RIBEIRO, et. al., 2012; da SILVA GOIS, et. al., 2021).

A cicatrização de uma ferida é dividida em três etapas sequenciais (Figura 3). A primeira delas é a fase inflamatória, o objetivo principal nesta etapa é estancar o sangramento, além da remoção de micro-organismos, células mortas e corpos

estranhos presentes na ferida. Duas reações imediatas são estimuladas neste momento, a hemostasia e a inflamação. Para a ocorrência da hemostasia são liberadas substâncias como prostaglandinas e tromboxanos, que são vasoconstritores, levando à agregação plaquetária e por consequência o estímulo da cascata de citocinas e da coagulação, objetivando a chegada de fatores de crescimento ao local da ferida, podendo ser destacados o fator de crescimento de transformação beta ($TGF-\beta$), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado dos fibroblastos (FGF a e b) e fator de crescimento epidérmico (EGF) (BARON, et. al., 2020).

Figura 3 - Etapas da cicatrização de feridas, com destaque para o número relativo das principais células presentes durante as três etapas do processo cicatricial



Fonte: Adaptado de ISAAC et. al., 2010.

Depois disso, observa-se a ocorrência de vasodilatação, sendo neste momento possível observar os sinais clínicos clássicos da inflamação: calor, rubor, edema e dor. Essa fase dura de 1 a 4 dias, dependendo da lesão. Após o terceiro dia

até o décimo, os macrófagos continuam a fagocitose e desbridamento do local, além da deposição de fibrina (Di PIETRO, et.al., 2021).

A segunda etapa é chamada de fase proliferativa, que pode durar de 5 a 14 dias, nesta fase, tem-se inicialmente a epitelização que ocorre com a migração de células epiteliais para a restauração das camadas da epiderme. Concomitantemente tem-se a angiogênese que é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), por proteínas como a angiogenina e por sinalizadores celulares como a família de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) responsável pelo aumento da permeabilidade através da vasodilatação por liberação de óxido nítrico e da estimulação de células endoteliais. A angiogênese busca criar um ambiente vascular rico em oxigênio e nutrientes, propício para a migração de células epiteliais, além de ser essencial para o mecanismo de reepitelização, e para a formação do tecido de granulação. Nessa fase tem-se também a migração e proliferação dos fibroblastos para o interior da ferida, estas são as principais células envolvidas no processo cicatricial tendo por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, e a síntese de componentes da matriz extracelular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; AITCHESON, et. al., 2021). Os fibroblastos organizam as fibras colágenas e estão diretamente relacionados à formação do tecido de granulação. Além de produzirem colágeno, produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos e proteases, responsáveis pelo desbridamento e remodelamento das células. Sob ação de TGF- β , os fibroblastos são estimulados a produzirem colágeno e a transformarem-se em miofibroblastos, promovendo a contração da ferida (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; AMADEU et al., 2003; CAMPOS, BORGES-BRANCO e GROTH, 2007; BARON, et.al., 2020)

Por último observa-se a fase de reparo ou maturação, que se inicia após o 14º dia e pode durar meses, tendo como característica mais importante a deposição de colágeno de maneira organizada. O colágeno produzido inicialmente é mais fino do que o colágeno presente na pele normal, e tem orientação paralela à pele. Com o tempo, o colágeno inicial (colágeno tipo III) é reabsorvido e um colágeno mais espesso (colágeno tipo I) é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão. A reorganização da nova matriz é um processo importante da cicatrização. Fibroblastos e leucócitos secretam collagenases que promovem a quebra da matriz antiga. A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a

remoção da matriz antiga (CAMPOS, BORGES-BRANCO e GROTH, 2007; BARON, et. al., 2020).

Alguns fatores externos podem interferir no processo cicatricial, como a faixa etária do indivíduo que quanto mais velho menos eficiente se torna a resposta imune; indivíduos com deficiência de nutrientes que possam comprometer a síntese de colágeno e a resposta imune; doenças pré-existentes como diabetes, alterações de coagulação sanguínea, problemas cardiovasculares; além do uso de medicamentos como alguns anti-inflamatórios, antibióticos e quimioterápicos (MANDELBAUM et al., 2003; CANDIDO, 2006; GUSHIKEN, et.al., 2021).

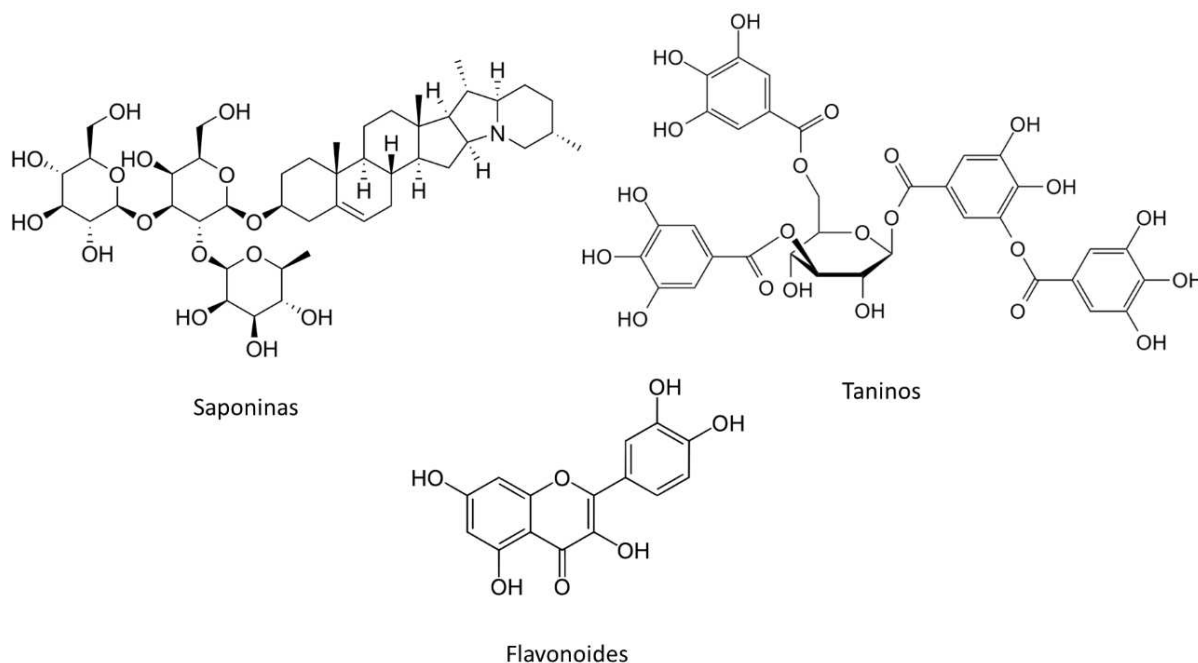
Outrossim, devido à complexidade do processo cicatricial, que envolve várias etapas e processos celulares, comumente observa-se complicações recorrentes no processo, o que gera elevados custos, limitações para os pacientes com redução da qualidade de vida. Estes fatores levam à necessidade de estudos que visem acelerar e potencializar o tratamento, reduzindo assim os custos e possíveis complicações (PONNUSAMY et al., 2015; BARON, et. al., 2020).

Já se tem estudos com resultados positivos de plantas medicinais empregadas na cicatrização de feridas (PIRIZ et al., 2014; BRASIL, 2010; GONÇALVES, et. al., 2017), dentre as com ações comprovadas destacam-se: *Brassica oleracea* var. capitata (repolho) (MATTOSINHOS, et. al., 2022), *Anacardium occidentale* L.(cajueiro) (FURTADO, et. al., 2019), *Caesalpinia ferrea* Mart. (jucá) (BATISTA. et. al., 2017), *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga) (ALVES, de MEDEIROS e CATELLI, 2016), *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira) (ESTEVÃO, et. al., 2017), *Bixa orellana* (urucum) (FRADE SOARES, et. al., 2021), *Stryphnodendrom adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão) (PASSARETTI, et. al., 2016), *Calendula officinalis* L. (calêndula) (PARENTE, et. al., 2009), *Polygonum punctatum* Elliott (erva-de-bicho) (GARLET et. al., 2017), *Coronopu didymus* (L.) Smith (mastruço) (LISBOA-NETO, et. al., 1998), *Aloe Vera* (L.) (babosa) (LIRA, et. al., 2020), *Helianthus annuus* (girassol) (TORRES, et. al., 2021).

Diante disso, medicamentos fitoterápicos surgem como oportunidade para o tratamento de doenças específicas, inclusive doenças de pele, e tratamento de lesões cutâneas, podendo atuar por vários mecanismos diferentes. Indústrias fitofarmacêuticas estão investindo para identificar os componentes bioativos e os modos de ação de várias plantas medicinais (MEDRADO, OLIVEIRA e SANTOS, 2023).

Os compostos bioativos são aqueles que apresentam efeito sobre um organismo, tecidos ou células, no estudo do processo de cicatrização por plantas medicinais, alguns compostos se destacam, como as saponinas, os flavonoides e os taninos (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura química de compostos com atividade cicatrizante.



Fonte: Autora, 2023.

Foram atribuídas às saponinas atividade antifúngica, anti-inflamatória e cicatrizante (FRANCIS et al., 2002; de PRADO et. al., 2020). Estudando flavonoides observou-se ação antioxidante, combatendo radicais livres, atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune, além de ação anti-inflamatória, analgésica, regenerativa de cartilagens, ossos e produzem vasodilatação (CHEN et al., 2005; MENEZES, 2005; FERNANDES JUNIOR et al., 2006; CUNHA, 2022). E aos taninos atribuiu-se ação antibacteriana, ação sobre protozoários, regulação enzimática e proteica, atividade antioxidante, e sequestradora de radicais livres. No processo de cicatrização os taninos auxiliam também formando uma camada protetora sobre tecidos epiteliais lesionados, permitindo que, logo abaixo dessa camada, o processo de reparação tecidual ocorra naturalmente (MELLO e SANTOS, 2010; do NASCIMENTO, 2021).

Diante do exposto, em contribuição aos desafios enfrentados pela saúde pública no Brasil, principalmente pelos custos envolvidos nos tratamentos de lesões cutâneas, o presente trabalho debruçou-se sobre a necessidade de explorar novos fármacos e a oportunidade de investigar o potencial cicatrizante de medicamento fitoterápico a base de folhas de taioba (*Xanthosoma sagittifolium*), seja atuando diretamente no processo cicatricial ou indiretamente auxiliando por meio de propriedades antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante da planta.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade cicatrizante, antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória, *in vitro* e *in vivo*, dos extratos etanólico e hexânico, obtidos de folhas de *Xanthosoma sagittifolium*.

2.2. Objetivos específicos

- Obter os extratos etanólico e hexânico de folhas de *Xanthosoma sagittifolium*
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos, pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em bactérias;
- Avaliar a atividade antioxidante, *in vitro*, dos extratos etanólico e hexânico;
- Determinar a atividade anti-inflamatória, *in vitro*, dos extratos vegetais, etanólico e hexânico;
- Avaliar *in vitro* o efeito dos extratos, etanólico e hexânico, na proliferação e migração celular, com uso de fibroblastos e macrófagos murinos;
- Avaliar o efeito citoprotetor *in vitro* dos extratos, etanólico e hexânico, em culturas de fibroblastos e macrófagos murinos;
- Preparar pomadas contendo duas concentrações (5 e 10%) do extrato com melhor resultado *in vitro*;
- Avaliar a toxicidade dérmica aguda da formulação, de maior concentração (10%), preparada com o extrato de interesse;
- Avaliar o efeito cicatrizante das formulações em modelo *in vivo*, por indução e tratamento de lesões, pela determinação do índice de contração da ferida e análise histomorfométrica de colágeno tipo I e tipo III e celularidade.
- Avaliar o perfil oxidativo tecidual submetido aos tratamentos com as formulações contendo o extrato ativo.
- Avaliação hematológica dos animais após o tratamento com as formulações contendo o extrato ativo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e produção dos extratos

As partes aéreas de *Xanthosoma sagittifolium* foram coletadas em janeiro de 2020 na cidade de Viçosa (20°45'14''S, 42°52'54''W), Minas Gerais (Brasil). O material foi identificado e depositado (voucher nº 56320) no Herbário VIC (Figura 5), localizado no Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

Figura 5 - Exsicata da folha de *Xanthosoma sagittifolium* e identificação da exsicata no herbário da UFV.



Fonte: Autora, 2023.

As folhas foram então lavadas em água corrente e secas em estufa de circulação de ar a 40°C por 72 horas. Depois de triturar as folhas, foram preparados os extratos etanólico e hexânico por maceração de 500g do material vegetal em 2 litros de hexano e etanol 95%, respectivamente, por 48 horas em temperatura ambiente. Tal processo foi repetido até completa extração dos metabólitos da planta. Os extratos foram concentrados por rotaevaporação e em seguida foram liofilizados.

3.2. Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

Os extratos vegetais, etanólico e hexânico, de *Xanthosoma sagittifolium* foram testados frente as cepas de *Escherichia coli* ATCC 29214, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus aureus* ATCC 3008, *Staphylococcus aureus* ATCC 3828, *Staphylococcus aureus* ATCC 3917, *Staphylococcus aureus* ATCC 4157, *Staphylococcus aureus* ATCC 4182, *Salmonella entérica* ATCC 14028, *Enterobacter* ATCC 29004 e *Staphylococcus epidermidis* C213, pelo método do Teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (MACEDO, 2021) .

Os testes se baseiam na metodologia padronizada de microdiluição em caldo, em microplacas de 96 poços (CLSI, 2015). Inicialmente, adicionou-se 100 µL de meio de cultura Mueller Hinton (MH, Himedia®) a cada poço, com exceção do primeiro poço, depois realizou-se a diluição seriada de 200 µL de extrato a 5mg/mL, para isso adicionou-se 200 µL ao primeiro poço, em seguida retirou-se 100 µL desse e adicionou-se ao segundo poço, homogeneizou-se com o meio de cultura presente no poço, e assim sucessivamente, obtendo-se uma série de concentrações de extratos (5mg/mL, 2,5mg/mL, 1,25mg/mL, 0,625mg/mL, 0,3125mg/mL e 0,15625mg/mL). Posteriormente, foi adicionado a cada poço 100 µL de suspensão bacteriana ajustada para concentração final de 1×10^6 UFC/mL.

Como controle negativo foi utilizado o solvente Dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma®), utilizado para solubilizar o extrato, sem extrato e na concentração final de 5% e como controle positivo foi utilizado 10 µL de Cefoperazone (CEFAMIX; SWISSBRAS CHEMICAL LTDA), antibiótico comercial de eficiência comprovada. Depois disso as placas foram mantidas em estufa de crescimento a 37 °C por 24h. Após incubação, para revelação das placas, foram adicionados 20 µL de resazurina (0,5 mg/mL) em cada poço. As microplacas foram então incubadas por mais 2 horas a 37°C.

A determinação da CIM é qualitativa e visual, em poços com bactérias não viáveis permanece a coloração azul e nos poços com bactérias viáveis a coloração se torna de rósea/transparente. Tal mudança de coloração ocorre, pois, a resazurina é um indicador de reação de óxido- redução. A presença de enzimas oxidoredutases dentro das células viáveis faz com que ocorra uma redução da resazurina (azul) a resofurina que apresenta coloração rósea. Posteriormente, esta é reduzida a hidroresofurina que é incolor (SARKER et al., 2007). Considera-se o valor da CIM a

concentração de extrato vegetal no poço com coloração azul seguido por um poço com crescimento bacteriano (rósea/incolor). Os testes foram realizados em triplicata e o resultado final foi a média das replicatas.

3.3. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

3.3.1. Ensaio de captura do radical 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH)

Para avaliação do potencial antioxidante dos extratos etanólico e hexânico de *X. sagittifolium* foi utilizado o método da captura do radical 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) (PIRES, et. al., 2017). Para isso, 4mg dos extratos liofilizados foram ressuspensos em 1mL de metanol, gerando soluções estoque na concentração de 4mg/mL. Foi também preparada, no momento da análise, 100mL de solução de DPPH solubilizado em metanol (0,004% m/v). Em uma placa de 96 poços foram realizadas as diluições seriadas dos extratos (4, 2, 1, 0,5 mg/mL) utilizando a solução estoque previamente preparada. Após a diluição seriada, cada poço ficou com 50µL de extrato na concentração desejada. Em seguida adicionou-se a cada poço, tanto dos tratamentos quanto controles, 250µL da solução de DPPH (0,004% m/v).

Como controle utilizou-se a solução de DPPH, solubilizado em metanol, preparada previamente, sem amostra. Além disso foram utilizados como controle positivo alguns padrões como BHT, ácido ascórbico e rutina, com potencial antioxidante já conhecido, para fins de comparação, para isso foram construídas curvas padrões com as concentrações variando entre 200 – 20 µg/mL de cada um deles. A placa foi então mantida ao abrigo de luz por 30 minutos a temperatura ambiente, e em seguida realizou-se a leitura a 517nm em leitor de microplaca ELISA. A porcentagem de inibição de radicais DPPH foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{\text{Abs do controle (DPPH/metanol)} - \text{Abs do tratamento (extrato/metanol)}}{\text{Abs do controle (DPPH/metanol)}} \right) \times 100$$

3.4. Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro*

3.4.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória por meio da inibição da desnaturação de proteína

Para avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos hexânico e etanólico de *X. sagittifolium* realizou-se inicialmente o ensaio de inibição da desnaturação da albumina sérica bovina (bovine serum albumin (BSA)) (CHANDRA, et. al., 2012), para que se pudesse entender o comportamento dos extratos em relação a este parâmetro.

Para este teste adicionou-se 250 µL de BSA na concentração de 1% e 250µL da solução com o extrato, na concentração desejada, em um tubo de ensaio deixando por 20 minutos em banho maria a 20°C e posteriormente por 10 minutos em banho maria a 72°C. Depois disso, juntou-se ao tubo de ensaio 1mL de tampão fosfato de sódio pH 5,3. E fez-se a leitura da absorbância a 660nm.

Foram testadas as concentrações de 0,01mg/mL, 0,05mg/mL, 0,1mg/mL, 0,5mg/mL, 1mg/mL, 2,5mg/mL e 5mg/mL, dos extratos etanólico e hexânico de *X. sagittifolium*. Para o controle negativo utilizou-se tampão fosfato de sódio pH 5,3 substituindo o volume da amostra, e para o controle positivo foi utilizado o diclofenaco de sódio, medicamento comercial com potencial anti-inflamatório comprovado. Os testes foram realizados em triplicata, e o resultado final foi a média das replicatas.

Para inferir sobre a atividade anti-inflamatória utilizou-se a fórmula a seguir:

$$\text{Inibição da desnaturação de proteína (\%)} = \frac{(\text{Abs controle negativo} - \text{Abs tratamento})}{\text{Abs controle negativo}} \times 100$$

3.4.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS)

Posteriormente, foi realizado o teste *in vitro* para avaliação da atividade anti-inflamatória, com estímulo de LPS (BOTAN, 2018). Para este ensaio as células utilizadas foram de cultura de macrófagos murino, linhagem RAW 264.7. Neste teste foi avaliado os níveis dos subprodutos do óxido nítrico, nitrito e nitrato, produzido pelas células quando estimulados por LPS. As células foram cultivadas em meio de cultura

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB 10%) e 1% de solução de antibiótico e antimicótico (penicilina 10000U, estreptomicina 10000µg e 25 µg de anfotericina B a 37°C sob atmosfera umidificada a 5% de CO₂.

As células estoque foram desprendidas da garrafa com auxílio do rodinho. Uma alíquota da suspensão celular foi contada usando a Câmara de Neubauer e 1x10⁵ células foram transferidas para cada poço da placa de 96 poços, com volume total de 200µL/poço. A placa foi incubada por 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂.

Posteriormente, foi preparada uma solução estoque de LPS (10mg/mL). E em seguida, a partir da solução estoque, preparou-se o LPS (10µg/mL). Os extratos foram solubilizados com esta solução de LPS 10µg/mL, para se obter as concentrações desejadas (400, 200, 100, 50 e 25 µg/mL). Foi removido os 200µL de meio de cultura de cada poço da placa de 96 poços e foi adicionado 200µL em cada poço de acordo com os tratamentos e controles.

Foram utilizados 4 controles neste teste, sendo eles, C1 (DMSO 0,8% em DMEM com LPS 10µg/mL); C2 (dexametasona 200µg/mL em DMEM com LPS 10µg/mL); C3 (DMEM com LPS 10µg/mL) e C4 (DMEM sem LPS 10µg/mL). A placa foi então incubada por 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Passadas as 24 horas, foram transferidos 50µL de sobrenadante de cada poço para uma nova placa de 96 poços e nesta nova placa realizou-se a determinação da quantidade de óxido nítrico.

Para isso, a 50 µL das alíquotas de sobrenadante, em nova placa de 96 poços, adicionou-se 100µL de reagente de Griess (50 µL de Sulfanilamida 1% e 50 µL de Naftil etileno amina dihydrochloride 0,1%, em ácido fosfórico a 2,5%). Após 10 minutos ao abrigo de luz, foi realizada a leitura a 540nm em leitor de microplaca ELISA.

As concentrações de nitrito presente nos sobrenadantes foram determinadas por comparação com a curva-padrão obtida com concentrações molares conhecidas do padrão nitrito de sódio (NaNO₂ 0,025M), variando de 2,5 a 2500 µM. As análises foram realizadas em triplicata, e o resultado foi a média das replicatas.

3.5. Avaliação do efeito cicatrizante *in vitro*

Para avaliação da atividade cicatrizante dos extratos etanólico e hexânico, obtidos a partir das folhas de *X. sagittifolium*, foram realizados três tipos de *ensaios in vitro*. Sendo eles, ensaio de viabilidade celular, para avaliar se os extratos em questão,

inviabilizam de alguma forma as células alvo; ensaio para avaliar o efeito citoprotetor dos extratos, ou seja, para determinar se o extrato em questão produz efeito de proteger as células frente a agente que promova morte celular e, por fim, teste de migração celular, que avalia se o extrato auxilia facilitando e/ou promovendo maior taxa de migração das células alvo.

3.5.1. Ensaios de viabilidade celular

3.5.1.1. Ensaio de viabilidade celular em fibroblasto e macrófagos.

Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizadas uma linhagem de célula de fibroblasto murino (NIH3T3) e uma linhagem de macrófagos RAW 264.7 As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB 10%) e 1% de solução de antibiótico e antimicótico (penicilina 10000U, estreptomicina 10000µg e 25 µg de anfotericina B a 37°C sob atmosfera umidificada a 5% de CO₂.

Para a análise de citotoxicidade foi utilizado o ensaio colorimétrico por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (NEPOMUCENO et al., 2021). Uma alíquota da suspensão celular foi contada usando a Câmara de Neubauer e 2x10⁴ células foram transferidas para cada poço da placa de 96 poços. As células ficaram em repouso de 24 horas a 37°C e 5% de CO₂, para aderirem ao fundo dos poços.

Passadas as 24 horas o meio de cultura foi substituído por 200µL de novo meio contendo 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µg/mL de extrato etanólico e hexânico. Nos poços do controle positivo foram adicionados 200µL de meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% (100% de viabilidade celular). Para o controle negativo, a alguns poços da placa foram adicionados meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10% e DMSO 0,8%. sem células. A placa foi então incubada a 37°C e 5% CO₂, por 22 horas. Depois do período de incubação, retirou-se 50 µL de sobrenadante de cada poço e adicionou-se 50µL de MTT (0,1 mg/mL), e a placa foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 2 horas.

