

GISLAINE APARECIDA PURGATO

AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS E DA POMADA DE FOLHAS DE *Heteropterys brasiliensis* PARA A ATIVIDADE CICATRIZANTE: UM ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO*

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: Marisa Alves Nogueira Diaz

Coorientadores: Gaspar Diaz Muñoz
Reggiani Vilela Gonçalves
Mariáurea Matias S. Souza

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

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

T

P985a
2023

Purgato, Gislaine Aparecida, 1994-
Avaliação dos extratos e da pomada de folhas de *Heteropterys brasiliensis* para a atividade cicatrizante: um estudo *in vitro* e *in vivo* / Gislaine Aparecida Purgato. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (77 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

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

Referências bibliográficas: f. 68-76.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.140>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Malpighiaceae - Uso terapêutico. 2. Antioxidantes.
3. Ferimentos e lesões - Tratamento. 4. Células - Proliferação.
5. Fibroblastos. I. Diaz, Marisa Alves Nogueira, 1960-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 615.32279


GISLAINE APARECIDA PURGATO

AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS E DA POMADA DE FOLHAS DE *Heteropterys brasiliensis* PARA A ATIVIDADE CICATRIZANTE: UM ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO*


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: 28 de fevereiro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 GISLAINE APARECIDA PURGATO
Data: 24/03/2023 17:13:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Gislaine Aparecida Purgato
Autora

Documento assinado digitalmente
 MARISA ALVES NOGUEIRA DIAZ
Data: 04/04/2023 13:19:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Marisa Alves Nogueira Diaz
Orientadora

*A memória da minha avó Belinha;
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por todas as bênçãos alcançadas.

Aos meus pais, Valter e Rosilene, pelo incentivo, carinho e amor.

Aos meus irmãos, Victor e Vitória, por fazerem parte da minha vida e por todas partilhas.

Ao meu esposo, Vitor, pelo companheirismo, paciência, cuidado e por acreditar em mim.

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

À minha orientadora, Professora Marisa Alves Nogueira Diaz, pela dedicação, confiança depositada e toda sabedoria transmitida.

À minha coorientadora, Professora Reggiani Vilela Gonçalves, pelo suporte oferecido e contribuição no desenvolvimento dessa pesquisa.

À minha coorientadora, Dr^a. Mariáurea Matias Sarandy Souza, pelo acolhimento, cuidado e acompanhamento de perto de todo andamento da pesquisa.

Ao meu coorientador, Professor Gaspar Diaz Muñoz, pelo auxílio nas pesquisas.

À Professora Virgínia Ramos Pizziolo pela ajuda na elaboração da pesquisa e pela tranquilidade transmitida.

Aos membros da banca pela participação e por todas as contribuições no 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, em especial Matheus, Mariá, Marcela e Mayra por contribuírem diretamente nos resultados dessa pesquisa.

Aos estudantes e pesquisadores que dedicaram seu tempo em me auxiliar na realização dos experimentos *in vivo*.

Ao Grupo de Estudos em Bioquímica Aplicada (GEBQI) por me proporcionar momentos de aprendizado e troca de conhecimento além do ambiente acadêmico.

Aos amigos do grupo Patomol por todo apoio para a finalização deste trabalho.

Aos amigos, em especial Laís, Isabela, Fernanda, Geís, Larissa, Iorrana por todos os momentos vividos e por toda a colaboração.

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

Às agências de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, em especial ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, a todos que de alguma forma colaboraram e se fizeram presentes, meu muito obrigada.

“Ao menor sinal de amor, retribua”.
(Talita Galhardo)

RESUMO

PURGATO, Gislaine Aparecida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Avaliação dos extratos e da pomada de folhas de *Heteropterys brasiliensis* para a atividade cicatrizante: um estudo *in vitro* e *in vivo***. Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Mariáurea Matias Sarandy Souza, Reggiani Vilela Gonçalves e Gaspar Diaz Muñoz.