Posteriormente, observou-se a formação de cristais de formazan. Em seguida foi retirado 100µL de sobrenadante de cada poço, com cuidado para não remover os cristais, e adicionou-se 100µL de DMSO a cada poço para diluição dos cristais de

formazan formados. A absorbância foi lida a 570nm em leitor de microplaca ELISA. A viabilidade celular (%) foi determinada usando a seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \left[\frac{\text{Absorbância do grupo tratado}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \right] \times 100$$

3.5.2. Efeito Citoprotetor

Para o ensaio do efeito citoprotetor foram utilizadas linhagem de célula de fibroblasto murino (NIH3T3) e linhagem de célula de macrófago (RAW 264.7). As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB 10%) e 1% de solução de antibiótico e antimicótico (penicilina 10000U, estreptomicina 10000µg e 25 µg de anfotericina B a 37°C sob atmosfera umidificada a 5% de CO₂).

Para a análise de citotoxicidade foi utilizado o ensaio colorimétrico por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (NEPOMUCENO et al., 2021). Uma alíquota da suspensão celular foi contada usando a Câmara de Neubauer e 9x10³ células foram transferidas para cada poço da placa de 96 poços. As células ficaram em repouso de 24 horas a 37°C e 5% de CO₂, para aderirem ao fundo dos poços.

Passadas as 24 horas o meio de cultura foi substituído por 200µL de novo meio contendo 25; 50; 100; 200 e 400 µg/mL de extrato etanólico e hexânico de *X. sagittifolium*. Nos poços do controle positivo foram adicionados 200µL de meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% (100% de viabilidade celular). Para o controle negativo, a alguns poços da placa foram adicionados meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10% e peróxido de hidrogênio 2 mM. A placa foi então incubada a 37°C e 5% CO₂, por 24 horas. Depois do período de incubação, retirou-se os 200µL de sobrenadante de cada poço, inclusive dos controles, com exceção do controle positivo, e adicionou-se 200µL de peróxido de hidrogênio 2 mM. A placa foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 3 horas.

Depois do período de incubação, retirou-se 50 µL de sobrenadante de cada poço e adicionou-se 50µL de MTT (0,1 mg/mL), e a placa foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 2 horas. Posteriormente, observou-se a formação de cristais de formazan.

Em seguida foi retirado 100µL de sobrenadante de cada poço, com cuidado para não remover os cristais, e adicionou-se 100µL de DMSO a cada poço para diluição dos cristais de formazan formados. A absorbância foi lida a 570nm em leitor de microplaca ELISA. A viabilidade celular (%) foi determinada usando a seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \left[\frac{\text{Absorbância do grupo tratado}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \right] \times 100$$

3.5.3. Ensaio de *Scratch* para avaliação do potencial migratório das células

Para o ensaio de *Scratch* foi utilizada uma linhagem de célula de fibroblasto murino (NIH3T3). As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB 10%) e 1% de solução de antibiótico e antimicótico (penicilina 10000U, estreptomicina 10000µg e 25 µg de anfotericina B a 37°C sob atmosfera umidificada a 5% de CO₂. As células estoque foram tripsinizadas. Uma alíquota da suspensão celular foi contada usando a Câmara de Neubauer e 2x10⁵ células foram transferidas para cada poço da placa de 24 poços, o volume final de cada poço foi 500µL. As células ficaram em repouso de 24 horas a 37°C e 5% de CO₂, para aderirem ao fundo dos poços. Passadas as 24 horas o meio de cultura foi removido e utilizando uma ponteira p200 foi feita uma fenda no meio do poço.

Em seguida os poços foram lavados 2 vezes com meio de cultura, DMEM suplementado, para remoção das células que foram deslocadas na confecção da fenda, e em seguida adicionou-se 500µL dos tratamentos com extrato etanólico de *X. sagittifolium* nas concentrações de 200 e 400 µg/mL preparados com meio de cultura DMEM contendo mitomicina C na concentração de 10µg/mL, que inibe a proliferação das células, sendo possível avaliar apenas a migração. Nos poços controle positivo foram adicionados 500µL de meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino 10%, mitomicina C 10µg/mL e para controle negativo foram adicionados 500µL de meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino 10%, mitomicina C 10µg/mL e DMSO 0,8%.

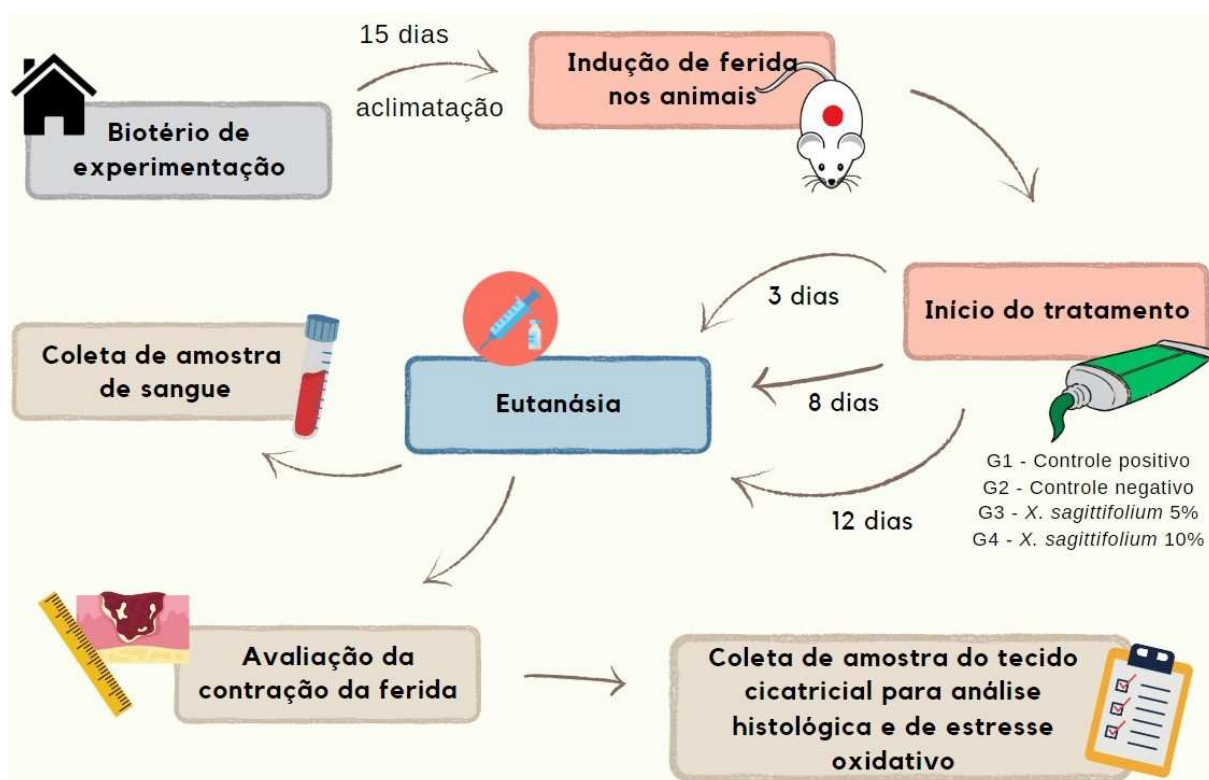
Os poços da placa foram então fotografados (T0), por meio de um microscópio óptico invertido acoplado a câmera fotográfica, e a placa foi incubada a 37°C e 5%

CO₂, após 8 horas e 24 horas os poços foram fotografados novamente, para acompanhar o comportamento das células em relação à fenda produzida. A avaliação do efeito de migração celular foi feita avaliando e comparando o tamanho da fenda em T0, T8 e T24 horas, utilizando o *software* ImageJ, no qual a área da fenda de cada foto, no tempo e campo específico, foi delimitada.

3.6. Avaliação do efeito cicatrizante *in vivo*

Após os testes realizados *in vitro*, tendo sido observado potencial cicatrizante para o extrato etanólico de *Xanthosoma sagittifolium* deu-se início aos testes *in vivo* utilizando duas pomadas em concentrações diferentes do extrato para o tratamento de feridas, por meio da indução de ferida nos camundongos, seguido de aplicação dos tratamentos propostos e coleta dos materiais para análise (Figura 6).

Figura 6 - Etapas do modelo experimental para avaliação do efeito cicatrizante *in vivo*, das pomadas contendo extrato etanólico de *X. sagittifolium* nas concentrações de 5 e 10% (m/m).



Fonte: Autora, 2023.

3.7. Preparo das pomadas

O extrato etanólico preparado a partir das folhas de *X. sagittifolium* foi manipulado para a produção de duas pomadas em concentrações diferentes (5% e 10%). No preparo dessas pomadas foi utilizada uma base de polietilenoglicol (PEG) e glicerina, onde foram incorporados os ativos. A composição foi PEG 4000 33%, glicerina 33% e PEG 400 qsp 100 g.

A pomada Sulfadiazina de Prata foi utilizada como controle positivo por ser um medicamento disponível no mercado com eficácia comprovada para o tratamento de feridas, auxiliando na cicatrização, atuando de forma similar ao objetivo desse estudo. E como controle negativo foi adotado apenas o veículo utilizado para o preparo das pomadas.

3.7.1. Animais

Foram utilizados 84 camundongos (*Mus musculus*), da linhagem Balb-C, machos, adultos jovens, pesando em média 30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Durante o período experimental os animais foram alimentados com ração padronizada comercial, para camundongos, e água “*ad libitum*”. Foram mantidos na sala de experimentação animal do Laboratório Biofármacos, em ambiente climatizado entre 22 e 24°C, com fotoperíodo de 12 horas, em gaiolas de polietileno opaco e fechadas com tampa de aço inoxidável em forma de grade, contendo, em cada uma, 1 (um) animal, higienizadas três vezes por semana. Os animais passaram por um período de adaptação e aclimação ao ambiente de 15 dias, para que fossem reestabelecidas as condições fisiológicas, até que se deu início aos experimentos.

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), protocolo 05/2021. A determinação do número amostral foi baseada no item três da Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004 da ANVISA, que tem por objetivo indicar métodos padronizados para estudos de toxicologia pré-clínica no Brasil que visam no futuro o registro de fitoterápicos, que determina o número mínimo de seis animais por grupo experimental, o que dispensa neste caso, a necessidade do uso de fórmulas estatísticas para obtenção do número da amostra.

3.7.2. Ensaio de Toxicidade Dérmica Aguda

Para avaliar a toxicidade dérmica aguda, 20 animais escolhidos de maneira aleatória foram submetidos ao teste de toxicidade aguda seguindo as diretrizes do “Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos” (ANVISA, 2013). Tal estudo é utilizado para avaliar a toxicidade das substâncias administradas, sendo utilizado, portanto, a pomada manipulada com o extrato etanólico de *X. sagittifolium*.

Os animais foram então divididos em dois grupos, o primeiro grupo com 6 animais que foi tratado com pomada contendo extrato a 10% (maior concentração a ser testada no experimento) e outro grupo com 6 animais que foi tratado apenas com veículo da pomada. Após a tricotomia na região dorsal, os animais receberam aproximadamente 1g da pomada de acordo com tratamento do seu grupo experimental, utilizando técnica asséptica.

Os animais foram observados no primeiro dia de 12 em 12 horas, e do segundo dia em diante uma vez ao dia, por 14 dias, para que fossem avaliadas quaisquer alterações indicativas de reações adversas, fossem elas alterações dermatológicas, neurológicas, ou de comportamento. E foram avaliados baseado na escala de pontos que variaram de 0 a 4, sendo 4 o valor que representa a normalidade (Anvisa, 2013).

3.7.3. Procedimento cirúrgico

Passado o período de aclimação, os animais foram sedados e anestesiados como recomenda Massone (2011), usando xilazina 2% (Anasedan®), 10mg/Kg e cloridrato de quetamina (Dopalen®), 50mg/Kg, adicionados na mesma seringa e administrado por via intraperitoneal. A obtenção da anestesia foi observada pela ausência de reflexo palpebral e redução da frequência cardíaca e respiratória. Uma vez anestesiados, foi realizada a tricotomia do dorso dos animais com auxílio de lâmina de barbear.

Após a tricotomia realizou-se a assepsia com solução de álcool etílico 70% na região tricotomizada. Para padronizar o tamanho da ferida, utilizou-se um tubo de ensaio de 10ml de coletar sangue, devidamente desinfetado, que quando pressionado contra a pele, delimitou uma área aproximada de 1cm². Os cortes foram seccionados

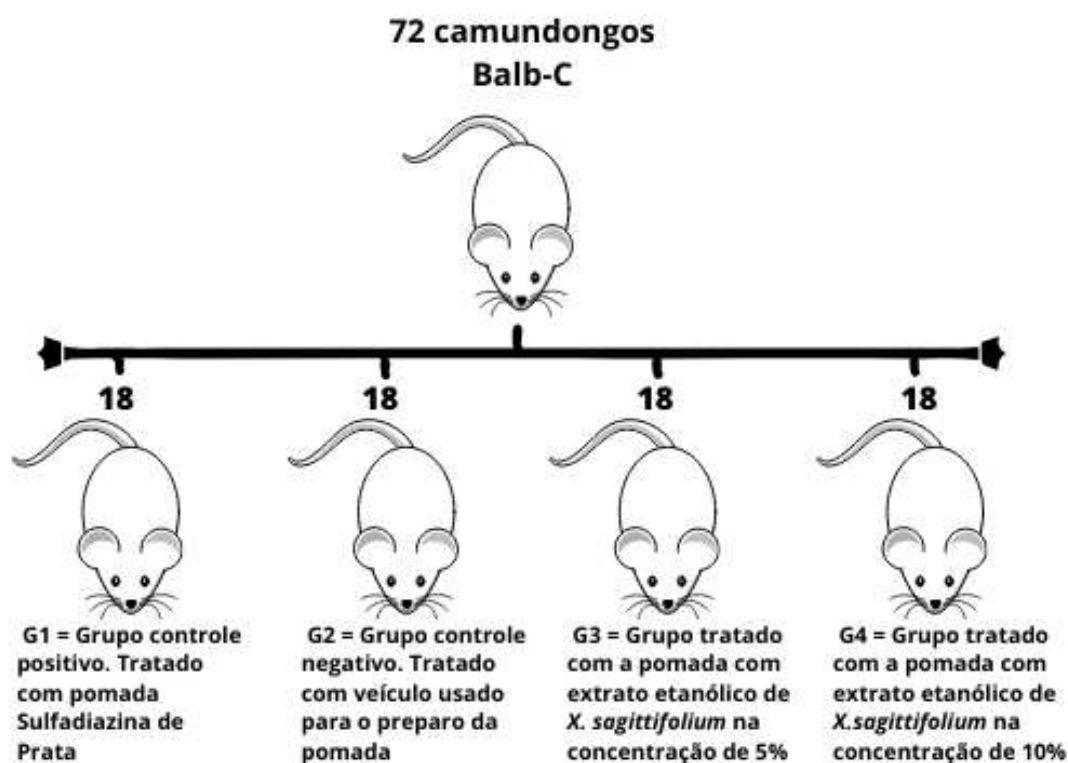
utilizando lâmina de bisturi Nº 11, tesoura curva e pinça anatômica dente de rato, até a exposição da fáscia muscular. Os animais foram distribuídos aleatoriamente e identificados em quatro grupos, entre grupos controles e tratamentos.

3.7.4. Grupos experimentais

Depois da realização das feridas, os 72 animais restantes foram distribuídos de forma aleatória em quatro grupos experimentais com 18 animais cada (Figura 7).

Dentro de cada grupo os animais foram subdivididos em grupos de 6 animais de acordo com o período de observação (3, 8 e 12 dias).

Figura 7 – Divisão dos animais de acordo com o grupo experimental.



Fonte: Autora, 2023.

Os animais receberam, diariamente, em intervalos de 24 horas, o equivalente a 100 mg da formulação de acordo com tratamento do seu grupo experimental. Para isso os animais foram contidos manualmente, sendo segurados pela base da cauda.

3.7.5. Eutanásia

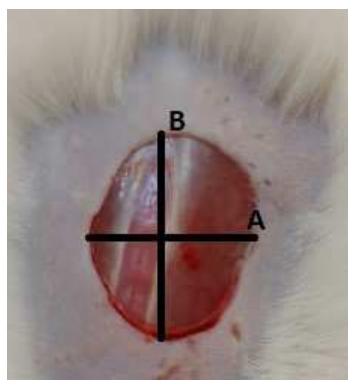
Nos dias determinados, 3, 8 e 12 dias, seis animais de cada grupo foram eutanasiados por exsanguinação com administração de sobredosagem de xilasina 2% e quetamina por via intraperitoneal. Após os animais entrarem em anestesia profunda as feridas tratadas foram fotografadas e medidas com o auxílio de um paquímetro digital no maior e menor eixo. Em seguida coletou-se o tecido cicatricial com margem de 1 cm de pele íntegra em torno da lesão, em profundidade até a fáscia muscular, e foi feita a punção cardíaca da veia cava caudal, a fim de coletar amostras sanguíneas, o que resultou em choque hipovolêmico e morte do animal por exsanguinação (FAVORETTO, SEABRA e OLIVATO, 2019). O método é aceito para uso em roedores sem restrição segundo o Manual de Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA.

Uma parte das amostras teciduais coletadas foram fixadas em solução de Karnovisk e a outra parte foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenados em ultra freezer à temperatura de -80°C até o início das análises.

3.8. Análise macroscópica das feridas

As feridas foram avaliadas pelo Índice de Contração (IC), mensurado no dia 0 e nos dias 3, 8 e 12 após a execução das feridas, as medidas foram feitas com uso de paquímetro digital, em duas direções, segundo metodologia estabelecida por Borges e colaboradores (2016), que recomenda tomar como referência os pontos mais distantes na horizontal e vertical, formando um ângulo de 90° (Figura 8).

Figura 8 - Determinação da área da ferida por meio da medição com paquímetro nos dois sentidos, horizontal e vertical, formando um ângulo de 90° . Sendo A a dimensão horizontal e B a dimensão vertical.



Fonte: Autora, 2023.

Após este procedimento, multiplicou-se os valores encontrados na horizontal e vertical, proporcionando a medida mais próxima ao tamanho real da ferida. Sendo A = área horizontal; B = área vertical. Dessa forma calcula-se a área da ferida em cm² como: Área da ferida = A x B.

A porcentagem de contração da ferida é calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Contração da Ferida} = \frac{\text{área inicial da ferida em cm}^2 - \text{área final da ferida em cm}^2}{\text{área inicial da ferida em cm}^2} \times 100$$

3.9. Análises hematológicas

Com o sangue coletado dos animais, foram realizadas as quantificações de hemoglobina, leucócitos e plaquetas pelo método de impedância. As análises hematológicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas (DNS/UFV).

3.10. Perfil oxidativo tecidual

3.10.1. Preparo do homogenato

Para o preparo do homogenato foram utilizados 150 mg do tecido coletado homogeneizados em tampão fosfato de potássio (pH 7.4) 0.2 M com 1M EDTA por centrifugação a 12000 RPM por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi utilizado na determinação da atividade antioxidante frente aos seguintes marcadores:

3.10.2. Concentração de Malondialdeído (MDA)

A determinação da concentração de MDA se deu por meio do teste de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (KOHN; LIVERSEDGE, 1944). Para isso adicionou-se a um microtubo 200µL de homogenato de tecido e 400µL da solução de TBARS, os microtubos foram agitados em vórtex por 10 segundos e incubados em banho maria por 40 minutos a 90°C. Depois disso as amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos e adicionou-se 600µL de n-butanol a cada microtubo e agitado por 2 minutos em vórtex seguido de centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos a

temperatura ambiente. Depois disso, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante e pipetou-se 200 μ L deste sobrenadante em cada poço da placa e a realizou-se a leitura de absorbância em 540nm. Por meio da curva padrão do reagente 1,1,3,3-Tetramethoxypropane (TMPO) nas concentrações variando de 0 μ M a 4 μ M, foram calculados os valores finais.

3.10.3. Dosagem de óxido nítrico

O nitrito usado como indicador da síntese de NO é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1% de sulfanilamida e 0,1% naftil-etileno-diamina em 2.5% H_3PO_4 . Desta forma, 50 μ L do sobrenadante das amostras foi adicionado em microplacas com 100 μ L do Reativo de Griess e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo da luz, em seguida foi determinada em leitor de microplacas em 570 nm. A concentração do NO das amostras foi determinada utilizando curva padrão com concentrações variando de 2500 μ M a 9,75 μ M de nitrito de sódio.

3.10.4. Atividade de superóxido dismutase (SOD)

Para a determinação da atividade da superóxido dismutase utilizou-se 30 μ L de homogenato da pele por poço da placa de 96 poços destinados a amostra, 30 μ L de tampão fosfato salino (PBS) 0,2 M (pH 8,0) nos poços destinados ao padrão, 45 μ L de tampão fosfato salino (PBS) 0,2 M (pH 8,0) nos poços destinados ao branco. Em seguida a todos os poços adicionou-se 6 μ L MTT (brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol2H]-2,5-difeniltetrazolium) 1,25 mM; 15 μ L de pirogalol; e 99 μ L de tampão fosfato salino (PBS) 0,2 M (pH 8,0). Incubou-se a placa em estufa a 40°C por 15 minutos. Para parar a reação ao final deste tempo, utilizou-se 150 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) em todos os poços. A leitura de absorvância foi de 570 nm.

3.10.5. Atividade de catalase (CAT)

Para a determinação da atividade da catalase, adicionou-se 5 μ L do sobrenadante do homogenato de pele a cada poço destinado as amostras da microplaca de 96 poços, juntamente com 100 μ L de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 20mM. Nos poços destinados ao controle do teste foram adicionados juntamente com

as amostras, 100 µL de tampão de fosfato de sódio e potássio (50 mM, pH 7,4). O branco da amostra foi realizado adicionando apenas 100 µL de tampão de fosfato de sódio e potássio. A curva padrão de peróxido de hidrogênio foi realizada com concentrações variando de 10 mM a 0 mM. Após 3 minutos, foram adicionados em todos os poços 150 µL de molibdato de amônia (32.4 mmol/L). A leitura de absorvância foi realizada em 374 nm.

3.10.6. Quantificação de glutathione S transferase (GST)

Para a análise da concentração de GST foi adicionado em uma cubeta: 970 µL de tampão fosfato pH 7.0, 10 µL de CNDB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene), 10 µL de amostra e 10 µL de GSH reduzida. Foi então feita a leitura (T0) no espectrofotômetro a 340nm. Repetiu-se as leituras nos tempos T30, T60 e T90 minutos. O teste foi realizado em triplicata.

3.10.7. Dosagem de proteínas totais

Utilizou-se o método de Bradford, 1976 para a quantificação de proteínas totais presentes nas amostras do sobrenadante do homogenato, para isso em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 10 µL das amostras previamente diluídas 20 vezes em água destilada. Uma curva padrão foi preparada utilizando 10 µL de albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações variando de 1 mg/mL a 0,008 mg/mL e o branco foi realizado utilizando 10 µL de água destilada. Posteriormente, foram adicionados em todos os poços 150 µL de reagente de Bradford, a placa foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e a leitura foi realizada a 595 nm. Os dados das análises do perfil oxidativo foram normalizados de acordo com os níveis de proteína total no sobrenadante (Bradford MM, 1976).

3.11. Análises histológicas

3.11.1. Avaliação global do tecido

Os fragmentos da ferida coletados e inicialmente fixados em solução de Karnovisk por 24 horas foram posteriormente acondicionadas em álcool 70% até a

confeção das lâminas histológicas. Para a confecção das lâminas, as amostras de pele foram desidratadas em etanol, clareadas em xilol, incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo com 4 µm de espessura. As lâminas foram coradas rotineiramente em Hematoxilina-Eosina (HE) para a avaliação global do tecido, avaliando celularidade.

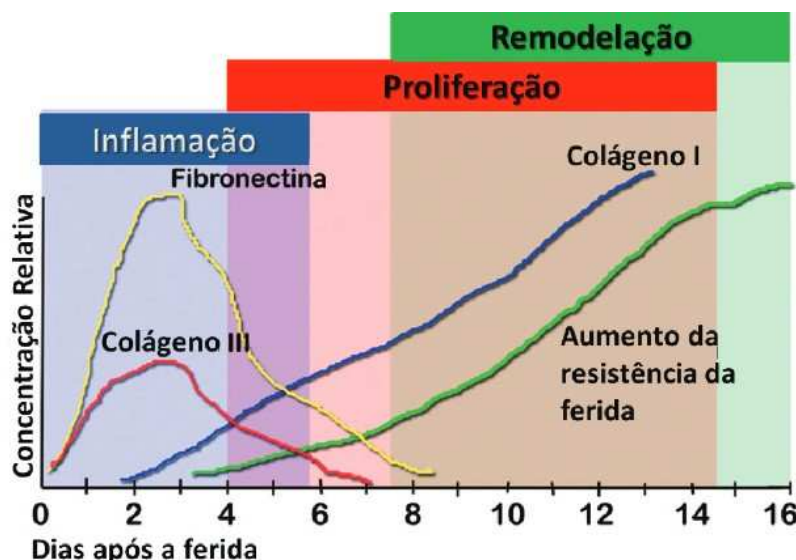
As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Microscópio Leica DM 750 acoplado a uma câmera digital Leica MC 170 HD (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Usando uma lente objetiva de 20X, seis campos de cada lâmina foram fotografados aleatoriamente e submetidos à análise histomorfométrica. Para esta análise, uma grade contendo 300 pontos dentro de uma área padrão, foi sobreposta a cada imagem contando-se os pontos de intercessão que estavam sobre núcleos celulares utilizando o *software* ImageJ.

3.11.2. Análise de Colágeno

Para a quantificação das fibras colágenas maduras (tipo I) e imaturas (tipo III), as lâminas foram coradas com Picrosirius-Red. As imagens foram capturadas por câmera fotográfica acoplada a Microscópio de luz e analisadas pelo software ImageJ, com base no sistema RGB (Red, Green and Blue) considerando-se tons de vermelho e laranja, o colágeno maduro (tipo I), e tons de verde, o colágeno imaturo (tipo III), outras cores foram consideradas áreas vazias. Em cada campo analisado foi calculada a área ocupada por colágeno maduro e imaturo, desconsiderando as áreas escuras e de outras tonalidades.

De maneira geral, observa-se o seguinte padrão (Figura 9) quanto a concentração de fibras colágenas tipo III e tipo I no decorrer das etapas do processo cicatricial.

Figura 9 – Concentração de fibras colágenas no decorrer das fases do processo cicatricial. (Adaptado de ISAAC et. al., 2010).



Fonte: Autora, 2023.

3.12. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

O perfil do extrato etanólico de *Xanthosoma sagittifolium* foi analisado através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O extrato foi preparado na concentração de 5 mg/mL utilizando como solvente etanol. A amostra foi filtrada com o auxílio de seringas descartáveis (3 mL) e filtros *milipore* (20 µm). O volume da primeira passagem no filtro foi descartado e o restante foi transferido para *vials* (1,5 mL), que foi então injetado em um aparelho da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Ultra, com coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30cm; 0,25mm de diâmetro interno; filme de 0,25 µm) e hélio como gás de arraste. A injeção ocorreu no modo split (razão 1:10). A temperatura do injetor e da fonte foi de 290 °C. Para a coluna, a temperatura inicial foi de 80 °C por 5 minutos, aumentando até 285 °C, com taxa de 4°C/minutos e permanecendo nesta temperatura durante 40 minutos. A temperatura na interface do sistema foi de 290 °C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 35 a 700 Da.

A identificação dos compostos presentes no extrato foi realizada através de comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles existentes no banco de dados do aparelho e com os dados da literatura.

3.13. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o sistema de software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, Calif., USA). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Os resultados obtidos por cada grupo foram comparados com o grupo controle através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Atividade antibacteriana

A avaliação da capacidade antibacteriana dos extratos etanólico e hexânico de *Xanthosoma sagittifolium* foi realizada por meio do teste da concentração inibitória mínima (CIM), que se baseia em determinar qual a menor concentração de extrato necessária para que se iniba, de forma significativa, o crescimento bacteriano, de forma que quanto menor for este valor de concentração, maior é o potencial antibacteriano. De acordo com Lamounier e colaboradores (2012) concentrações abaixo de 1mg/mL podem ser consideradas relevantes e valores de concentração inferiores a 0,1mg/mL são considerados inibidores do crescimento bacteriano de altíssimo potencial, quando falamos de extratos brutos de plantas.

Na Tabela 1, tem-se os valores de concentração inibitória mínima para os extratos etanólico e hexânico de *X. sagittifolium*, frente às bactérias, gram-positivas e gram-negativas, selecionadas para o ensaio.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL) dos EHXS* e EEXS*

Bactéria	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL)		
	EHXS*	EEXS**	Controle positivo***
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	5,000	5,000	0,006
<i>E. coli</i> ATCC 29214	5,000	5,000	0,025
<i>Enterobacter</i> ATCC 29004	5,000	5,000	0,013
<i>S. aureus</i> 3008	1,250	0,315	0,008
<i>S. aureus</i> 3828	2,500	0,625	0,013
<i>S. aureus</i> 3917	2,500	0,315	0,008
<i>S. aureus</i> 4157	5,000	0,625	0,013
<i>S. aureus</i> 4182	2,500	0,625	0,025
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	5,000	5,000	0,008
<i>S. enterica</i> ATCC 14028	5,000	5,000	0,013
<i>S. epidermidis</i> C213	5,000	1,250	0,002

*extrato hexânico de *X. sagittifolium*; ** extrato etanólico de *X. sagittifolium*; *** antibiótico

Fonte: Autora, 2023.

Segundo Rozatto (2012) e Aligiannis e colaboradores (2001) ao avaliarmos o potencial antibacteriano de extratos brutos de plantas, valores de CIM acima de 1,6mg/mL considera-se como um extrato com atividade inibitória fraca, para valores de CIM entre 0,6 e 1,5mg/mL considera-se como tendo uma atividade inibitória moderada e para valores $\leq 0,5$ mg/mL considera-se que o extrato em questão apresenta forte atividade antibacteriana. Já no trabalho de Webster e colaboradores (2008) foi proposto que um valor de CIM ≤ 1 mg/mL já deve ser considerado satisfatório. Dito isto e avaliando os valores demonstrados na Tabela 1, o extrato hexânico de *X. sagittifolium* apresentou atividade antibacteriana moderada apenas para a cepa de *S. aureus* 3008, e atividade antibacteriana fraca para as demais cepas. Já o extrato etanólico de *X. sagittifolium* apresentou forte atividade antibacteriana para cepas de *S. aureus* 3008 e *S. aureus* 3917, atividade antibacteriana moderada para cepas de *S. aureus* 3828, *S. aureus* 4157, *S. aureus* 4182 e *S. epidermidis* C213, para as demais cepas a atividade antibacteriana foi fraca.

4.2. Avaliação do potencial anti-inflamatório dos extratos *in vitro*

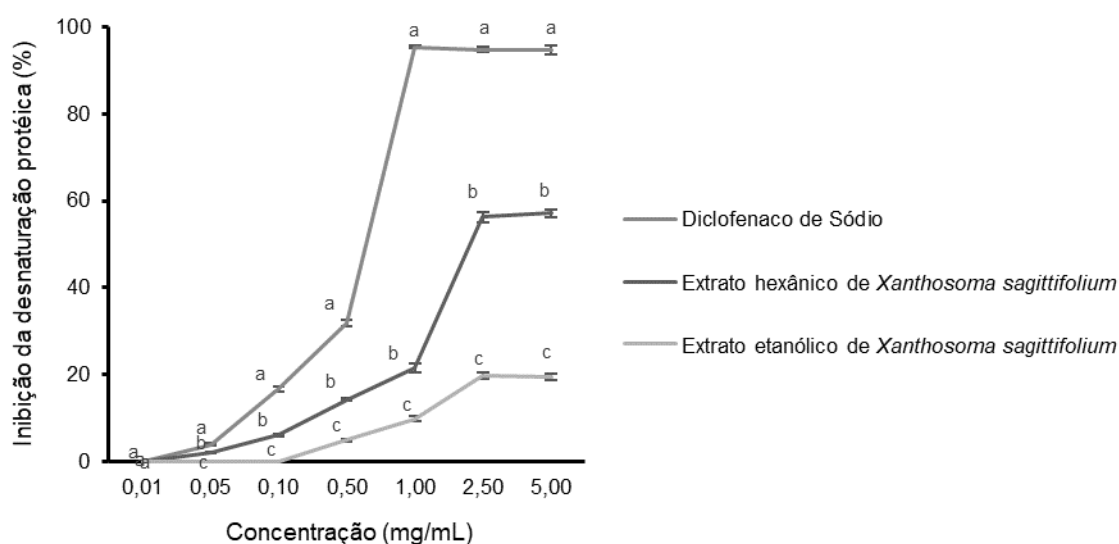
4.2.1. Inibição de Desnaturação Proteica

O ensaio para rastrear o potencial anti-inflamatório dos extratos, por meio da avaliação da inibição da desnaturação proteica, baseia-se no fato de que durante a resposta inflamatória, ocorre desnaturação de proteínas. Tal fenômeno decorre do aumento da temperatura local, o que pode resultar na desnaturação de proteínas e enzimas (REGO, 2012). É sabido que alguns agentes anti-inflamatórios como ácido acetilsalicílico, diclofenaco sódico, dentre outros, tem a capacidade de inibir a desnaturação das proteínas durante o processo inflamatório (CHOPAIDE et al., 2012, SAKAT et al., 2010).

Sendo assim, sabendo que a albumina é uma proteína que desnatura na presença de altas temperaturas, o extrato que consegue inibir sua desnaturação, nessas condições, pode ser considerado como que possua efeito anti-inflamatório (LEELAPRAKASH e DASS, 2011). Dessa forma, a desnaturação da albumina foi evidenciada pelo aumento da turbidez do meio após o aquecimento, sendo mensurada por meio do espectrofotômetro a 660nm.

Como droga padrão, foi utilizado o diclofenaco de sódio, que pela tendência do gráfico (Figura 10), atua de forma dose-dependente, uma vez que à medida que se aumentou a concentração, a capacidade inibitória da desnaturação também aumentou, até atingir um platô de valor máximo, na concentração de 1mg/mL de diclofenaco de sódio ponto onde a inibição da desnaturação foi de 95,3%, que se manteve, mesmo em concentrações superiores, sem alterações estatisticamente significativas.

Figura 10 - Inibição da desnaturação proteica em porcentagem. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2023.

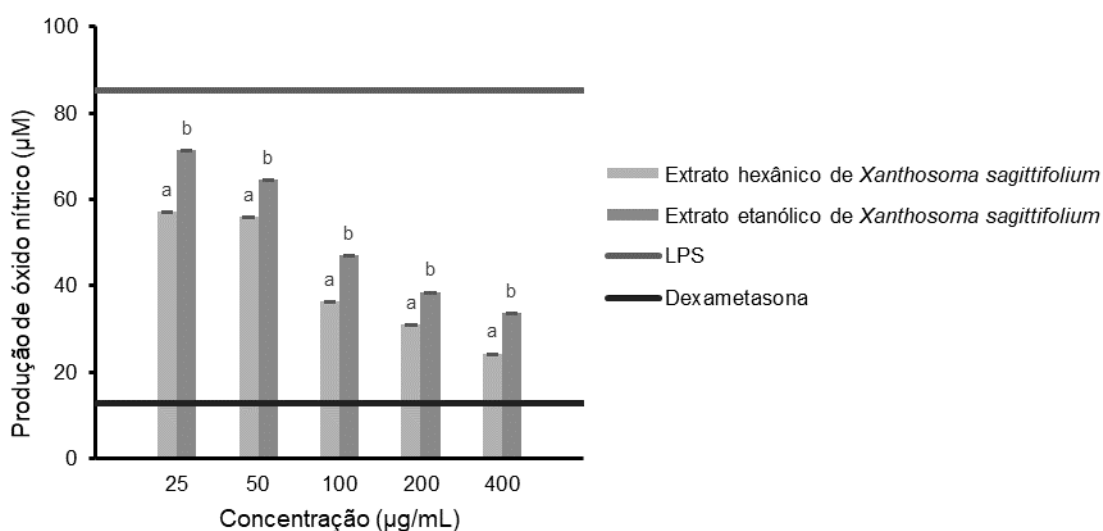
Em relação aos extratos avaliados, pode-se observar que estes também atuaram de maneira dose dependente, aumentando a porcentagem de inibição, à medida que a concentração aumentou, atingindo o valor máximo inibitório seguido do platô, onde se manteve o valor mesmo aumentando a concentração, sem que se observasse alterações estatisticamente significativas, para ambos extratos na concentração de 2,5mg/mL, sendo o extrato hexânico mais efetivo para controle da desnaturação uma vez que foi capaz de proteger a albumina da desnaturação em 56,3%. Já o extrato etanólico na mesma concentração de 2,5mg/mL inibiu apenas 19,7% da desnaturação.

4.2.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS)

O lipopolissacarídeo (LPS), molécula que está presente na membrana celular de bactérias gram-negativas, é uma molécula pró-inflamatória uma vez que ao se ligar aos receptores TLR-4 (Toll-like receptor 4), um receptor importante na resposta imune inata, ativa vias de sinalização que aumentam a produção e secreção de moléculas pró-inflamatórias.

Na análise realizada, foi quantificado os subprodutos do óxido nítrico, uma molécula pró inflamatória, produzida a partir do contato das células de macrófagos com o LPS. Avaliou-se a produção do óxido nítrico na presença dos extratos avaliados em diferentes concentrações (25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL), como forma de observar se os extratos inibiam a produção de óxido nítrico pelas células, e em qual concentração isso ocorre, demonstrando então efeito anti-inflamatório. Além disso, foi utilizado como controle positivo o medicamento anti-inflamatório, amplamente utilizado, dexametasona na concentração de 200µg/mL E como controle negativo, utilizou-se apenas o LPS na concentração de 10µg/mL (Figura 11).

Figura 11 - Produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS 10µg/mL (controle negativo), Dexametasona 200µg/mL (controle positivo), extrato hexânico de *Xanthosoma sagittifolium* e extrato etanólico de *Xanthosoma sagittifolium*. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2023.

Quando em contato apenas com o LPS 10µg/mL, observa-se alta produção de óxido nítrico pelas células, e quando além do contato com o LPS 10µg/mL, as células foram tratadas com a dexametasona 200µg/mL, observou-se uma redução de 84,9% nos níveis de óxido nítrico, sendo esta uma diminuição significativa. Avaliando os resultados obtidos com os tratamentos utilizando os extratos, observa-se que quanto maior a concentração dos extratos, tanto hexânico quanto etanólico, menor foi a produção de óxido nítrico pelas células, atuando assim de forma dose dependente.

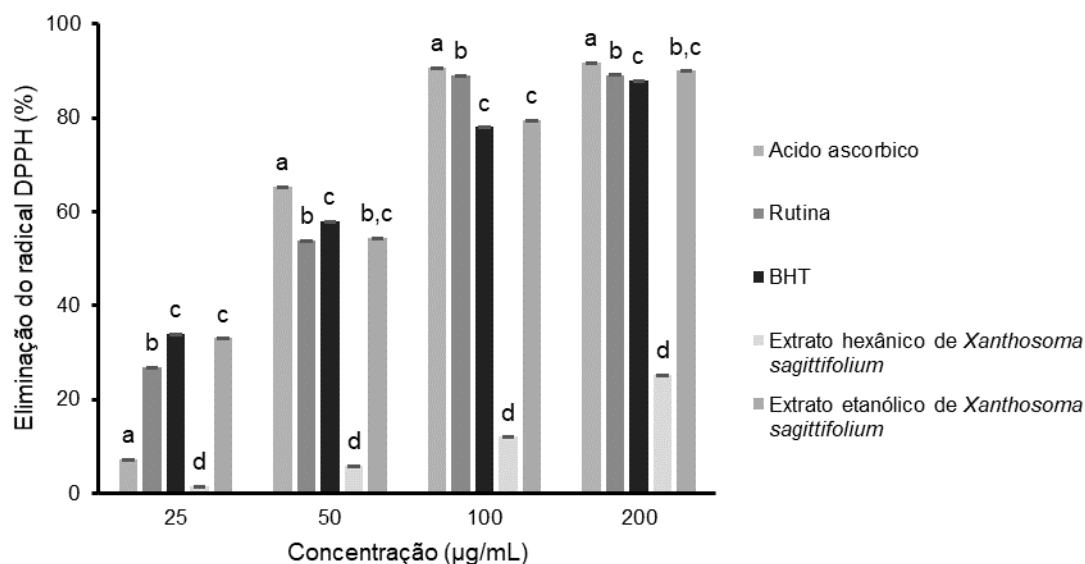
Observa-se também que o extrato hexânico, se comparado ao extrato etanólico, apresentou maior potencial anti-inflamatório, uma vez que a produção de óxido nítrico foi menor nas células tratadas com o extrato hexânico, para todas as concentrações avaliadas. E na maior concentração testada (400µg/mL) observou-se redução de 71,4% da produção de óxido nítrico pelas células tratadas com o extrato hexânico, enquanto para as células tratadas com o extrato etanólico a redução foi de 60,4%, na mesma concentração.

4.3. Potencial antioxidante *in vitro* dos pelo ensaio de DPPH

O método de avaliação do potencial antioxidante dos extratos por sequestro do radical DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por outros radicais, elétrons ou átomos de hidrogênio presente nos extratos, levando a uma perda de coloração, da solução, no comprimento de onda de 515 nm. Quando se observa menor leitura de absorbância quer dizer que o DPPH reagiu com a amostra vegetal, indicando a presença de compostos com atividade de captura de radicais livres, ou seja, presença de compostos com atividade antioxidante. Dessa forma quanto maior for o potencial antioxidante de determinada substância ou concentração, observa-se uma menor leitura de absorbância a 515 nm, e consequentemente um aumento da porcentagem na capacidade de eliminação do radical DPPH.

Para este ensaio foram utilizadas diferentes concentrações dos extratos hexânico e etanólico de *X. sagittifolium* (25, 50, 100 e 200µg/mL) bem como dos padrões que atuaram como controles uma vez que possuem atividade antioxidante conhecida, foram eles o ácido ascórbico, a rutina e o BHT (2,6-di terc-butil-p-cresol). Os percentuais de eliminação do radical DPPH podem ser observados na Figura 12.

Figura 12 - Eliminação do radical DPPH em porcentagem. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2023.

Observando os valores obtidos, temos que o extrato hexânico apresentou baixa capacidade de eliminação de radicais DPPH, demonstrando dessa forma, possuir baixa atividade antioxidante quando comparada aos padrões e ao extrato etanólico, em todas as concentrações testadas, mesmo nas maiores.

Já o extrato etanólico, vemos que para todas as concentrações testadas foi igual ou superior a pelo menos um dos padrões, na concentração de 25µg/mL apresentou maior capacidade de eliminação do radical DPPH e consequentemente maior poder antioxidante que os controles de ácido ascórbico e rutina, e atividade estatisticamente igual ao BHT. Na concentração de 50µg/mL, o extrato etanólico apresentou atividade estatisticamente igual a rutina e ao BHT. Já na concentração de 100µg/mL, sua atividade foi estatisticamente semelhante ao BHT e em 200µg/mL, atuou de forma estatisticamente igual a rutina e ao BHT.

4.4. Atividade cicatrizante *in vitro* e *in vivo*

4.4.1. Efeito dos extratos na proliferação celular *in vitro*

Avaliou-se a citotoxicidade dos extratos e a proliferação celular, por meio do teste de viabilidade celular em células de fibroblasto murino NIH/3T3 e macrófagos RAW 264.7 (Figura 13 e Figura 14).

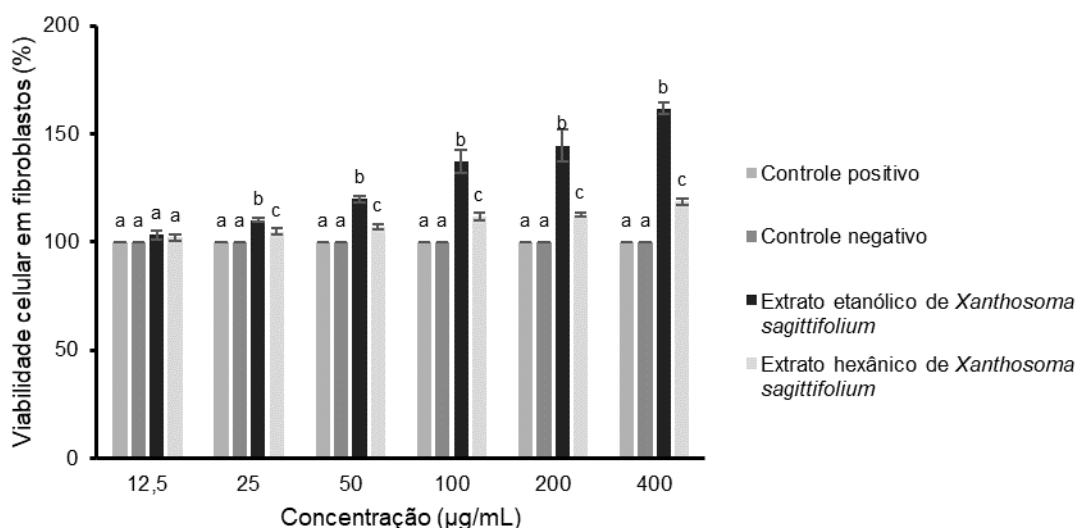
Neste teste, foi possível confirmar, por meio da comparação dos controles, que o DMSO a 0,8%, utilizado para solubilizar os extratos, não causa prejuízos às células, uma vez que a porcentagem de células viáveis foi estatisticamente igual para os dois controles, com e sem DMSO 0,8%.

Para ambos os tipos celulares, os extratos testados não demonstraram apresentar citotoxicidade, uma vez que para todas as concentrações testadas a porcentagem de viabilidade celular foi igual ou superior aos controles.

Na menor concentração avaliada (25 µg/mL), os extratos demonstraram taxa de proliferação celular estatisticamente iguais aos controles, para os dois tipos celulares. Nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 µg/mL, a taxa de proliferação celular foi maior para as células tratadas com os extratos testados, quando comparada às tratadas com os controles, para os dois tipos celulares avaliados.