O território brasileiro apresenta a maior biodiversidade do planeta, porém pouco desse arsenal de plantas é devidamente estudado quanto as suas propriedades farmacológicas. Nativa da Mata Atlântica e com risco de extinção, *Heteropterys brasiliensis* é uma planta utilizada pela medicina tradicional e que não apresenta relatos científicos que comprove seu potencial farmacológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial cicatrizante de extratos vegetais de *H. brasiliensis*, *in vitro* e *in vivo*, assim como atividades farmacológicas relacionadas a uma melhor cicatrização: atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante. Os extratos hexânico e etanólico tiveram sua atividade antibacteriana avaliada pelo teste de concentração inibitória mínima (CIM) contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. A atividade anti-inflamatória foi avaliada *in vitro* pela capacidade de inibir a desnaturação de proteínas e pela produção de óxido nítrico induzido por lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos. O potencial cicatrizante foi avaliado *in vitro*, pela proliferação, citoproteção e migração de fibroblastos NIH/3T3 e macrófago RAW 264.7. Pomadas foram formuladas com o extrato etanólico nas concentrações de 5 e 10% (m/m). Seu potencial cicatrizante foi então, avaliados *in vivo* quanto ao índice de contração da ferida, avaliação histológica e parâmetros bioquímicos e hematológicos. Além disso, foi determinado a atividade antioxidante tecidual através das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e marcadores como, óxido nítrico (NO) e malondialdeído (MDA). Os resultados demonstraram que os extratos de *H. brasiliensis* apresentaram atividade antibacteriana, principalmente para bactérias gram-positivas. O extrato hexânico demonstrou um maior potencial anti-inflamatório, *in vitro*. Os extratos foram eficazes de promover a proliferação celular e migração celular, tendo o extrato etanólico apresentado os melhores resultados nos testes *in vitro*. No experimento *in vivo*, as pomadas foram eficientes em promover a contração da ferida, aumentar a proliferação

celular e neovascularização, bem como reduzir a resposta inflamatória e o estresse oxidativo. Em conclusão, as pomadas formuladas com o extrato de *H. brasiliensis* foi eficiente no controle do processo inflamatório, oxidativo e atuou na promoção do fechamento rápido e eficaz das feridas induzidas em camundongos.

Palavras-chave: Malpighiaceae. Antioxidante. Ferida. Proliferação. Fibroblasto.

ABSTRACT

PURGATO, Gislaine Aparecida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Evaluation of *Heteropterys brasiliensis* leaf extracts and ointment for healing activity: an *in vitro* and *in vivo* study.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Mariáurea Matias Sarandy Souza, Reggiani Vilela Gonçalves and Gaspar Diaz Muñoz.

The Brazilian territory has the greatest biodiversity on the planet, but little of this arsenal of plants is properly studied in terms of their pharmacological properties. Native to the Atlantic Forest and at risk of extinction, *Heteropterys brasiliensis* is a plant used by traditional medicine and that does not present scientific reports that prove its pharmacological potential. The objective of this work was to evaluate the healing potential of plant extracts *H. brasiliensis*, *in vitro* and *in vivo*, as well as pharmacological activities related to better healing: antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity. The hexane and ethanolic extracts had their antibacterial activity evaluated by the minimum inhibitory concentration (MIC) test against gram-positive and gram-negative bacteria. The anti-inflammatory activity was evaluated *in vitro* by the ability to inhibit protein denaturation and by the production of nitric oxide induced by lipopolysaccharide (LPS) in macrophages. The healing potential was evaluated *in vitro*, by the proliferation, cytoprotection and migration of fibroblasts NIH/3T3 and macrophage RAW 264.7. Ointments were formulated with the ethanolic extract at concentrations of 5 and 10% (w/w). Its healing potential was then evaluated *in vivo* regarding the wound contraction index, histological evaluation and biochemical and hematological parameters. In addition, tissue antioxidant activity was evaluated using the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and markers such as nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA). The results showed that *H. brasiliensis* extracts showed antibacterial activity, mainly against gram-positive bacteria. The hexane extract showed a greater anti-inflammatory potential *in vitro*. The extracts were effective in promoting cell proliferation and cell migration, with the ethanolic extract having the best results in *in vitro* tests. In the *in vivo* experiment, the ointments were efficient in promoting wound contraction, increasing cell proliferation and neovascularization, as well as reducing the inflammatory response and oxidative stress. In conclusion, the ointments formulated with the extract of *H.*