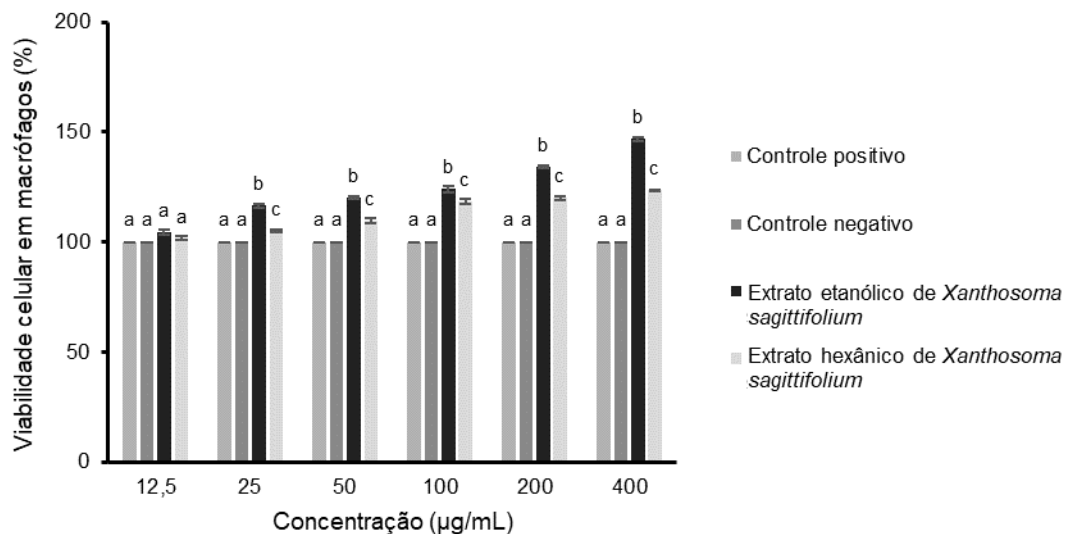
Comparando os dois extratos testados, observou-se uma maior taxa de proliferação celular quando utilizado o extrato etanólico de *Xanthosoma sagittifolium*, para os dois tipos celulares avaliados. Em fibroblastos, quando na maior concentração (400 µg/mL) apresentou 162% de viabilidade celular, contra 118% de viabilidade celular quando se utilizou o extrato hexânico da mesma planta. E em macrófagos, na mesma concentração (400 µg/mL) a taxa de viabilidade celular foi de 147% para o tratamento com extrato etanólico, versus 123% do tratamento com extrato hexânico.

Figura 13 - Porcentagem de viabilidade celular em fibroblastos NIH/3T3. Controle positivo: meio de cultura + células. Controle negativo: células tratadas com DMSO 0,8%. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2023.

Figura 14 - Porcentagem de viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7. Controle positivo: meio de cultura + células. Controle negativo: células tratadas com DMSO 0,8%. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



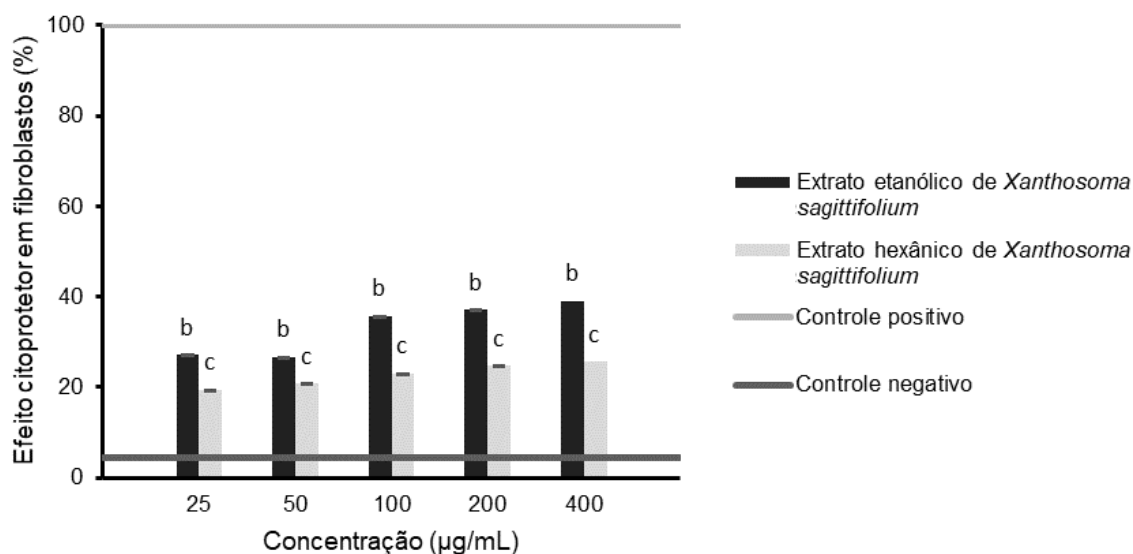
Fonte: Autora, 2023.

4.4.2. Efeito citoprotetor *in vitro*

Avaliou-se os extratos hexânico e etanólico, em diferentes concentrações (25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL), quanto a capacidade de protegerem as células de fibroblastos NIH/3T3 e macrófagos RAW 264.7 da morte celular quando em contato com peróxido de hidrogênio 2mM, cuja concentração ocasiona morte celular (4,3% de viabilidade celular) (Figura 15 e Figura 16).

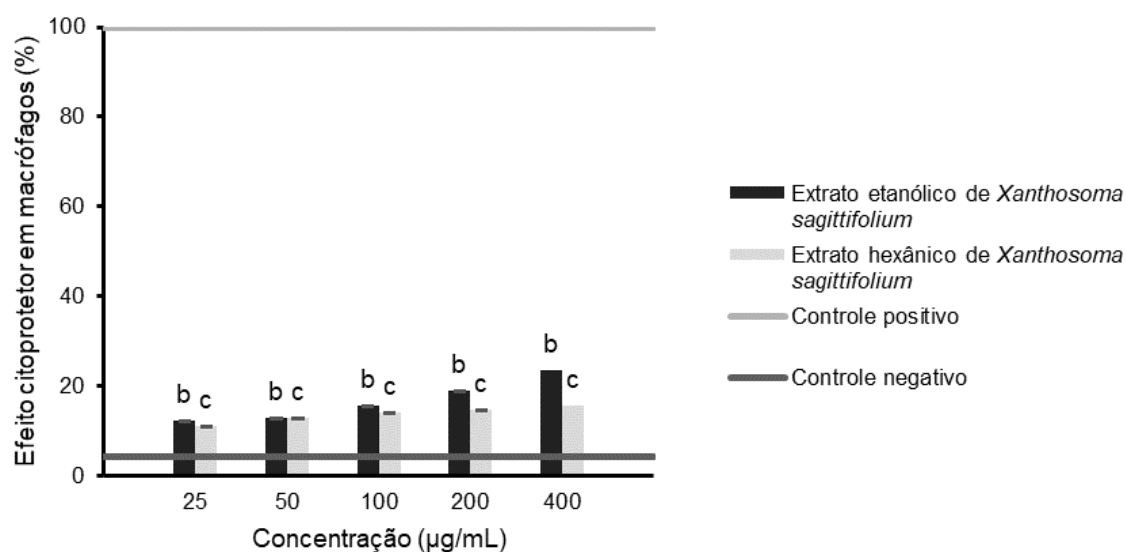
Observou-se que tanto para fibroblastos quanto para macrófagos ambos os extratos apresentaram baixo efeito citoprotetor. Comparativamente entre os dois extratos, o etanólico apresentou maior atividade citoprotetora para os dois tipos celulares, apresentando 39% de efeito citoprotetor em fibroblastos e 23% em macrófagos, quando na maior concentração (400 µg/mL).

Figura 15 - Efeito citoprotetor (%) em fibroblastos NIH/3T3. Controle positivo: células + meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10%, sem tratamento com peróxido de hidrogênio. Controle negativo: células + meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10% + peróxido de hidrogênio 2mM. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2023.

Figura 16 - Efeito citoprotetor (%) em macrófagos RAW 264.7. Controle positivo: células + meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10%, sem tratamento com peróxido de hidrogênio. Controle negativo: células + meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10% + peróxido de hidrogênio 2mM. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



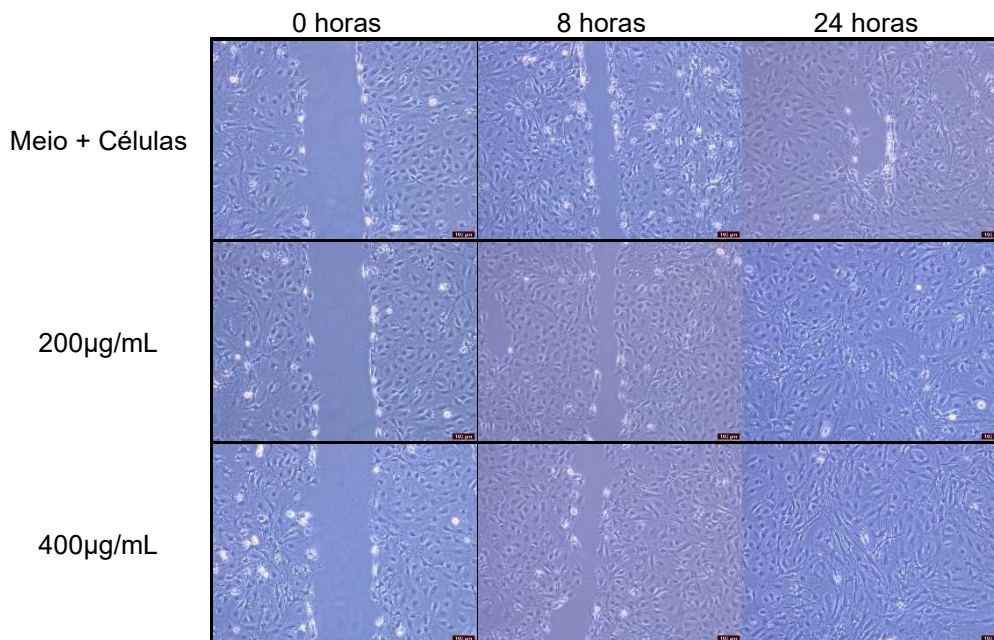
Fonte: Autora, 2023.

4.4.3. Potencial cicatrizante *in vitro* por ensaio de *Scratch*

Quando comparado ao extrato hexânico, o extrato etanólico apresentou maior atividade antioxidante, maior taxa de proliferação celular e maior capacidade de citoproteção, nos testes *in vitro*. Sendo assim, determinou-se seguir os ensaios seguintes apenas com o extrato etanólico. Realizou-se então o teste de *Scratch* e posteriormente os testes *in vivo*.

No teste de *Scratch* avaliou-se a taxa de migração celular, característica importante na cicatrização de feridas. Para isso, utilizou-se o extrato etanólico nas concentrações de 200 e 400µg/mL, em fibroblastos NIH/3T3 quando em meio de cultura acrescido de mitomicina c, sendo este um agente inibidor da proliferação celular (Figura 17 e Figura 18).

Figura 17 - Migração celular de fibroblastos NIH/3T3. Controle positivo: meio de cultura + células + mitomicina C. Efeito dos tratamentos com extrato etanólico de *Xanthosoma sagittifolium* nas concentrações de 200 e 400µg/mL. Os resultados apresentam a média $\pm$ desvio padrão e letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

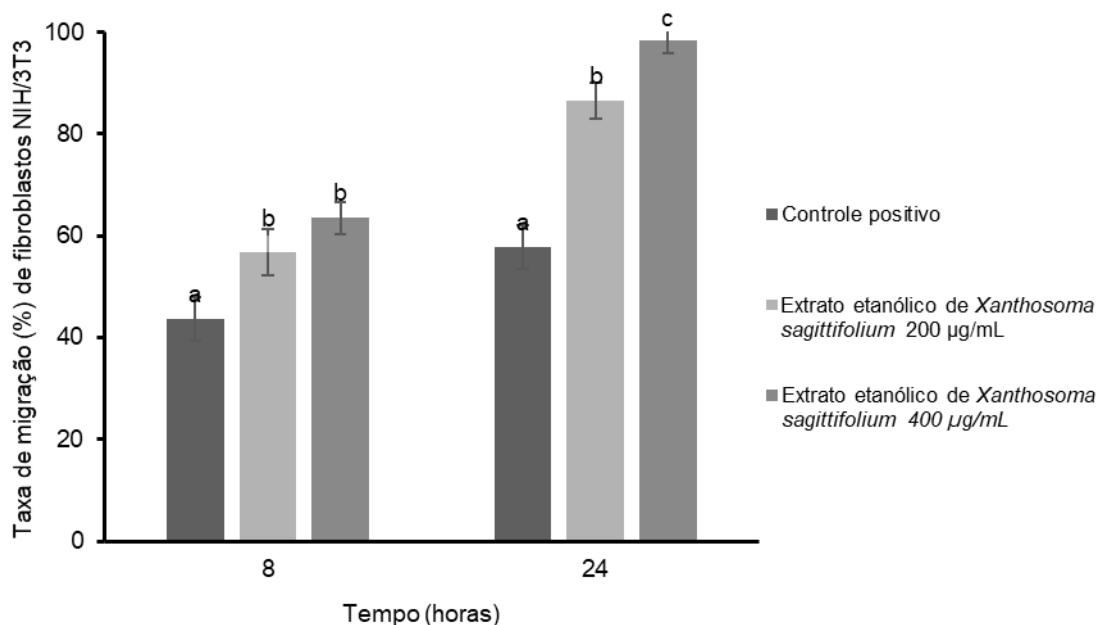


Fonte: Autora, 2023.

Como pode-se observar na Figura 18, a taxa de migração de fibroblastos foi maior nas células tratadas com o extrato etanólico de *X. sagittifolium*, quando comparadas ao controle. Observa-se que após 8 horas, as taxas de migração dos

tratamentos diferem estatisticamente do controle, porém não diferem estatisticamente entre si.

Figura 18 - Taxa de migração dos fibroblastos NIH/3T3, submetidos ao tratamento com extrato etanólico de *Xanthosoma sagittifolium* nas concentrações de 200 e 400µg/mL e para o controle: meio de cultura + células + mitomicina C, nos tempos 8 e 24 horas. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2023.

Já após 24 horas de tratamento, nas células tratadas com o extrato na maior concentração (400µg/mL), observa-se maior taxa de migração quando comparado com a taxa de migração das células tratadas com o extrato a 200µg/mL, observando o fechamento da fenda em 98,43% e 86,32%, respectivamente.

4.4.4. Toxicidade dérmica aguda

A avaliação da toxicidade dérmica aguda pelo uso tópico da pomada à base do extrato etanólico de *Xanthosoma sagittifolium* na concentração de 10%, em quantidade equivalente a 10 vezes a dose usual, não demonstrou, após observação pelos 14 dias subsequentes, nenhuma reação adversa (Tabela 2), seja ela na pele do camundongo, como irritação, edema, prurido e eritema, também não foram observados sinais de toxicidade ou alterações comportamentais, como tremores,

diarreia, convulsões e problemas de locomoção, quando comparados aos animais do grupo controle.

Tabela 2 - Estudo de toxicidade de dose única (aguda) da pomada contendo extrato etanólico de *Xanthosoma sagittifolium* na concentração de 10%.

Toxicidade	12h*	24h*
Cianose, ptose, tremor vocal	4	4
Diarreia, salivação, lacrimejamento	4	4
Excitabilidade do sistema nervoso	4	4
frequência respiratória e cardíaca	4	4
Hipnose, convulsões, ataxia	4	4
Irritabilidade, autolimpeza, piloereção	4	4
Locomoção	4	4
Micção, defecação e morte	4	4
Mudança no tônus muscular	4	4
Ronco e chiado	4	4
Tremores, contorções abdominais	4	4

*valores variando de 0 a 4, sendo 4 o valor que representa a normalidade de acordo com o “Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos”

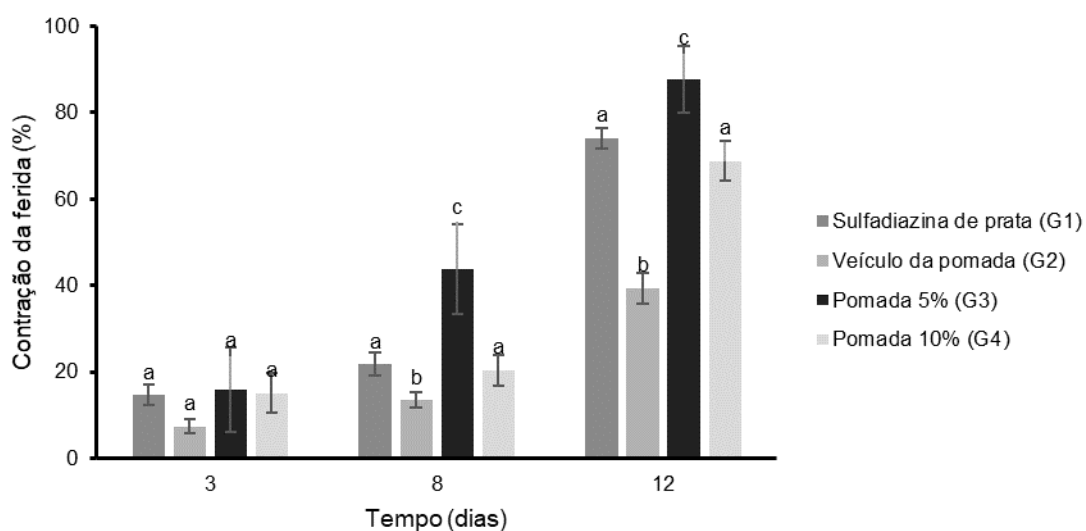
Fonte: Anvisa, 2013.

4.4.5. Índice de contração da ferida

A avaliação da contração da ferida se deu nos dias 3, 8 e 12, e o índice de contração das feridas foi calculado após determinação da área inicial da ferida medido no dia do procedimento e da área final da ferida em 3, 8 ou 12 dias pós procedimento (Figura 19 e Figura 20).

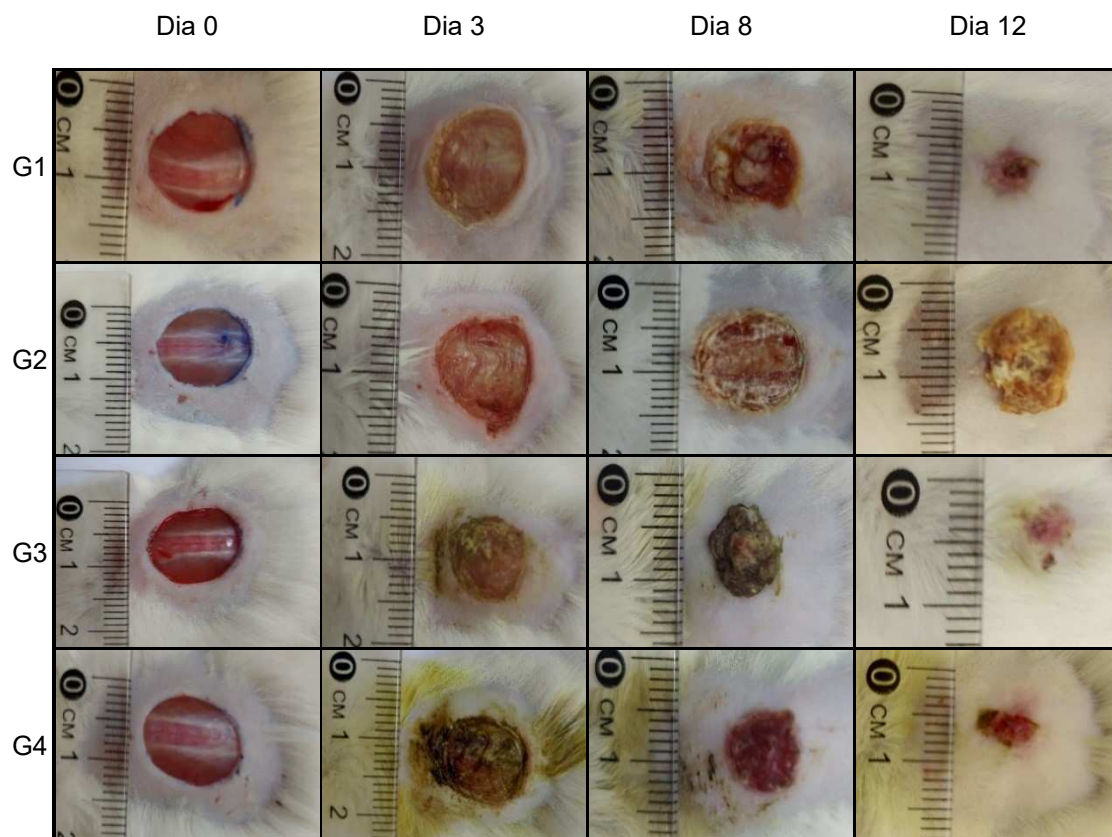
Foram avaliados os grupos controle positivo, onde os animais receberam a pomada comercial sulfadiazina de prata (G1), controle negativo em que os animais receberam o veículo da pomada (G2), grupo tratado com pomada na concentração de 5% (G3) e grupo tratado com pomada na concentração de 10% do extrato etanólico de *X. sagittifolium* (G4).

Figura 19 - Índice de contração das feridas (%), nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2023.

Figura 20 - Cicatrização das feridas induzidas em camundongos, nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. G1 - Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata; G2 - Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada; G3 - Grupo tratamento pomada 5%; G4 - Grupo tratamento pomada 10%.



Fonte: Autora, 2023.

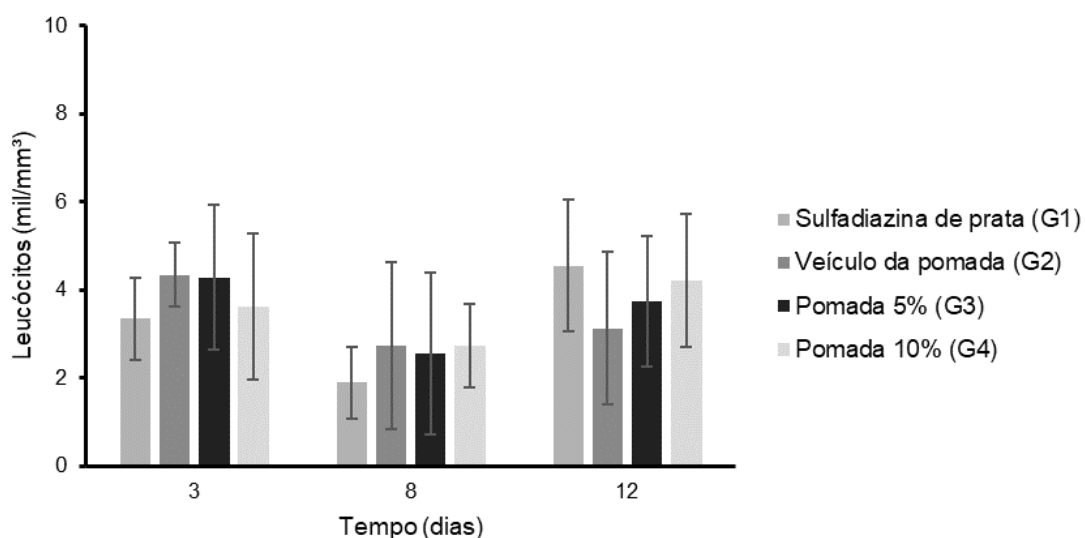
Observou-se que após 3 dias não houve diferença estatística no índice de contração das feridas quando comparados os animais dos grupos controle e tratamentos. Após 8 dias, observou-se que a contração das feridas dos animais tratados com a pomada na concentração de 5% foi superior aos demais grupos (44%), inclusive superior ao controle positivo de sulfadiazina de prata (21%). Para os animais tratados com a pomada na concentração de 10%, após oito dias o índice de contração da ferida foi estatisticamente igual ao valor do controle positivo.

Após 12 dias os animais que receberam o tratamento com a pomada na concentração de 10% do extrato etanólico de *X.sagittifolium*, continuou a apresentar valor estatisticamente igual ao percentual da contração da ferida dos animais tratados com a pomada comercial sulfadiazina de prata. E para esse mesmo período, a pomada na concentração de 5% apresentou índice de contração da ferida, superior a todos os demais grupos (88%) inclusive ao controle positivo (74%).

4.4.6. Análises hematológicas

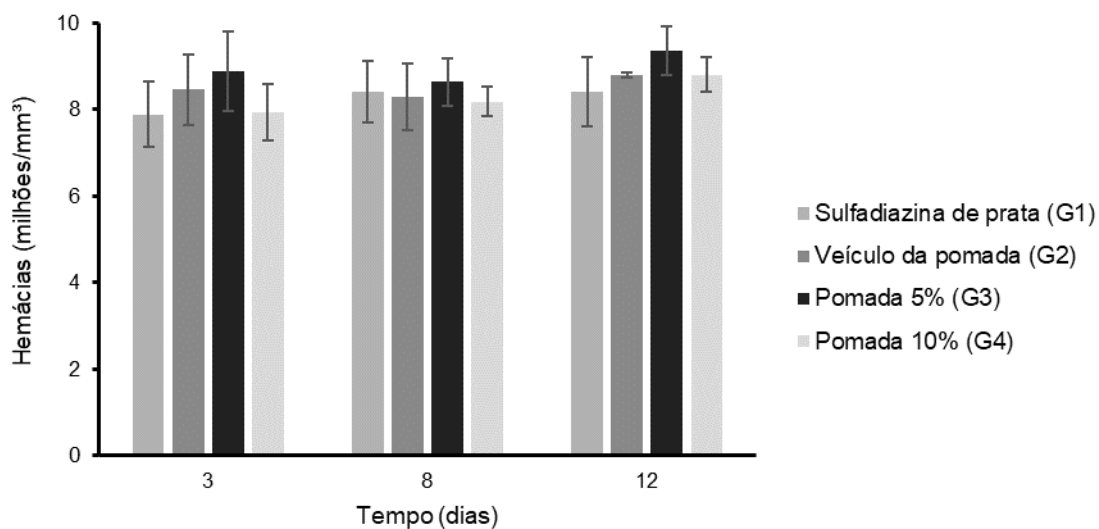
As análises hematológicas realizadas com o sangue coletado dos animais em 3, 8 e 12 dias, após a indução das feridas, demonstraram que não houveram diferenças significativas na quantificação de leucócitos (Figura 21), hemácias (Figura 22) e plaquetas (Figura 23), quando comparados os animais dos grupos tratados com o extrato etanólico de *X. sagittifolium* e os grupos controle, para cada período de tempo.

Figura 21 - Análise hematológica de Leucócitos (mil/ mm³) do G1 - Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



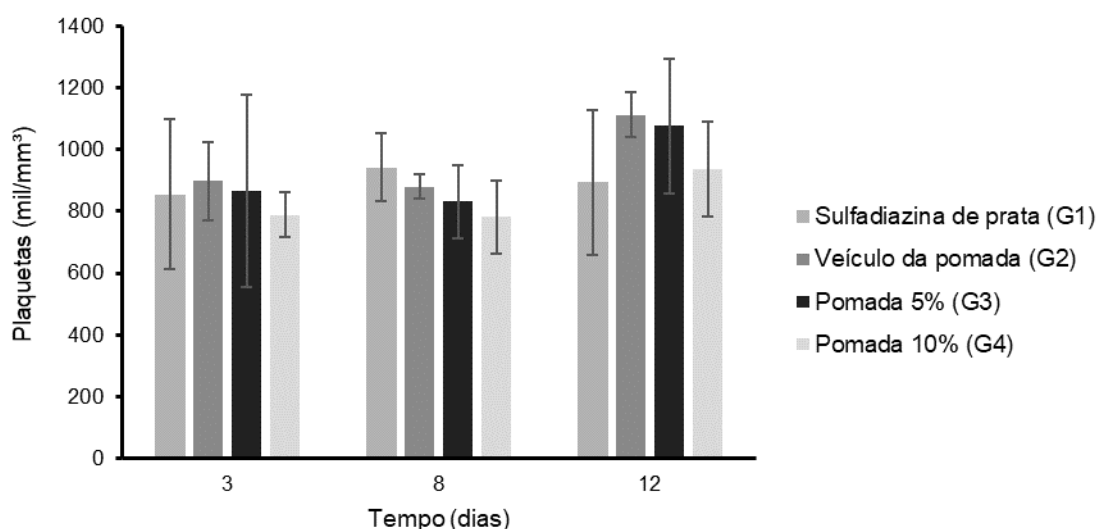
Fonte: Autora, 2023.

Figura 22 - Análise hematológica de Hemácias (milhões/mm³) do G1 - Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2023.

Figura 23 - Análise hematológica de Plaquetas (mil/mm³) do G1 - Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



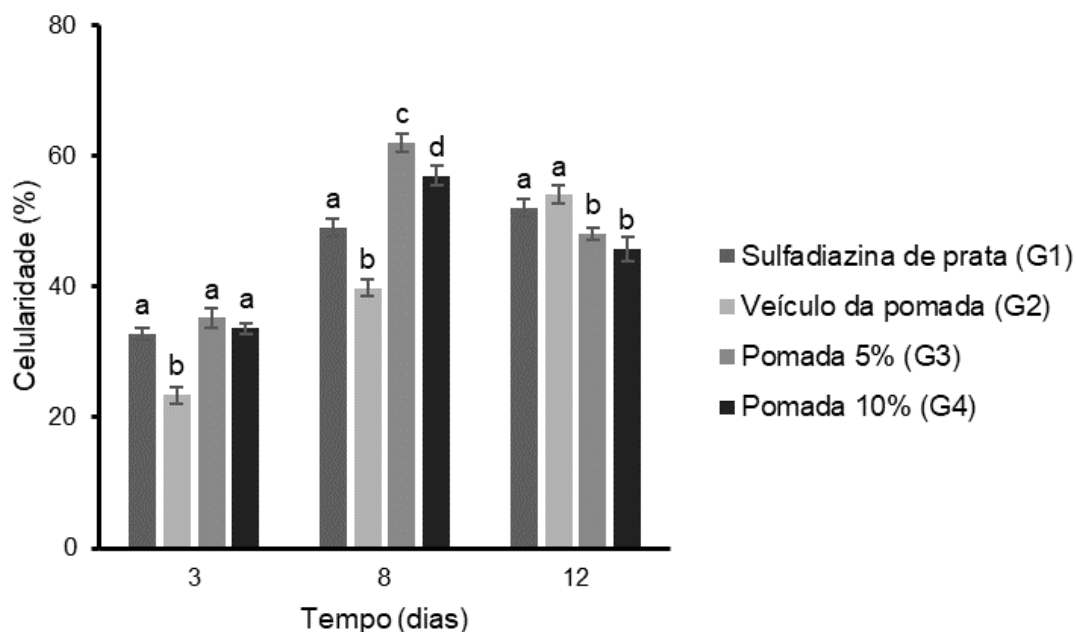
Fonte: Autora, 2023.

4.4.7. Análise histológica

4.4.7.1. Avaliação global do tecido

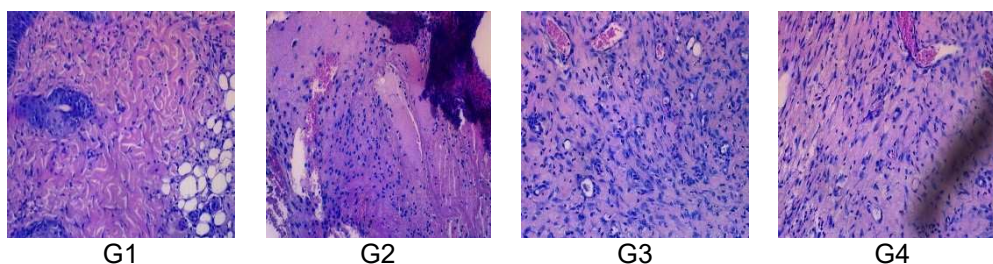
Avaliando a celularidade, ou seja, o número de células presentes nos fragmentos coletados das feridas (Figura 24), observou-se que nos dias 3 e 8 pós ferida, para os animais do grupo que recebeu apenas o veículo da pomada (G2) a celularidade foi estatisticamente menor que nos demais grupos. Sendo que no 12º dia pós ferida, o valor encontrado para este mesmo grupo (G2) foi estatisticamente igual ao grupo dos animais que recebeu a pomada comercial sulfadiazina de prata (G1) e superior aos grupos tratados com as pomadas de extrato etanólico de *X. sagittifolium* nas concentrações de 5 e 10% (G3 e G4 respectivamente). No oitavo dia pós ferida, observou-se aumento da celularidade nos animais tratados com as pomadas tanto na concentração de 5 quanto na concentração de 10%, quando comparadas aos controles, sendo observado maior valor para o grupo que recebeu a pomada na concentração de 5%, onde a celularidade foi de 62% (Figura 25).

Figura 24 - Celularidade, em porcentagem, nos dias 3, 8 e 12 pós ferida. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2023.

Figura 25 - Fotomicrografias representativas da celularidade aos 8 dias pós ferida (coloração hematoxilina-eosina). Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



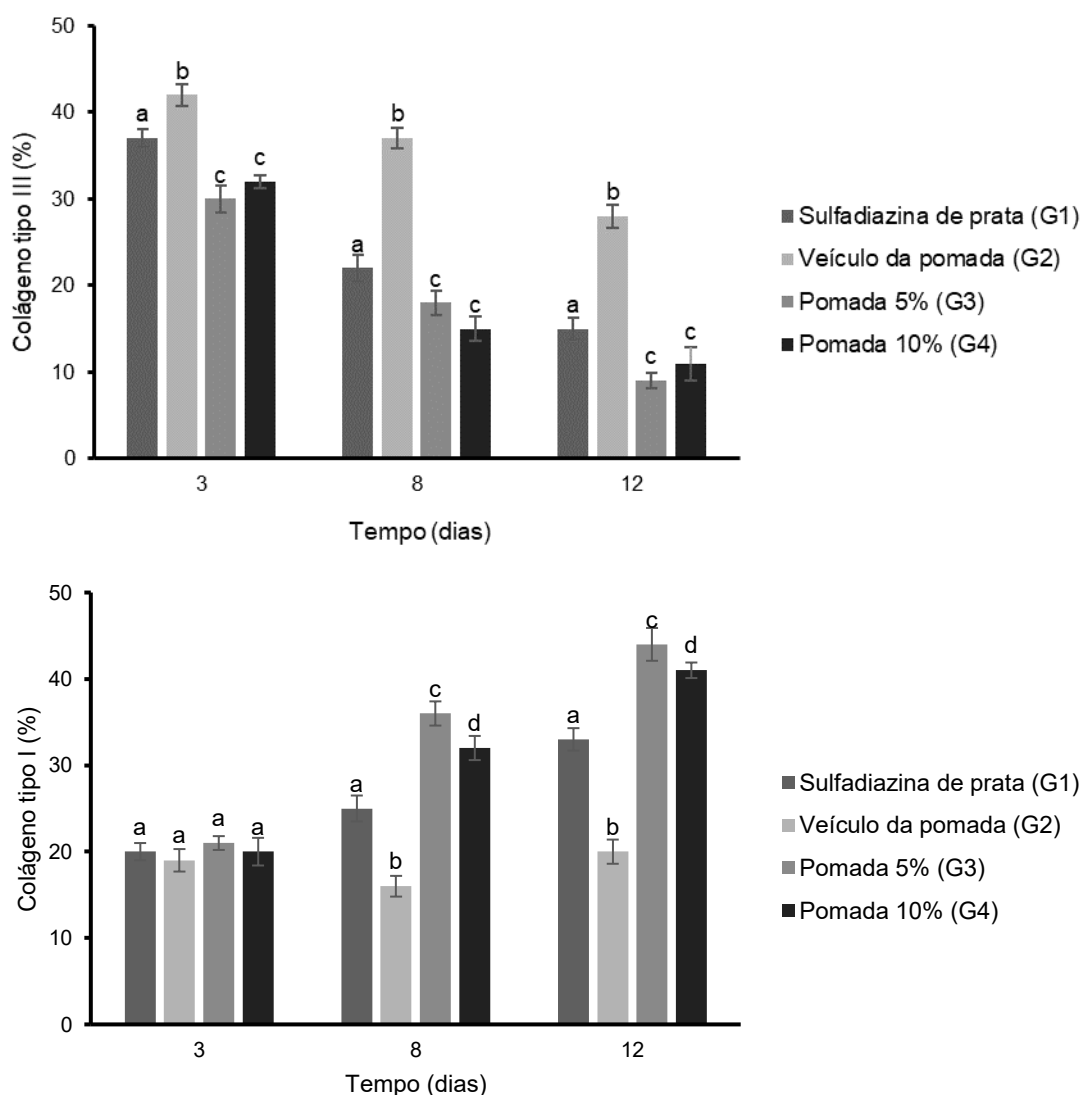
Fonte: Autora, 2023.

4.4.7.2. Análise de Colágeno

Para a quantificação das fibras colágenas presentes nos fragmentos de tecido coletados da área das feridas, utilizou-se o software ImageJ. O processo se dá por meio da diferenciação das fibras por sua cor, onde tons de verde representam as fibras de colágeno tipo III e tons de laranja/vermelho representam as fibras de colágeno tipo I, as regiões que aparecem em outras cores correspondem a locais em que nenhuma fibra estava presente (Figura 26 e Figura 27).

Observa-se que após 3 dias do início do tratamento, o colágeno tipo III está predominante em todos os grupos, aparecendo em maior quantidade nos grupos tratados com a sulfadiazina de prata (G1) 37,4% e no grupo tratado com o veículo da pomada (G2) 35,2%. Após 8 e 12 dias do procedimento, observa-se predominância do colágeno tipo I em todos os grupos, sendo mais evidente nos grupos tratados com as pomadas nas concentrações 5 e 10% de extrato etanólico de *X. sagittifolium*, apresentando-se em maior quantidade no 12º dia quando observou-se 44,2% e 40,9% de fibras colágenas tipo I, respectivamente.

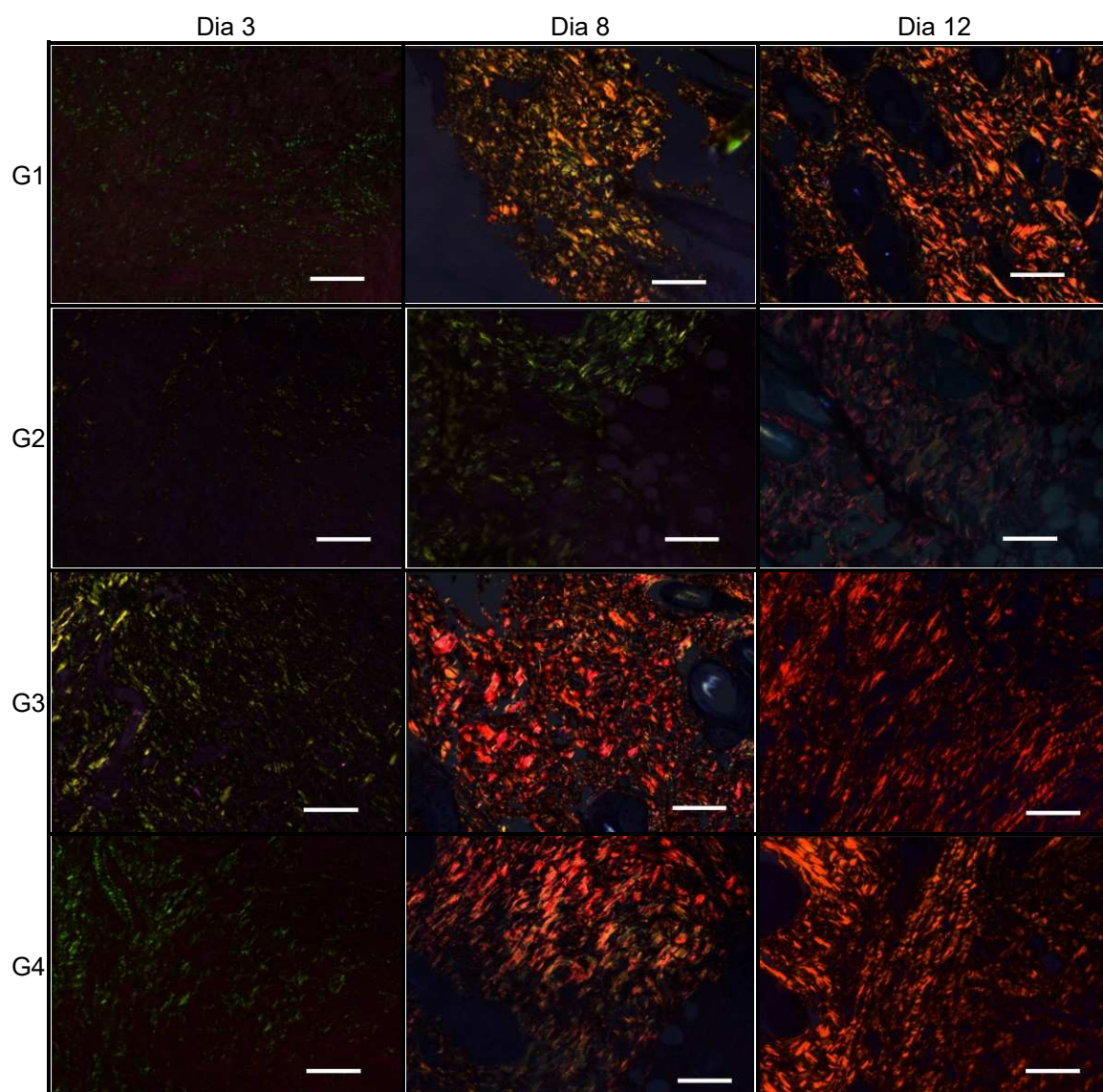
Figura 26 - Histomorfometria do colágeno tipo III e I, em porcentagem, nos dias 3, 8 e 12 pós ferida. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2023.

Na Figura 27, tem-se as fotomicrografias mostrando a distribuição das fibras colágenas aos 3, 8 e 12 dias pós ferida.

Figura 27 - Fotomicrografia obtida sob microscopia de polarização com coloração Picrosirius red, que mostra a distribuição das fibras de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde), em 3, 8 e 12 dias. G1 - Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata; G2 - Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada; G3 - Grupo tratamento pomada 5%; G4 - Grupo tratamento pomada 10%.



Fonte: Autora, 2023.

4.4.8. Perfil oxidativo tecidual

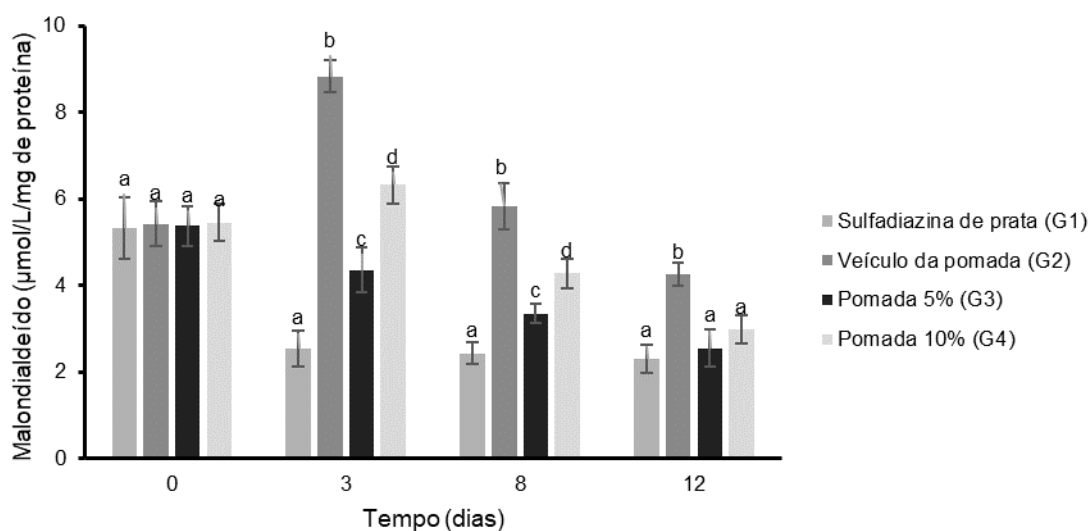
Foram determinados dois marcadores do estresse oxidativo, o malondialdeído (MDA) e o óxido nítrico (NO), além disso foram quantificadas também algumas

enzimas com ação antioxidante, sendo elas a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione-S-transferase (GST).

Para todos os marcadores e enzimas avaliados, no tecido íntegro (dia 0), retirado para a confecção da ferida, não houveram diferenças significativas entre os animais dos grupos de tratamento ou controles.

Na análise do malondialdeído pode-se observar que durante todo o período do tratamento (3, 8 e 12 dias) os valores encontrados para o controle positivo (animais tratados com sulfadiazina de prata) e para os tratamentos (pomadas de 5 e 10%) foram inferiores ao controle negativo (Figura 28). Sendo que em 3 e 8 dias, a quantidade de malondialdeído quantificada para os grupos de tratamento (pomada 5 e 10%) foram superiores ao controle positivo.

Figura 28 - Concentração tecidual de malondialdeído (MDA) ($\mu\text{mol/L/mg}$ de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

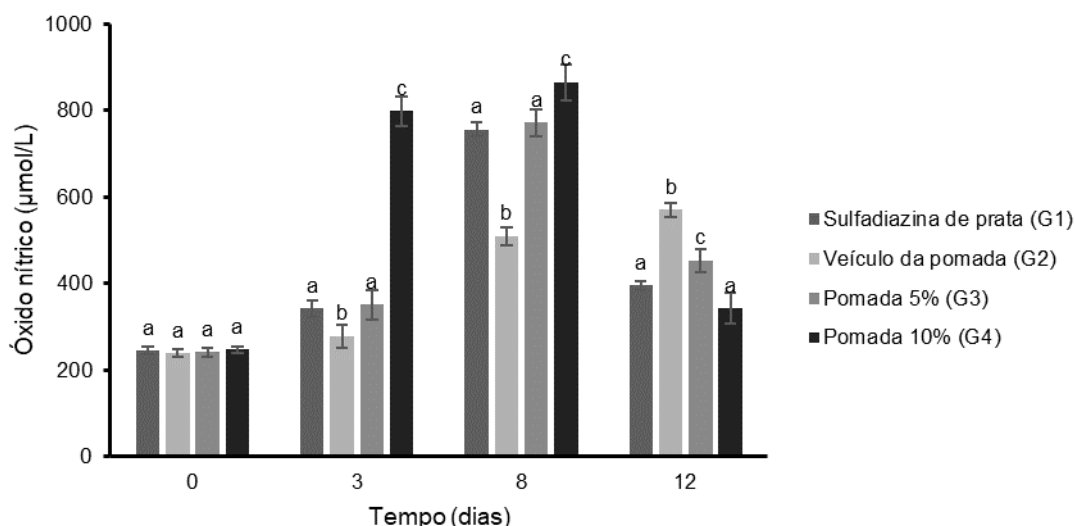


Fonte: Autora, 2023.

Para o óxido nítrico, observa-se que nos dias 3 e 8 pós ferida, tanto os tratamentos (pomadas 5 e 10%) quanto o controle positivo tiveram níveis superiores ao controle negativo. E os níveis de óxido nítrico observado nos animais submetidos aos tratamentos (pomadas 5 e 10%) nesses tempos, foram estatisticamente iguais ou superiores aos encontrados nos animais do controle positivo (G1). Já 12 dias pós ferida, nos animais do controle negativo, os níveis de óxido nítrico foram superiores quando comparados com os tratamentos (pomadas 5 e 10%) e com o controle positivo (Figura 29).

Para as enzimas avaliadas, SOD, CAT E GST, observa-se de maneira geral que os grupos tratamento e controle positivo, tiveram valores superiores ao grupo de controle negativo.

Figura 29 - Concentração tecidual de óxido nítrico (NO) ($\mu\text{mol/L}$) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

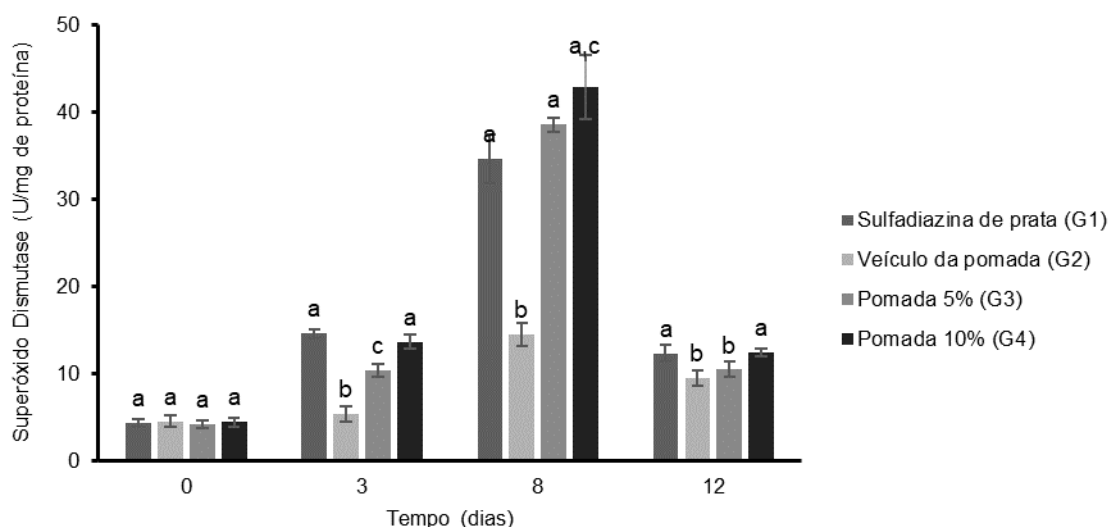


Fonte: Autora, 2023.

Na Figura 30 tem-se os valores da concentração de SOD tecidual, pode-se observar que após 3 dias de tratamento, o grupo da pomada na concentração de 10% de extrato etanólico de *X. sagittifolium* (G4) apresentou valor estatisticamente igual ao controle positivo, enquanto o grupo da pomada na concentração de 5% apresentou valores inferiores ao controle positivo. Aos 8 dias pós ferida, os grupos que receberam tratamento com as pomadas de 5 e 10% do extrato apresentaram valores superiores ao controle positivo.

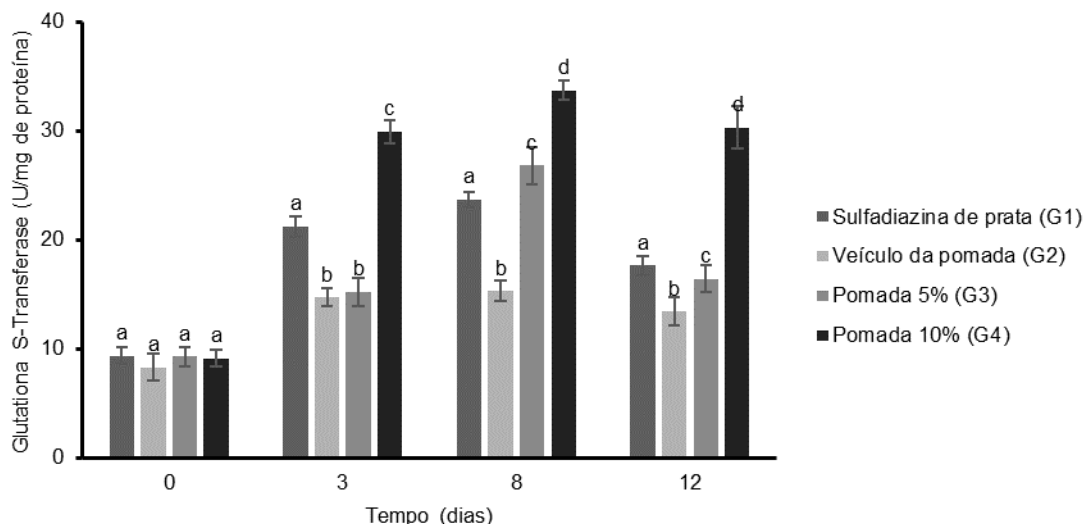
Em relação à concentração de GST (Figura 31), observa-se que no terceiro dia após a formação da lesão, os animais tratados com a pomada na concentração de 10% do extrato de *X. sagittifolium* apresentaram um nível elevado de GST (29,9 U/mg de proteína) quando comparado aos controles e aos animais tratados com a pomada a 5%, que neste mesmo período apresentou valor de GST estatisticamente igual aos animais que receberam apenas o veículo da pomada. O mesmo padrão foi observado em 8 e 12 dias, quando os maiores níveis de GST também foram nos animais que receberam a pomada na concentração de 10%.

Figura 30 - Concentração tecidual de superóxido dismutase (SOD) (U/mg de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2023.

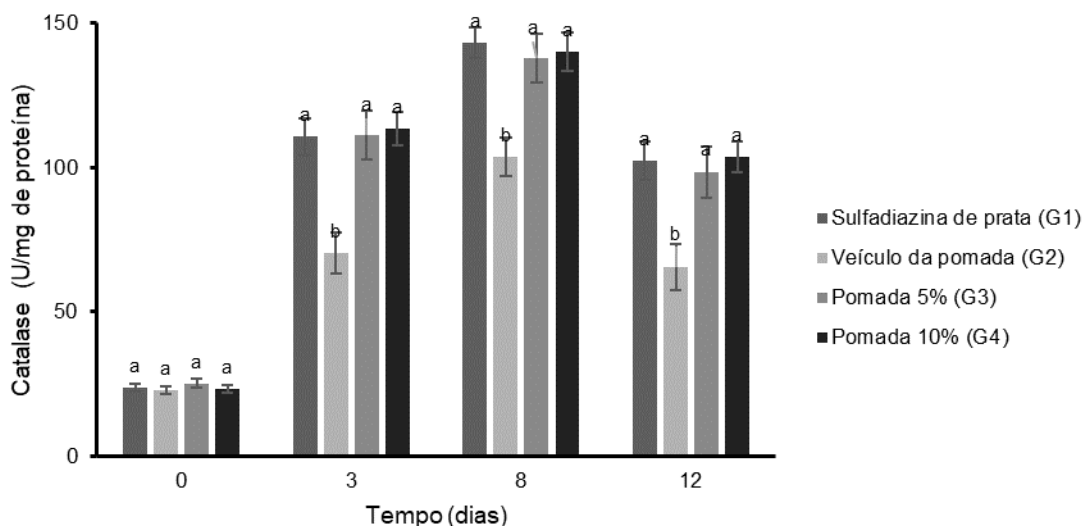
Figura 31 - Concentração tecidual de glutathione S-transferase (GST) (U/mg de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autora, 2023.

Para os níveis de catalase (CAT), observou-se que nos dias 3, 8 e 12 pós ferida, os valores quantificados nos animais dos grupos que receberam a sulfadiazina de prata, a pomada na concentração de 5% e a pomada na concentração de 10% do extrato etanólico de *X. sagittifolium*, foram estatisticamente iguais e superiores aos níveis encontrados nos animais que receberam apenas o veículo da pomada (Figura 32).

Figura 32 - Concentração tecidual de catalase (CAT) (U/mg de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



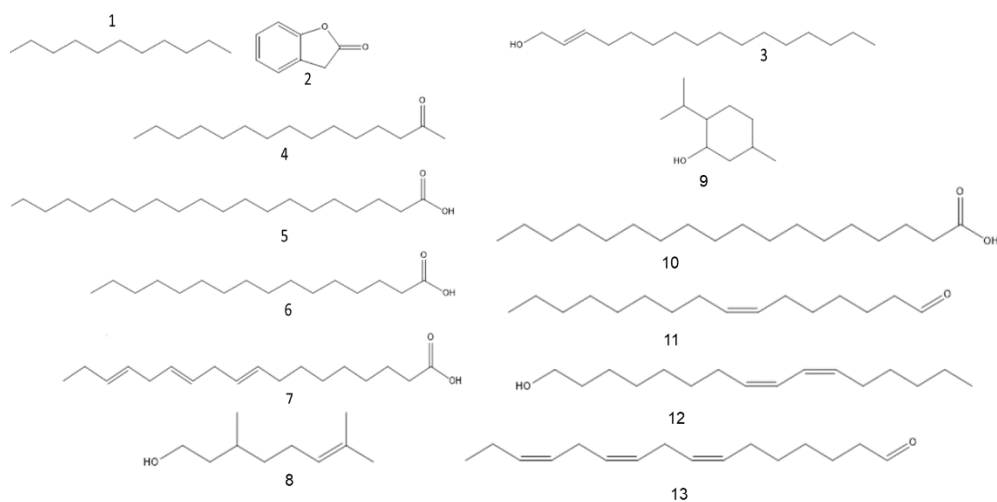
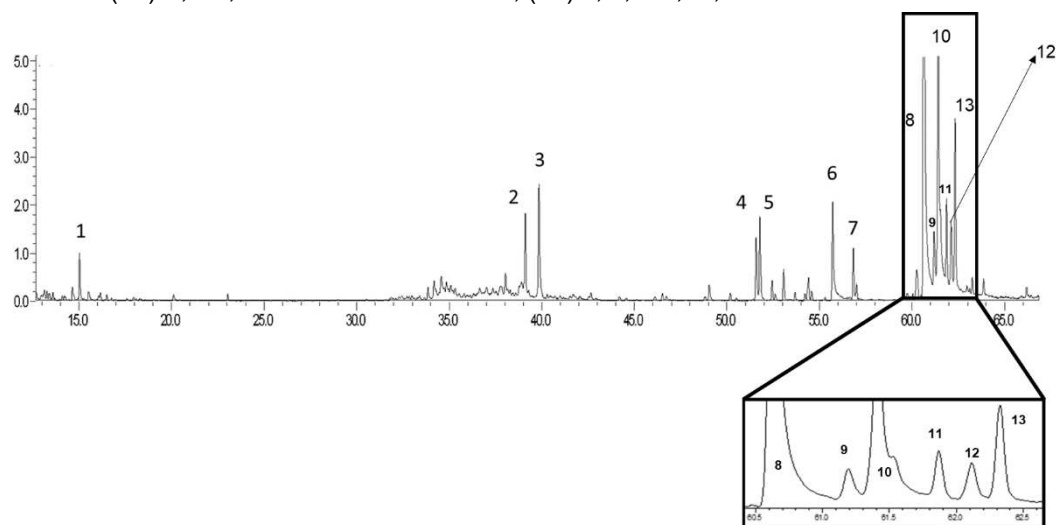
Fonte: Autora, 2023.

4.4.9. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

O extrato etanólico de *X. sagittifolium* foi injetado no cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas, sendo esta uma técnica comumente empregada quando se deseja separar os compostos voláteis e semivoláteis presentes em um extrato, determinando assim o número de componentes presentes, servindo para esclarecer a identidade dos compostos e além disso, é capaz de indicar a presença de impurezas na amostra.

O resultado apresentado para os componentes do extrato etanólico identificados pela técnica pode ser observado na FIGURA 33. Avaliando o cromatograma obtido pode-se observar a presença dos compostos: Undecano, (4H)-Benzofuranona, 2-Hexadecen-1-ol, 2-Pentadecanona, Pentadecanal, Ácido hexadecanóico (ácido palmítico), Ácido 9,12,15-octadecatrienóico (ácido linoléico), Citronelol, Ciclohexanol, 5-metil-2-(1-metiletil), Ácido octadecanóico (ácido esteárico), z-7-Hexadecenal, Z,Z-8,10-Hexadecadieno-1-ol, z, z, z-7,10,13-Hexadecatrienal.

Figura 33 - Cromatograma do extrato etanólico de *Xanthosoma sagittifolium* mostrando os principais compostos observados: (1) Undecano, (2) (4H)-Benzofuranona, (3) 2-Hexadecen-1-ol (4) 2-Pentadecanona, (5) Pentadecanal, (6) Ácido hexadecanóico, (7) Ácido 9,12,15-octadecatrienóico, (8) Citronelol (9) Ciclohexanol, 5-metil-2-(1-metiletil), (10) Ácido octadecanóico, (11) z-7-Hexadecenal, (12) Z,Z-8,10-Hexadecadieno-1-ol, (13) z, z, z-7,10,13-Hexadecatrienal.



Fonte: Autora, 2023.

5. DISCUSSÃO

A pele é tida como uma barreira de proteção notavelmente eficaz contra agentes externos e, conseqüentemente, infecções bacterianas (SORG et.al, 2017). Formada por três camadas, denominadas epiderme, derme e hipoderme, a pele dificulta a saída de água do organismo e, por consequência, a entrada de micro-organismos e outras substâncias indesejadas (REINKE & SORG, 2012; MELLO, 2020)

No tocante às infecções bacterianas na pele, sabe-se que estas ocorrem quando os microrganismos acessam as camadas interiores do tecido por meio de queimaduras, feridas ou disfunções de pele preexistentes. Embora muitas bactérias entrem em contato ou mesmo sejam naturais da pele, estas normalmente não possuem potencial para desencadear infecções sem que haja rompimento das camadas epiteliais (da SILVA, et. al., 2023; TEIXEIRA, 2021; MENEZES, 2021)

Durante o processo de cicatrização de uma ferida, é comum a presença de bactérias no local da lesão, sendo frequentemente encontradas as do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus*, influenciando, por consequência, a velocidade de cicatrização da pele, uma vez que estes microrganismos podem atuar como barreira física, dificultando a deposição do colágeno e a construção do tecido de granulação (FORMENTON; RIBEIRO; BARSOTT, 2020)

Além disso, quando assumem papel infeccioso estas bactérias podem tornar a inflamação exacerbada, prolongando a fase inicial do processo cicatricial, gerando retardo no desenvolvimento da cicatrização como um todo (HALLORAN & SLAVIN, 2002; KNOTTENBELT, 2003; OLIVEIRA e DIAS, 2012)

Dessa forma, observa-se que compostos com atividade antibacteriana contribuem, não de forma a acelerar o processo de cicatrização, mas atuam impedindo que o retardo das etapas cicatriciais ocorra.

Quando avalia-se especificamente a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Xanthosoma sagittifolium*, nota-se atividade satisfatória, com CIM (concentração inibitória mínima) menor ou igual a 0,625 contra 5 das 6 cepas de bactérias gram positivas do gênero *Staphylococcus* testadas. O que foi igualmente observado no trabalho de Aovi, Irin e Islam (2018), em que avaliaram o potencial antibacteriano do extrato etanólico das folhas de *X. sagittifolium* e obtiveram atividade antibacteriana moderada frente à algumas cepas de bactérias do gênero *Staphylococcus*

testadas. Já no trabalho de Balbino (2019), avaliando a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *X. sagittifolium* frente a cepas de bactérias do gênero *Staphylococcus* não observou-se potencial antibacteriano.

Para as demais bactérias, em sua maioria *gram* negativas, não foi possível observar atividade relevante. Tal fato pode ser justificado uma vez que estas são mais resistentes a entrada de substâncias no interior da célula por possuírem a parede celular mais complexa (IMAI et. al., 2019). Ademais, a identificação de extratos vegetais que possuam potencial antibacteriano torna-se atraente no âmbito de pesquisas científicas que tem por objetivo o tratamento de feridas cutâneas, visto que surgem como alternativa aos medicamentos tradicionalmente empregados para este fim (ZHANG et al., 2021).

Além do potencial antibacteriano, foi também estudado o potencial anti-inflamatório do extrato de *X. sagittifolium*, interessante para o desenvolvimento de um medicamento que tenha como alvo a cicatrização uma vez que é importante que as etapas do processo cicatricial (inflamatória, proliferação e remodelação) ocorram no tempo certo, e em indivíduos com uma fase inflamatória extensa observa-se danos à reparação do tecido e como consequência prejuízo à qualidade de vida (OLIVEIRA e DIAS, 2012). Nestes casos em que se observa inflamação prolongada avalia-se o uso de anti-inflamatórios, para o controle dessa inflamação (AQUINO et.al, 2021).

Em condições cicatriciais normais, após o processo de hemostasia, tem-se a fase inflamatória, onde é possível observa a migração de neutrófilos e monócitos ao local da ferida, que estimulam a liberação de fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas, e moléculas pró inflamatórias como o óxido nítrico (PRISTO, 2012). A expressão de óxido nítrico em uma condição inflamatória normal é benéfica, uma vez que a molécula atua inibindo o crescimento de patógenos, aumentando a vasodilatação e modulando a resposta inflamatória, porém em excesso ele se torna tóxico às células (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002).

Dessa forma, em caso de uma resposta inflamatória exacerbada ou prolongada observa-se uma produção aumentada de moléculas pró inflamatórias, como é o caso do óxido nítrico, comprometendo a qualidade da cicatrização e deixando o indivíduo vulnerável a possíveis complicações (KNOTTENBELT, 2003; OLIVEIRA e DIAS, 2012). Sendo assim, um composto com o potencial de suprimir a super expressão de óxido nítrico, se faz interessante, principalmente se tratando de

um composto natural por terem em sua maioria, menores efeitos colaterais quando comparados às alopatias convencionais (AQUINO et. al, 2012).

Além disso, outro teste utilizado para avaliar o potencial anti-inflamatório dos extratos de *X. sagittifolium* foi o estudo da inibição da desnaturação de proteína. Embora o mecanismo que relaciona o processo inflamatório à desnaturação das proteínas não seja completamente elucidado, sugere-se que durante a inflamação os mediadores inflamatórios possam induzir a liberação de proteases que vão promover a quebra da molécula tornando-as disfuncionais (GONZAL et al, 2020; GAMBÔA, 2023). Além disso, tem-se que uma das consequências do processo inflamatório é o aumento de temperatura local. Este aumento pode causar a desnaturação de proteínas e quando isso ocorre, ao perderem sua conformação, perdem também sua funcionalidade (TORTORA & DERRICKSON, 2018; REGO, 2012). Para o teste, utilizou-se a albumina, proteína que desnatura na presença de altas temperaturas (LEELAPRAKASH e DASS, 2011). Logo, o extrato vegetal que consegue inibir a desnaturação da albumina, em temperatura elevada, pode ser considerado como que possua efeito anti-inflamatório (REGO, 2012). Como exemplo temos o ácido acetilsalicílico, medicamento comercial amplamente utilizado, que sabidamente possui a capacidade de inibir a desnaturação de proteínas (GAMBÔA, 2023).

Avaliando a atividade anti-inflamatória dos extratos de *X. sagittifolium* baseada na inibição da desnaturação de proteínas, observou-se que para ambos os extratos, mesmo na maior concentração testada, a porcentagem de inibição foi inferior ao controle utilizado (Diclofenaco de sódio). O extrato etanólico apresentou baixo potencial inibitório para todas as concentrações testadas, sendo que com 2,5 e 5,0mg/mL atingiu o platô de 19,5% de inibição, já o extrato hexânico apresentou atividade inibitória moderada da desnaturação proteica, uma vez que ao atingir o platô com 2,5mg/mL observou-se 56,5% de inibição. Assim como no teste da inibição da desnaturação proteica, no teste da quantificação do NO produzido por macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS, o extrato hexânico apresentou maior potencial anti-inflamatório em relação ao extrato etanólico, para todas as concentrações testadas, proporcionando 71,4% de inibição da produção de óxido nítrico na concentração de 400 µg/mL, enquanto o extrato etanólico, na mesma concentração, reduziu em 60,4% a produção de óxido nítrico pelas células. Já o controle (dexametasona 200 µg/mL) reduziu em 85% a produção do óxido nítrico. Embora sejam estatisticamente menos eficientes que o controle na inibição da produção do óxido nítrico, ambos extratos

apresentaram atividade anti inflamatória moderada, por meio da inibição da produção de óxido nítrico. Noor e colaboradores (2015) avaliaram a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico de *X. sagittifolium* pelo teste do edema de pata em ratos Wistar e observaram potencial atividade anti-inflamatória do extrato. Hossain e colaboradores (2017) também obtiveram resultados positivos ao avaliarem a atividade anti-inflamatória do extrato metabólico de *X. sagittifolium* pelo teste do edema de pata em ratos Wistar. Tais achados corroboram com os dados obtidos para os extratos hexânico e etanólico de *X. sagittifolium*.

Outro ponto avaliado foi a atividade antioxidante dos extratos, uma vez que a expressão de radicais livres e as reações oxidativas estão envolvidas em todas as etapas da cicatrização de feridas, os radicais livres formados tem efeitos fisiológicos benéficos, no entanto, quando seus níveis se tornam elevados, ocorrem danos às células e tecidos próximos à ferida (CANO SANCHEZ et. al., 2018; JORGE e RAMALHO, 2006). Durante o processo de cicatrização, de maneira geral e principalmente durante a fase inicial chamada de inflamação, observa-se a ocorrência de um aumento na taxa de respiração celular, e consequentemente observa-se aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (WATSON et al. 2016). A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou a incapacidade de controlar a quantidade de EROs dispersas no tecido, resulta em inflamação acelerada e acentuada, repercutindo em dano celular induzido por estresse oxidativo, que é uma das principais causas do retardo na cicatrização de feridas, podendo provocar danos extensivos ao tecido (JING et. al., 2015; ROESLER et.al.,2007). Dessa forma, estudos de compostos com a capacidade de eliminação de EROs e com potencial antioxidante aparentam ser uma estratégia importante para a cicatrização das feridas (CHANIAD et al., 2020).

Avaliando a atividade antioxidante dos extratos testados *in vitro*, com base na capacidade de reduzir e consequentemente eliminar o radical DPPH, observa-se que o extrato hexânico apresentou baixa capacidade de eliminação de radicais DPPH, quando comparado aos padrões e ao extrato etanólico, para todas as concentrações testadas, atingindo apenas 25,3% de eliminação na maior concentração testada (200 µg/mL). Já o extrato etanólico, demonstrou possuir significativa atividade antioxidante *in vitro*, sendo estatisticamente igual ou superior a pelo menos um dos padrões testados, para todas as concentrações avaliadas, na menor concentração, 25 µg/mL foi capaz de eliminar 33,2% dos radicais DPPH, chegando a eliminar 90,3% dos

radicais DPPH na maior concentração testada (200 µg/mL). Alguns trabalhos anteriores corroboram com os resultados obtidos quanto ao potencial antioxidante dos extratos hexânico e etanólico de *X. sagittifolium*. No trabalho de Nishanthini e Mohan (2012) avaliando o potencial antioxidante *in vitro* do extrato metanólico de *X. sagittifolium* observou-se atividade antioxidante satisfatória por meio do teste da capacidade de eliminação do radical DPPH. Da mesma forma, Araújo e colaboradores (2019), observaram alta atividade antioxidante do extrato metanólico de folhas de *X. sagittifolium* tanto pelo teste de eliminação do radical DPPH quanto pelo teste de captura do radical ABTS.

Para a avaliação do potencial cicatrizante dos extratos inicialmente realizou-se testes *in vitro* para posteriormente realizar-se a escolha do melhor extrato para os testes *in vivo*. Nos testes *in vitro*, para avaliação da capacidade cicatrizante, foram determinadas a viabilidade celular das células após contato com o extrato, a capacidade citoprotetora desse extrato quando as células entravam em contato com agente em concentração tóxica (H₂O₂) e a capacidade migratória das células quando em contato com o extrato, na presença de mitomicina C.

Para a determinação da viabilidade celular utilizou-se o ensaio de MTT, cujo princípio é baseado na atividade metabólica celular, uma vez que as células viáveis metabolizam o composto MTT de cor amarela convertendo-o em formazan um composto azul/arroxado. Dessa forma, por meio da leitura de absorbância é possível determinar se o extrato nas concentrações testadas tem caráter citotóxico ou não (NEPOMUCENO et al., 2021; FRACHINI et al., 2021).

Foi avaliada a viabilidade de dois tipos celulares após contato com os extratos etanólico e hexânico de *X. sagittifolium*, os fibroblastos NIH/3T3 e macrófagos RAW 264.7. Ambos tipos celulares apresentam papel importante durante o processo cicatricial (MEDEIROS e DANTAS-FILHO, 2017). Os fibroblastos tem por principal função a síntese de componentes da matriz extracelular, afim de manter a integridade do tecido conjuntivo pela promoção da reepitelização, podendo destacar a promoção da produção de colágeno, elastina, glicosaminoglicanas e proteases (KARAMANOS, et al., 2019; COENTRO et al., 2018; THEOCHARIS et al., 2016). Os macrófagos participam do processo de cicatrização, removendo, por meio da fagocitose, corpos estranhos que estejam na ferida. Além de secretarem proteases, estimularem o recrutamento e ativação celular, a produção de citocinas, a síntese da matriz

extracelular pelo estímulo da formação de fibroblastos, a angiogênese e a síntese de colágeno (MEDEIROS e DANTAS-FILHO, 2017; KIM et al., 2019).

No ensaio com o MTT, avaliando a viabilidade celular após contato com os extratos etanólico e hexânico de *X. sagittifolium*, observou-se que os extratos não possuem caráter citotóxico em nenhuma das concentrações testadas para nenhum dos dois tipos celulares avaliados. Foi possível observar inclusive, que para as concentrações testadas, os extratos auxiliaram na proliferação celular, quando comparado ao controle positivo, sendo observada uma maior taxa de proliferação celular quando utilizado o extrato etanólico de *Xanthosoma sagittifolium*, para os dois tipos celulares avaliados. Em fibroblastos, quando na maior concentração (400µg/mL), o extrato etanólico apresentou 162% de viabilidade celular. E em macrófagos, na mesma concentração (400µg/mL) a taxa de viabilidade celular foi de 147% para o tratamento com extrato etanólico. Já para o extrato hexânico observou-se 118,3% de viabilidade em fibroblastos e 123% de viabilidade em macrófagos na concentração de 400 µg/mL.

Embora não apresentem caráter citotóxico e tenham estimulado a proliferação celular, os extratos etanólico e hexânico de *X. sagittifolium* apresentaram baixo efeito citoprotetor. Sendo o extrato etanólico o que apresentou maior atividade citoprotetora, entre os dois testados, para ambos os tipos celulares, apresentando uma pequena taxa de 39% de efeito protetor quando testado em fibroblastos e 23% em macrófagos, quando na maior concentração (400 µg/mL). Já o extrato hexânico demonstrou apenas 25,6% de proteção para os fibroblastos e 15,7% para os macrófagos, na concentração de 400 µg/mL.

Para avaliar a capacidade migratória das células *in vitro* foi utilizado o teste de *Scratch*, neste ponto, após os resultados obtidos anteriormente, foi possível escolher um único extrato para dar prosseguimento ao experimento, sendo este o extrato etanólico de *X. sagittifolium*, uma vez que este se mostrou mais promissor para o uso no tratamento de feridas quando comparado ao extrato hexânico, baseado principalmente no teste de viabilidade celular e citoprotetor.

O teste de *Scratch* se baseia na confecção de uma fenda na placa com os fibroblastos e juntamente ao extrato etanólico de *X. sagittifolium*, adiciona-se a mitomicina C, um agente alquilante que atua inibindo da síntese de DNA dependente do RNA, inibe a síntese proteica em células de crescimento rápido e inibe a proliferação fibroblástica (SANTOS et al., 2006). Dessa forma foi possível avaliar

realmente a taxa de migração celular e não mais a taxa de proliferação, uma vez que a migração da célula para a área da ferida se faz de extrema importância em um processo de cicatrização sendo importante que se avalie o potencial do extrato em potencializar a capacidade migratória ou não.

Como resultado, observou-se que nas células tratadas com o extrato etanólico de *X. sagittifolium* tanto na concentração de 200µg/mL quanto de 400µg/mL a taxa de migração dos fibroblastos foi superior à taxa observada nas células controle. Após 24 horas de tratamento nas células tratadas com o extrato mais concentrado (400µg/mL), observa-se maior taxa de migração sendo esta de 98,43%, contra os 59,4% observado no controle positivo, no mesmo tempo, demonstrando que o extrato estimulou a migração dos fibroblastos.

Após os testes *in vitro*, observou-se que o extrato etanólico de *X. sagittifolium* apresentava promissor potencial cicatrizante, prosseguindo, portanto, para os testes *in vivo*.

No experimento com os animais, avaliando os 4 grupos experimentais, sendo eles um grupo controle com pomada Sulfadiazina de Prata (G1), um grupo controle tratado com o veículo da pomada (G2), um grupo tratado com pomada com extrato etanólico de *X. sagittifolium* na concentração de 5% (G3) e um grupo tratado com pomada com extrato etanólico de *X. sagittifolium* na concentração de 10% (G4), determinou-se a taxa de contração das feridas e foi possível observar que os tratamentos com as pomadas nas concentrações de 5 e 10%, G3 e G4 respectivamente, apresentaram melhor resultado quando comparados aos controles, G1 e G2, sendo que ao final dos 12 dias a pomada na concentração de 5% (G3) apresentou índice de contração da ferida, superior a todos os demais grupos (88%) inclusive ao controle positivo (G1) (74%).

Quando se avalia o percentual das fibras colágenas tipo III e tipo I, presentes no tecido cicatricial com o passar dos dias, observa-se maior percentual de fibras colágenas tipo I, nos animais tratados com as pomadas nas concentrações de 5 e 10% do extrato de *X. sagittifolium* (G3 e G4, respectivamente), quando comparadas aos grupos controle (G1 e G2). A partir do oitavo dia após a ferida já é possível observar essa diferença na composição das fibras colágenas quando comparados os tratamentos com as pomadas e os grupos controle. Para os animais do grupo controle que recebeu apenas o veículo da pomada (G2), durante todo o período dos 12 dias avaliados, observou-se predominância do colágeno tipo III. Já para os animais

tratados com a sulfadiazina de prata (G1), observou-se a mesma tendência dos animais tratados com as pomadas de 5 e 10%, G3 e G4 respectivamente, onde a partir do oitavo dia, observou-se predominância das fibras colágenas tipo I, porém tanto após 8 dias quanto após 12 dias, a porcentagem de fibras tipo I para esse grupo (G1), foi menor se comparado aos animais tratados com as pomadas de 5 e 10% (G3 e G4, respectivamente). Exemplo disso é que após 12 dias, observa-se 33% de colágeno tipo I para os animais tratados com a sulfadiazina de prata (G1), e para os animais tratados com as pomadas de 5 e 10% (G3 e G4, respectivamente), observa-se 44,3 e 40,8% respectivamente.

No que diz respeito a celularidade, 3 dias após a ferida observou-se maior quantidade de células no tecido cicatricial dos animais tratados com as pomadas 5 e 10% (G3 e G4, respectivamente) e dos tratados com sulfadiazina de prata (G1) quando comparados aos animais tratados apenas com o veículo da pomada (G2). No oitavo dia observou-se aumento no número de células para todos os grupos, período que coincide com a etapa de proliferação do processo cicatricial, sendo que o aumento foi maior nos animais tratados com as pomadas de 5 e 10% (G3 e G4, respectivamente). Aos 12 dias, observou-se leve redução no número de células no tecido cicatricial dos animais tratados com as pomadas 5 e 10% (G3 e G4, respectivamente), demonstrando redução da etapa proliferativa.

Além disso, avaliou-se também o potencial antioxidante do extrato etanólico de *X. sagittifolium in vivo*, em duas concentrações (5 e 10%), por meio da determinação da concentração dos marcadores para estresse oxidativo, malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (NO) e foi avaliado os sistemas antioxidantes enzimáticos pela quantificação de enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST).

O malondialdeído (MDA), consiste em um marcador de estresse oxidativo, é produto da interação entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) com os lipídeos, pela remoção de um átomo de hidrogênio, resultando em peroxidação lipídica em ácidos graxos poli-insaturados desencadeando a liberação de radical lipoperoxil que leva à formação de malondialdeído no tecido (PERESTRELO, 2018). Dessa forma, ao quantificar MDA e observar que houve redução de seus níveis quando em contato com algum composto, pode-se concluir que o mesmo apresenta potencial antioxidante. Avaliando os resultados obtidos pela quantificação de MDA, observa-se que em ambas concentrações, 5 e 10% de extrato etanólico de *X. sagittifolium* (G3 e

G4, respectivamente), e para todos os tempos avaliados, a quantidade de MDA foi inferior ao observado nos animais tratados apenas com o veículo da pomada (G2).

Quantificou-se também o óxido nítrico tecidual (NO), um potente ativador do fator vasodilatador e responsável pela angiogênese no tecido. Além disso, atua inibindo a ocorrência de peroxidação lipídica, tendo dessa forma tem relação direta com a síntese do malondialdeído e sua presença inibe a formação do MDA, atuando como um antioxidante (HUMMEL et al, 2006). Pelo uso das pomadas observou-se nos animais que receberam as pomadas a base de extrato etanólico de *X. sagittifolium* (G3 e G4, respectivamente), aos 3 e 8 dias pós ferida, apresentaram valores da concentração de óxido nítrico superiores aos animais que receberam apenas o veículo da pomada (G2), demonstrando por meio da expressão do óxido nítrico, potencial antioxidante.

Continuando o estudo do perfil do estresse oxidativo, avaliou-se também a concentração das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione-S-transferase (GST), essas enzimas apresentam oxidativo por meio do controle da concentração de espécies reativas de oxigênio no tecido (DEPHILLIPO et al., 2018; IRBER, 2023). Atuando na defesa antioxidante evitando o acúmulo de radicais livres no tecido. Dessa forma, quanto maior for a concentração dessas enzimas no tecido, maior controle do estresse oxidativo (MOGHADAMTOUSI et al., 2015; YADAV et al., 2017; da COSTA et al., 2020). Sendo assim, compostos que estimulam a expressão dessas enzimas, são considerados compostos antioxidantes. Dessa forma, avaliando os resultados obtidos pela quantificação das enzimas SOD, GST e CAT, observa-se que em ambas concentrações, 5 e 10% de extrato etanólico de *X. sagittifolium* (G3 e G4, respectivamente), e para todos os tempos avaliados, a quantidade delas foi superior ao observado nos animais tratados apenas com o veículo da pomada (G2), demonstrando mais uma vez, o potencial antioxidante do extrato.

Como pode ser observado no cromatograma, os principais compostos presentes no extrato são ácido graxos, dentre eles ácido linoléico, palmítico e esteárico, álcoois e cetonas de cadeia longa. De acordo com Hatanaka & Curi 2007, desde o início da década de 70 os ácidos graxos têm sido estudados na resposta imune, pois interferem em diversos passos do processo inflamatório como contração vascular, quimiotaxia, adesão, diapedese, ativação e morte celular.

Cardoso et al. (2004), avaliaram a influência da administração tópica dos ácidos α -linolênico (n-3), linoléico (n-6) e oléico (n-9) no processo de cicatrização de feridas em ratos. Esses autores observaram o tratamento tópico dos animais com ácidos oléico e linoléico reduziram significativa da área do ferimento já no quinto dia do tratamento e inibiram a produção de óxido nítrico local, nas primeiras 48 horas pós-cirúrgica.

Silva (2019), observou que o ácido graxo linoleico (LA, 18:2 'omega'-6), induziu o aumento no número de novos vasos sanguíneos na pele, favorecendo a cicatrização, em ratos, e encontrou evidências de que tal efeito parece estar envolvido com a via de sinalização de VEGF/HIF.

Capella (2015), estudou a ação cicatrizante do extrato oleoso de urucum, em feridas de ratos Wistar, e observou influencia do extrato principalmente na fase inicial no processo cicatricial e na remodelação tecidual. O óleo de urucum dispõe em sua composição dos ácidos graxos: linoléico, palmítico, oléico e esteárico.

No Brasil, os povos ancestrais já usavam e ainda continuam usando óleos de copaíba (*Copaífera langsdorffii*) uma planta nativa da Amazônia para efeito cicatrizante, essa planta e que apresenta na sua composição química 35,3% de ácido oléico, 35,7 % de ácido linoléico, 24,9 % de ácido palmítico e 1,1% do ácido araquidínico (Veiga Junior & Pinto, 2002).

6. CONCLUSÃO

A pomada preparada na concentração de 5% de extrato etanólico de *X. sagittifolium* assegura propriedades cicatrizante, antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória de acordo com os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* realizados. Sendo um produto promissor para atuar na modulação do processo cicatricial uma vez que promove um reparo cutâneo mais rápido.

Diante das concentrações testadas, sendo 5% e 10%, os resultados foram satisfatórios em ambos os casos, sendo que a atividade cicatricial da pomada com concentração de 5% demonstrou melhor efeito ao que se propôs. Por meios dos testes *in vitro* de proliferação e migração celular, foi possível observar que o extrato etanólico foi responsável por uma maior taxa de proliferação e migração de fibroblastos, o que foi corroborado pelos resultados obtidos nos ensaios *in vivo*, em que a pomada a base de extrato etanólico de *X. sagittifolium* 5% auxiliou na contração da ferida, no aumento da celularidade do tecido lesionado, quando comparados aos controles. Além disso, observou-se maior quantidade de fibras colágenas do tipo I em menor espaço de tempo nos animais tratados com a pomada na concentração de 5%.

Além do efeito na modulação do reparo tecidual, o extrato etanólico de *X. sagittifolium* demonstrou possuir atividade antibacteriana frente a bactérias gram positivas, atividade anti-inflamatória moderada e atividade antioxidante importante.

As análises hematológicas não demonstraram diferenças estatísticas significativas para os tratamentos utilizados, dessa forma não foram utilizados para avaliar a atividade cicatrizante do extrato.

REFERÊNCIAS

- Aitcheson, S. M., Frentiu, F. D., Hurn, S. E., Edwards, K., & Murray, R. Z. (2021). Skin wound healing: normal macrophage function and macrophage dysfunction in diabetic wounds. *Molecules*, 26(16), 4917. doi.org/10.3390/molecules26164917
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9), 4168–4170. <https://doi.org/10.1021/jf001494m>
- Alves, J. D. O., de Medeiros, J. A. P., & Catelli, M. F. (2016). Assessment of healing action of guaçatonga (*Casearia sylvestris* Sw.) on experimental induced wounds in mice. *Nucleus Animalium*, 8(1), 15-20.
- Amadeu, T., Braune, A., Mandarim-de-Lacerda, C., Porto, L. C., Desmoulière, A., & Costa, A. (2003). Vascularization pattern in hypertrophic scars and keloids: a stereological analysis. *Pathology-Research and Practice*, 199(7), 469-473. <https://doi.org/10.1078/0344-0338-00447>
- Aovi, F. I., Irin, T., & Islam, A. (2018). Phytochemical investigations and pharmacological screening of *Xanthosoma sagittifolium* (L.) leaf extract. *Pharmacology Online*, 3, 75-80.
- Aquino, D. F. S., Santana, L. F., de Aquino, C. A. G., Ferreira, F. T., de Lima Cardoso, C. A., do Carmo Vieira, M., & Kassuya, C. A. L. (2021). Cicatrização de feridas e efeitos anti-inflamatórios do extrato aquoso de *Alibertia edulis* em camundongos. *Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde (PECIBES)*, 7(2), 15-19. <https://doi.org/10.55028/pecibes.v7i2.14832>
- Balbino, F. C. D. S. (2019). Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Xanthosoma sagittifolium*.
- Ballen, S. C., Rigo, D., Paliga, M., Puton, B. M. S., Cansian, R. L., & Paroul, N. (2019). Determinação do potencial antioxidante (DPPH) e antimicrobiano de extratos vegetais e óleo essencial de louro (*Laurus nobilis*). *PERSPECTIVA, Erechim*. v. 43, n.163, p. 61-70, setembro/2019.
- Baron, J. M., Glatz, M., & Proksch, E. (2020). Optimal support of wound healing: New Insights. *Dermatology*, 236(6), 593-600. <https://doi.org/10.1159/000505291>
- Batista, E. K. F., da Trindade, H. I., dos Santos Farias, I., Martins, F. M. M., da Silva Filho, O. F., & de Souza Batista, M. D. C. (2017). Avaliação da atividade cicatrizante de preparados à base de jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart.). *Archives of Veterinary Science*, 22(3).
- Bermejo, J. E. H., & León, J. (Eds.). (1994). Neglected crops: 1492 from a different perspective (Vol. 26). Food & Agriculture Org.

Borges, E.; Júnior, J.; Abreu, M.; Lima, V.; Barbosa, P.; Soares, S. (2016). Factors associated with the healing of complex surgical wounds in the breast and abdomen: Retrospective cohort study. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. 24. 10.1590/1518-8345.1398.2811.

Botan, A. G. (2018). Citotoxicidade e ação anti-inflamatória in vitro dos extratos glicólicos de *Morus nigra* (amora), *Ziziphus joazeiro* (juá) e *Vitis vinifera* (uva). Dissertação. Universidade Estadual Paulista (Unesp). Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal. São José dos Campos-São Paulo.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2010). Farmacopéia Brasileira - Volume I. 5ª edição. Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de hortaliças não-convencionais (2010). Brasília: Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo - Mapa/ACS, p. 92.

Bruning, M. C. R., Mosegui, G. B. G., & Vianna, C. M. D. M. (2012). A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência & saúde coletiva*, 17, 2675-2685. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232012001000017>

Camili, E. C., de Azevedo, C. C. B. V., Bocuti, E. D., de Miranda Silvério, J., da Costa Barros, K., da Silva, A. R. B., & Júnior, S. S. (2013). Cultivo consorciado de alface sob diferentes arranjos espaciais e manejo do dossel de taioba. *Agrarian*, 6(20), 110-120. Recuperado de <https://ojs.ufgd.edu.br/index.php/agrarian/article/view/1961>

Campos, A. C. L.; Borges-Branco, A.; Groth, A. K. (2007). Wound healing. ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo). 20. 51-58. <https://doi.org/10.1590/S0102-67202007000100010>.

Campos, M. G. C. A.; Sousa, A. T. O.; Vasconcelos, J. M. B.; Lucena, S. A. P.; Gomes, S. K. A. (2016). Feridas complexas e estomias: aspectos preventivos e manejo clínico. João Pessoa: Ideia. 398 p.: il. ISBN 978-85-463-0133-1

Candido, L.C. (2006). Feridólogo: tratamento clínico-cirúrgico de feridas cutâneas agudas e crônicas. São Paulo, dez.

Cano Sanchez, M., Lancel, S., Boulanger, E., & Neviere, R. (2018). Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review. *Antioxidants*, 7(8), 98. <https://doi.org/10.3390/antiox7080098>

Capella, Sabrina de Oliveira (2015). Dissertação de Mestrado. Avaliações da cicatrização de feridas abertas tratadas com Bixa orellana. Orientadora: Márcia de Oliveira Nobre – Pelotas. 41f: il.

Cardoso CR, Souza MA, Ferro EA, Favoreto S Jr & Pena JD 2004. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair Regen* 12(2):235-243.

Carvalho, A.; Perfeito, J.; Silva, L.; Ramalho, L.; Marques, R.; Silveira, D. (2011). Regulation of herbal medicines in Brazil: Advances and perspectives. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 47. 467-473. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000300004>.

Carvalho, L. G., da Costa Leite, S., & Costa, D. D. A. F. (2021). Principais fitoterápicos e demais medicamentos utilizados no tratamento de ansiedade e depressão. *Revista de Casos e Consultoria*, 12(1), e25178-e25178.

Carvalho, L. M.; Costa, J. A. M.; Carnelossi, M. A. G. (2010). Qualidade em plantas medicinais – Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 54 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1517-1329; 162). Disponível em http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2010/doc_162.pdf

Cerqueira, N. F., & Yoshida, W. B. (2002). Óxido nítrico: revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 17, 417-423. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502002000600011>

Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., & Bhattacharya, S. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), S178-S180. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60154-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60154-3)

Chaniad, P., Tewtrakul, S., Sudsai, T., Langyanai, S., & Kaewdana, K. (2020). Anti-inflammatory, wound healing and antioxidant potential of compounds from *Dioscorea bulbifera* L. bulbils. *PloS one*, 15(12), e0243632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243632>

Chen, H.; Zhang, M.; Xie, B. (2005). Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. *Food Chemistry*, v.90, n.1-2, p.17-21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.001>

Chopade, A. R., Somade, P.,M & Sayyad FJ. (2012). Membrane Stabilizing Activity and Protein Denaturation: A Possible Mechanism of Action for the AntiInflammatory Activity of *Phyllanthus amarus*. *JKIMSU*, 1(1): 67-72

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved Standard. (2015) 12. ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Coentro JQ, Pugliese E, Hanley G, Raghunath M & Zeugolis DI (2018) Current and upcoming therapies to modulate skin scarring and fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev*, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.009>

Colbach, N., Colas, F., Pointurier, O., Queyrel, W., & Villerd, J. (2017). A methodology for multi-objective cropping system design based on simulations. Application to weed management. *European Journal of Agronomy*, 87, 59-73. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2017.04.005>

Cunha, M. M. F. D. (2022). AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE FLAVONOIDES: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.

da Costa, J. P. D. R., Monteiro, E. A. S., Ishigaki, B. S. V., & dos Reis Ferreira, T. C. (2020). Efeito Do Uso De Plantas Medicinais Em Modelos Experimentais De Cicatrização. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, 17(2). <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v17i2.5731>

da Silva Campelo, M. E., da Silva Moraes, A. C., da Silva, J. F., Sousa, A. M. C., & de Souza, J. W. N. (2020). Caracterização e aceitação sensorial de banana prata (musa paradisiaca) produzida em sistemas orgânico e convencional. *Brazilian Journal of Development*, 6(9), 65623-65640. DOI:10.34117/bjdv6n9-116

da Silva Góis, A. R., & de Araújo, I. D. (2021). Ensino remoto de metodologia científica: Relato de experiência da monitoria durante a pandemia do coronavírus. *Revista Enfermagem Digital Cuidado e Promoção da Saúde*, 6. DOI: 10.34119/bjhrv4n4-006.

da Silva, D. G. B., da Silva, H. B., Mourão, A., Júnior, M. R. D. C. C., dos Santos Leite, J. C., Teixeira, C. V. P., & Firmo, W. D. C. A. (2023). Infecções cutâneas ocasionados por *Staphylococcus Aureus*: uma revisão sistemática. Publicações. DOI 10.47402/ed.ep.c202319264570

de Almeida Jackix, E., Monteiro, E. B., Raposo, H. F., Vanzela, E. C., & Amaya-Farfán, J. (2013). Taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) leaves: nutrient composition and physiological effects on healthy rats. *Journal of food science*, 78(12), H1929-H1934. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12301>

de Moura Costa, I., de Alencar, I. D. R., de Lyra, J. A., do Nascimento, M. F. S., da Silva Júnior, R. N., Damasceno, S. S., ... & de Macedo Rocha, D. (2019). Uso de Plantas Medicinais e Fitoterápicos na Atenção Primária à Saúde: uma revisão integrativa. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, (26), e828-e828. <https://doi.org/10.25248/reas.e828.2019>

de Prado, E. M. L., de Souza Oliveira, L. L., de Jesus Pereira, M., Simões, M. F., Baptista, R. M., Ribeiro, S. G., ... & Severi, J. A. (2020). Pesquisa de produtos naturais para cicatrização de feridas. *Tópicos Especiais em Ciência Animal IX*, 282.

de Queiroz, T. M., França, E. L. T., Silva, A. R. A., & Macêdo, A. A. M. (2012, August). Determinação da Atividade Antioxidante, *in vitro*, da casca de Ximenia americana L., pelo método DPPH. In *VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação*.

Dephillipo, N.N.; Aman, Z.S.; Kennedy, M.I.; Begley, J.P.; Moatshe, G.; Laprade, R.F. Efficacy of Vitamin C Supplementation on Collagen Synthesis and Oxidative Stress After Musculoskeletal Injuries: A Systematic Review. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, v.6, n.10, 2018. doi: 10.1177/2325967118804544

DiPietro, L. A., Wilgus, T. A., & Koh, T. J. (2021). Macrophages in healing wounds: paradoxes and paradigms. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 950. doi.org/10.3390/ijms22020950

do Nascimento, I. J. R., de Jesus, H. S., & de Oliveira Alvim, H. G. (2021). Uso dos taninos provenientes do barbatimão para cicatrização de ferimentos. *Revista JRG de Estudos Acadêmicos*, 4(8), 201-212.

dos Santos, J. C. D. P., de Almeida, S. L., Nogueira, A. F. A., Mbatna, A. J., do Nascimento Fernandes, M. R., Silva, C. M. L., ... & do Amaral, J. F. Plantas medicinais e fitoterapia: saúde, sustentabilidade e biodiversidade.

Dutra, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R., & Calixto, J. B. (2016). Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological research*, 112, 4-29. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>

Estevão, L. R. M., Simões, R. S., Cassini-Vieira, P., Canesso, M. C. C., Barcelos, L. D. S., Rachid, M. A., ... & Evêncio-Neto, J. (2017). *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) leaves oil attenuates inflammatory responses in cutaneous wound healing in mice. *Acta Cirurgica Brasileira*, 32, 726-735. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020170090000005>

Farahani, H., Barati, A., Arjomandzadegan, M., & Vatankhah, E. (2020). Nanofibrous cellulose acetate/gelatin wound dressing endowed with antibacterial and healing efficacy using nanoemulsion of *Zataria multiflora*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 762-773. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.175>

Favoretto, S. M.; Seabra, D. I.; Olivato, M. C. M. (2019). Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). 1ªed., v.1, 50p.

Fernandes Junior, A.; Lopes, M.M.R.; Colombari, V.; Monteiro, A.C.M.; Vieira, E.P. (2006). Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural*, v.36, n.1, p.294-297. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000100047>

Formenton, L.P., Ribeiro, C., Barsotti, N.S. (2020). O efeito bactericida da alta frequência no *Staphylococcus aureus*. *Revista Científica de Estética e Cosmetologia*. v.1, n.1, p.8-14. <https://doi.org/10.1590/S1809-29502012000200011>

Frachini, E. C. G., Alavarse, A. C., Silva, J. B., Ulrich, H., & Petri, D. F. S. (2021). Ensaio colorimétrico para determinação da viabilidade celular e citotoxicidade *in vitro*. In *9º Workshop do Programa de Mestrado Profissional Tecnologia em Química e Bioquímica da USP-AMPT*.

Frade Soares, L. F., Gomes Leite, A. R. T. H. U. R., & Sousa De Araújo, K. A. R. I. N. N. E. (2021). Potencial Terapêutico De Compostos De Urucum (*Bixa Orellana* L.) No Reparo De Tecidos. *Brazilian Journal Of Surgery & Clinical Research*, 36(2).

Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British journal of Nutrition*, 88(6), 587-605. <https://doi.org/10.1079/BJN2002725>

Furtado, R. A. A., Noletto, M. L. P., Pessoa, D. R., da Silva Almeida, V., Maia Filho, A. L. M., Uchôa, V. T., & dos Santos Alves, W. (2019). Ação do gel *Anacardium Occidentale* L. associado ao ultrassom terapêutico no processo de cicatrização em camundongos. *Saúde (Santa Maria)*, 15-15. <https://doi.org/10.5902/2236583435474>

Galeriani, T. M., Cosmo, B. M. N., & Beneton, A. M. G. Preparo de amostras de tecido vegetal. *Revista Agronomia Brasileira*, e-ISSN 2594-6781, Volume 4. doi: 10.29372/rab202013

Galeriani, T. M.; Cosmo, B. M. N.; Beneton, A. M. G. (2020). Preparo de amostras de tecido vegetal. *Revista Agronomia Brasileira*, v. 4. <https://doi.org/10.29372/rab202013>

Gambôa, D. S. R. (2023). *Potencial anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas de Indigofera suffruticosa Miller* (Bachelor's thesis).

Garlet, T. M. B. (2019). Plantas medicinais nativas de uso popular no Rio Grande do Sul [recurso eletrônico], Santa Maria, RS : UFSM, PRE.

Garlet, T. M. B., Mattos, J. P. O. D., & Martins, N. C. (2017). Plantas medicinais de emprego popular em Palmeira das Missões, RS.

Gonçalves, R. N.; Gonçalves, J. R. S. N.; Buffon, M. C. M.; Negrelle, R. R. B. (2018). Plantas medicinais: relacionando conhecimento popular e científico na atenção primária à saúde. *Visão Acadêmica*, v. 18, n. 4, p. 25-65. <https://doi.org/10.5380/acd.v18i4.56123>

Gonçalves, R.V.; Sarandy, M.M.; Matta, S.L.P.; Novaes, R.D.; Pinto, M.V.M. (2013). Comparative study of the effects of laser photobiomodulation and extract of *Brassica oleracea* on skin wounds in wistar rats: A histomorphometric study. *Pathology-Research and Practice*, v.209, n.10, p.648-543. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2013.07.006>

Gonzal, T. E., Flore, D. N. S., Donatien, A. A., William, N. Y., Herve, T. T., Vanessa, M. M. M., ... & Gilbert, A. (2020). *In vitro* anti-inflammatory, anti-oxidant and *in vivo* anti-arthritic properties of stem bark extracts from *Nauclea pobeguini* (Rubiaceae) in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 10(2), 65. DOI: 10.4103/2221-1691.275421

Gushiken, L. F. S., Beserra, F. P., Bastos, J. K., Jackson, C. J., & Pellizzon, C. H. (2021). Cutaneous wound healing: An update from physiopathology to current therapies. *Life*, 11(7), 665. <https://doi.org/10.3390/life11070665>

Halloran, C.M. Slavin, J.P. (2002). *Pathophysiology of Wound Healing*. Surgery (Oxford). The Medicine Publishing Company Ltd. 5(1):i-v. <https://doi.org/10.1383/surg.20.5.0.14629>

Hatanaka, E & Curi, R 2007 Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. *Rev. Bras. Farm.*, 88(2): 53-58.

Hossain, M. S., Asaduzzaman, M., Uddin, M. S., Noor, M. A. A., Rahman, M. A., Munira, M. S., & Asaduzzaman, M. (2015). Investigation of the *in vitro* antioxidant and cytotoxic activities of *Xanthosoma sagittifolium* leaf. *Indo Ame J Pharma Res*, 5(10), 3300.

Hossain, M. S., Uddin, M. S., Asaduzzaman, M., Munira, M. S., Uddin, M. J., Rafe, M. R., & Mosiqur, M. (2017). Inquiry of analgesic and antiinflammatory activities of *Xanthosoma sagittifolium* L.: an effective medicinal plant. *Journal of Coastal Life Medicine*, 5(1), 22-26.

Hummel, S. G., Fischer, A. J., Martin, S. M., Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2006). Nitric oxide as a cellular antioxidant: a little goes a long way. *Free radical biology and medicine*, 40(3), 501-506. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.047>

Imai, Y., Meyer, K. J., Iinishi, A., Favre-Godal, Q., Green, R., Manuse, S., ... & Lewis, K. (2019). A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature*, 576(7787), 459-464. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1791-1>

Irber, P. F. (2023). Efeito do laser sobre a cicatrização cutânea e nos parâmetros do estresse oxidativo: uma revisão sistemática. Dissertação de Mestrado.

Isaac, C., de Ladeira, P. R. S., do Rêgo, F. M. P., Aldunate, J. C. B., & Ferreira, M. C. (2010). Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Comunicação & Educação*, 89(3-4), 125-131.

Jing, L., Ma, H., Fan, P., Gao, R., & Jia, Z. (2015). Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 15, 287. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0820-3>

Jorge, N.; Ramalho, V. C. . Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 65, n. 1, p. 15– 20, 2006

Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2004). Histologia básica. In *Histologia básica* (pp. 512-512).

Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Neill, T., & Iozzo, R. V. (2019). Matrix modeling and remodeling: a biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. *Matrix Biology*, 75, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.08.007>

Kim, H., Wang, S. Y., Kwak, G., Yang, Y., Kwon, I. C., & Kim, S. H. (2019). Exosome-guided phenotypic switch of M1 to M2 macrophages for cutaneous wound healing. *Advanced science*, 6(20), 1900513. <https://doi.org/10.1002/adv.201900513>

Knottenbelt, D. C. (2013). Handbook of Equine Wound Management E-Book. Elsevier Health Sciences.

Kobayashi, B. F.; Amaral, D. R. (2018). Efeito de extratos vegetais de plantas do Cerrado para controle de pinta-preta em tomateiro. *Summa Phytopathologica* [online], v. 44, n. 2, pp. 189-192. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2194>

Kohn, H. I.; Liversedge, M. (1944). On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine and manadione. *J Pharmacol Experimen Ther.* 82:292-300.

Koneman, E.W. Allen, S.D.; Janda, W.M. et al. (2001). *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI. p.1465.

Lamounier, K. C., Cunha, L. C., de Moraes, S. A., de Aquino, F. J., Chang, R., do Nascimento, E. A., de Souza, M. G., Martins, C. H., & Cunha, W. R. (2012). Chemical Analysis and Study of Phenolics, Antioxidant Activity, and Antibacterial Effect of the Wood and Bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2012, 451039. <https://doi.org/10.1155/2012/451039>.

Leelaprakash, G., & Dass, S. M. (2011). *In vitro* anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(3), 189-196.

Lira, H. S. L., do Rêgo Neto, H. F. N., Neto, L. F. D. F. M., de Moraes Araujo, M. A., Mota, R. A. R., Monte, M. M., ... & de Araújo, K. S. (2020). Efeitos do uso de Aloe Vera na cicatrização de feridas. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, (53), e3571-e3571.

Lisboa Neto, J. D. A., Machado, J. L., Melo Junior, E. J. M. D., & Raposo, M. J. (1998). Avaliação do efeito cicatrizante da aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e do mastruço (*Chenopodium ambrosioides*) em feridas de extração dental em ratos: estudo histológico. *Rev. ABO nac*, 173-6.

MACEDO, Caio Felipe Pessoa de. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos de própolis brasileiras. 2021. 51 f., il. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) — Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

Mandelbaum, S.H.; DI Santis, E.P.; Mandelbaum, M.H.S. (2003). Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares -Partel. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.78, n.4, p.393-410. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962003000400002>.

Martelli, A., Andrade, T. A. M. D., & Santos, G. M. T. D. (2018). Perspectivas na utilização de fitoterápicos na cicatrização tecidual: revisão sistemática. *Arch Health Invest*, 7(8), 344-350. <http://dx.doi.org/10.21270/archi.v7i8.3047>

Massone, F., Nunes, A. L. V., Ambrosio, A. M., Aguiar, A. J. de A., Moraes, A. N. de, Valadão, C. A. A., et al. (2011). *Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas: texto e atlas colorido*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Mattosinhos, P. D. S., Sarandy, M. M., Novaes, R. D., Esposito, D., & Gonçalves, R. V. (2022). Anti-inflammatory, antioxidant, and skin regenerative potential of secondary metabolites from plants of the Brassicaceae family: A systematic review of in vitro and in vivo preclinical evidence (biological activities Brassicaceae skin diseases). *Antioxidants*, 11(7), 1346. <https://doi.org/10.3390/antiox11071346>

Medeiros, A. C.; Dantas-Filho, A. M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. *Journal Of Surgical And Clinical Research*, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 87–102, 2017. DOI: 10.20398/jscr.v7i2.11438. Disponível em: <https://periodicos.ufrn.br/jscr/article/view/11438>. Acesso em: 24 jun. 2023.

Mello, C.N. (2020). Produção de toxinas por *Staphylococcus* sp. isoladas de amostras de pele: uma revisão bibliográfica. 34f. Monografia (Biomedicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Mello, J., & Santos, S. (2010). Em Farmacognosia: da planta ao medicamento; Simões, CMO; Schenckel, EP, orgs. *UFSC: Porto Alegre*, 3.

Menezes, H. (2005). Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.72, n.3, p.405-411.

Menezes, L. K., Honorato, J. F. B., Zappani, N., Dreher, M., Bratkowski, P. R. G., & Rossi, E. M. (2021). Incidência de microrganismos multirresistentes em lesões de pele de pacientes hospitalizados / Incidence of multidrug-resistant microorganisms in skin lesions of hospitalized patients. *Brazilian Journal of Development*, 7(3), 31839–31855. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-753>

Moghadamtousi, S. Z., Rouhollahi, E., Hajrezaie, M., Karimian, H., Abdulla, M. A., & Kadir, H. A. (2015). *Annona muricata* leaves accelerate wound healing in rats via involvement of Hsp70 and antioxidant defence. *International Journal of Surgery*, 18, 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2015.03.026>

Nepomuceno, L. L., Carvalho, L. D., Soares, N. P., Cruz, V. D. S., Arnhold, E., Ferreira, J. L., ... & Samylla, M. C. S. (2021). Padronização metodológica *in vitro* do ensaio colorimétrico MTT para avaliação da atividade de formazan e dosagem do fármaco: padronização do teste colorimétrico MTT. *Farmacologia Aplicada à Enfermagem: Aspectos Teóricos e Práticos*, 149-161. DOI:[10.37885/201202541](https://doi.org/10.37885/201202541)

Nishanthini, A., & Mohan, V. R. (2012). Antioxidant activities of *Xanthosoma sagittifolium* Schott using various *in vitro* assay models. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 2(3), S1701-S1706.

Nishanthini, A., & Mohan, V. R. (2012). Antioxidant activities of *Xanthosoma sagittifolium* Schott using various *in vitro* assay models. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 2(3), S1701-S1706.

Noor, M. A. A., Islam, M. Z., Hosain, M. S., Sarwar, M. S., Rahman, M. M., Rashid, M., ... & Asaduzzaman, M. (2015). Analgesic and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Xanthosoma sagittifolium*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(3), 181-185.

Nyadanu, D., & Lowor, S. T. (2015). Promoting competitiveness of neglected and underutilized crop species: comparative analysis of nutritional composition of indigenous and exotic leafy and fruit vegetables in Ghana. *Genetic resources and crop evolution*, 62, 131-140. DOI:[10.1007/s10722-014-0162-x](https://doi.org/10.1007/s10722-014-0162-x)

Oliveira, I. V. P. M. & Dias, R. V. C. (2012). Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.6, n.4, p.267-271. <https://doi.org/10.21708/avb.2012.6.4.2959>

Oliveira, S.T.; Leme, M.C.; Pippi, N.L.; Raiser, A.G.; Manfron, M.P. (2000). Formulações de confrei na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. *Rev FZVA*, v.7/8, n.1, p.6474.

Oridupa, O. A., Folasire, O. F., & Owolabi, A. J. (2017). Evaluation of the sub-chronic toxicity profile of the corm of *Xanthosoma sagittifolium* on hematology and biochemistry of alloxan-induced diabetic Wistar rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14(2). <https://doi.org/10.1515/jcim-2016-0072>

Pagamicce, L. T., Rocha, R. G., da Silva, M. S. L. M., & da Mata, T. F. (2019). Programa de tratamento de feridas com fitoterápicos dentro das práticas integrativas e complementares. *Sínteses: Revista Eletrônica do SimTec*, (7), e019204-e019204.

Parente, L. M. L., Silva, M. S. B., Lino-Júnior, R. D. S., Paula, J. R., Trevenzol, L. M. F., Zatta, D. T., & Paulo, N. M. (2009). Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 11, 383-391. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000400005>

Passaretti, T., Guarnieri, A. P., Filipini, R., Alves, B. D. C. A., & Fonseca, F. L. A. (2016). Eficácia do uso do Barbatimão (*Stryfhnodendron barbatiman*) no processo de cicatrização em lesões: uma revisão de literatura. *ABCS Health Sciences*, 41(1). <https://doi.org/10.7322/abcs.hs.v41i1.846>

Patrício, K. P., Minato, A. C. D. S., Brolio, A. F., Lopes, M. A., Barros, G. R. D., Moraes, V., & Barbosa, G. C. (2022). O uso de plantas medicinais na atenção primária à saúde: revisão integrativa. *Ciência & Saúde Coletiva*, 27, 677-686. <https://doi.org/10.1590/1413-81232022272.46312020>

Perestrelo, B. D. O. (2018). *Potencial antioxidante do chá de camomila nas glândulas salivares e sua influência no estado glicêmico de ratos diabéticos* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Pires, J., Torres, P. B., Santos, D. Y. A. C., & Chow, F. (2017). Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, 12, 1-6.

Ponnusamy, Y., Chear, N. J. Y., Ramanathan, S., & Lai, C. S. (2015). Polyphenols rich fraction of *Dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation *in vitro*. *Journal of ethnopharmacology*, 168, 305-314. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.062>

Pristo, I. (2012). Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. *Acta Veterinaria Brasilica*, 6(4), 267-271. <https://doi.org/10.21708/avb.2012.6.4.2959>

Ramalho, M.; Santos, S.; Castro, N.; Vasconcelos, L.; Moraes, I.; Pessoa, C. (2018). Plantas Medicinais no Processo de Cicatrização de Feridas: Revisão de Literatura. *Revista Expressão Católica Saúde*. 3. 64. <https://doi.org/10.25191/recs.v3i2.2429>.

Ramos-e-Silva, M., & Castro, M. C. R. D. (2009). Fundamentos de dermatologia. In *Fundamentos de dermatologia* (pp. 1215-1215).

Raziyeva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., & Saparov, A. (2021). Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*, 11(5), 700. <https://doi.org/10.3390/biom11050700>

Rego, E. A. Avaliação da Actividade Anti-inflamatória de Plantas dos Açores. (2012). Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas). Universidade dos Açores. Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento, Ponta Delgada.

Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European surgical research*, 49(1), 35-43. <https://doi.org/10.1159/000339613>

Ribeiro, A.; Oliveira, B.; Soares, M.; Barrocas, D. (2012). Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática. *Revista Gaúcha de Enfermagem*. 33. 198-207. 10.1590/S1983-14472012000300026.

ROCHA, L. P. B. da .; ALVES , J. V. de O.; AGUIAR, I. F. da S. .; SILVA, F. H. da; SILVA, R. L. da; ARRUDA, L. G. de; NASCIMENTO FILHO, E. J. do; BARBOSA, B. V. D. da R. .; AMORIM, L. C. de; SILVA, P. M. da; SILVA, M. V. da. Use of medicinal plants: History and relevance. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 10, p. e44101018282, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i10.18282. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/18282>. Acesso em: 1 feb. 2024.

Rodriguez Veloso, A., Geronimo, E., Caroline Neves, A., Mendes de Jesus, A. G., Mandotti, F., Alvarenga dos Santos, G. H., ... & Zardeto, G. (2023). CULTIVO E USO RACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, 27(1). <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v27i1.2023.9068>

Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Sousa, C. A. S., & Pastore, G. M. (2007). Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Food Science and Technology*, 27, 53-60. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000100010>

Rozatto, M. R. (2012). Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de Arrabidaea brachypoda. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Araraquara-SP.

Sakat, S., Juvekar, A. R., & Gambhire, M. N. (2010). *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of Oxalis corniculata Linn. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2(1), 146-155. 10.1055/s-0029-1234983.

Santos, H. D. D. M., Fernandes, T. A. P., Diniz, C. M., Montenegro, W. T., & Figueiredo, A. R. P. (2006). Mitomicina C colírio como tratamento para granuloma piogênico em cavidade anoftálmica. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 69, 683-686.

Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007 Aug;42(4):321-4. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.01.006. PMID: 17560319; PMCID: PMC1895922.

Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Reprint of "Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays". *Journal of Functional Foods*, 18, 782-796. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.024>

Silva, Jéssica Rondoni (2019). Dissertação de Mestrado. Ácido graxo linoleico e cicatrização de feridas: enfoque na angiogênese – Limeira, SP : [s.n.], 2019.

Silva, T. É. D. (2022). Plantas medicinais e fitoterápicos na cicatrização de feridas cutâneas: uma revisão integrativa.

Silveira, P.; Bandeira, M.; Arrais, P. (2008). Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira De Farmacognosia-brazilian Journal of Pharmacognosy - REV BRAS FARMACOGN*. 18. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400021>.

Sorg, H., Tilkorn, D. J., Hager, S., Hauser, J., & Mirastschijski, U. (2017). Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. *European Surgical Research*, 58(1-2), 81-94. <https://doi.org/10.1159/000454919>

Souza-Moreira, T. M., Salgado, H., & Pietro, R. C. (2010). O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de farmacognosia*, 20, 435-440. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300023>

Teixeira, S.F.N. (2021). Infecções da pele causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa (Portugal).

Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*, 97, 4-27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>

Torres, S. B., de Queiroz, A. L. F. G., dos Santos, A. N. A., Alves, G. Q., da Silva, I. A., Brito, J. K. C., ... & Monteiro, A. C. S. (2021). Óleo de girassol (*Helianthus annuus* L.) como cicatrizante de feridas em idosos diabéticos. *Brazilian Journal of Health Review*, 4(2), 4692-4703.

Tortora, G. J., & Derrickson, B. H. (2018). *Principles of anatomy and physiology*. John Wiley & Sons.

Valli, M., Russo, H. M., & Bolzani, V. S. (2018). The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(1), 763-778. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170653>

Veiga-Junior VF & Pinto AC 2002. O gênero *Copaifera* L. *Quim. Nova* 25:273- 286

Watson, W. H., Ritzenthaler, J. D., & Roman, J. (2016). Lung extracellular matrix and redox regulation. *Redox biology*, 8, 305-315. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.02.005>

Webster, D., Taschereau, P., Belland, R. J., Sand, C., & Rennie, R. P. (2008). Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *Journal of ethnopharmacology*, 115(1), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.09.014>

Yadav, E., Singh, D., Yadav, P., & Verma, A. (2017). Attenuation of dermal wounds via downregulating oxidative stress and inflammatory markers by protocatechuic acid rich n-butanol fraction of *Trianthema portulacastrum* Linn. in wistar albino rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 86-97. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.125>

Zhang, X., Qin, M., Xu, M., Miao, F., Merzougui, C., Zhang, X., ... & Huang, D. (2021). The fabrication of antibacterial hydrogels for wound healing. *European Polymer Journal*, 146, 110268. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110268>.

ANEXO A – Certificado CEUA - UFV**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 05/2021, intitulado “**Atividade antibacteriana e cicatrizante de extratos de plantas de uso doméstico *in vitro* e em feridas cutâneas induzidas em ratos**”, coordenado pela professora Virgínia Ramos Pizziole do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTIC, a DBA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTIC, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 07/04/2021, com validade de 2 anos.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 05/2021, named “**Antibacterial and healing activity of plant extracts for domestic use *in vitro* and in skin wounds induced in rats**”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008, Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTIC, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on April 07, 2021 valid for 2 years.



Prof. ^a Mariella Bontempo Duca de Freitas
Coordenadora
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

ANEXO B – Processo de depósito de pedido de patente

30/01/2024 16:15 870240008247

29409162313915260

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 001932 6