brasiliensis were efficient in controlling the inflammatory and oxidative process and acted in promoting the fast and effective closure of the wound.

Keywords: Malpighiaceae. Antioxidant. Wound. Proliferation. Fibroblast.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espécie vegetal <i>Heteropterys brasiliensis</i>	19
Figura 2. Desenho experimental da avaliação cicatrizante das pomadas de <i>Heteropterys brasiliensis</i> nas concentrações de 5% e 10% (m/m), <i>in vivo</i>	33
Figura 3. Determinação da área da ferida por medição com paquímetro.....	34
Figura 4. Inibição da desnaturação proteica.....	40
Figura 5. Produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 tratados com dexametasona (controle positivo), extrato hexânico e etanólico de <i>Heteropterys brasiliensis</i> e LPS (controle negativo).....	41
Figura 6. Taxa de eliminação percentual do radical DPPH.....	42
Figura 7. Proliferação celular de macrófagos RAW 264.7 (A) e de fibroblastos NIH/3T3 (B) na presença do extrato hexânico e etanólico de <i>Heteropterys brasiliensis</i>	43
Figura 8. Efeito citoprotetor do extrato etanólico e hexânico de <i>Heteropterys brasiliensis</i> em macrófagos RAW 264.7 (A) e de fibroblastos NIH/3T3 (B).....	45
Figura 9. Efeito do extrato etanólico de <i>Heteropterys brasiliensis</i> sobre a taxa de migração celular de macrófagos RAW 264.7.....	47
Figura 10. Efeito do extrato etanólico de <i>Heteropterys brasiliensis</i> sobre a taxa de migração celular de fibroblastos NIH/3T3.....	49
Figura 11. Evolução do processo de cicatrização de feridas induzidas em camundongo não tratados e tratados com a pomada contendo o extrato etanólico de <i>Heteropterys brasiliensis</i> nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias.....	52
Figura 12. Efeito da pomada contendo o extrato etanólico de <i>Heteropterys brasiliensis</i> sobre o percentual de celularidade nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias	53
Figura 13. Efeito das pomadas contendo o extrato etanólico de <i>Heteropterys brasiliensis</i> sobre o percentual de vasos sanguíneos nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias....	54

Figura 14. Análise hematológica dos animais durante o tratamento das feridas pomadas contendo o extrato etanólico de <i>Heteropterys brasiliensis</i> nos tempos 3, 8 e 12 dias.....	55
Figura 15. Efeito da pomada contendo extrato etanólico de <i>Heteropterys brasiliensis</i> sobre a concentração tecidual de malondialdeído (MDA) ($\mu\text{mol/L/mg}$ de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias.....	56
Figura 16. Efeito da pomada contendo extrato etanólico de <i>Heteropterys brasiliensis</i> sobre a concentração tecidual de óxido nítrico malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias	57
Figura 17. Efeito da pomada contendo extrato etanólico de <i>Heteropterys brasiliensis</i> sobre atividade da enzima catalase (CAT) (U/mg de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias.....	58
Figura 18. Efeito da pomada contendo extrato etanólico de <i>Heteropterys brasiliensis</i> sobre atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (U/mg de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias.....	59
Figura 19. Efeito da pomada contendo extrato etanólico de <i>Heteropterys brasiliensis</i> sobre atividade da enzima glutatona S-transferase (GST) (U/mg de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos hexânico e etanólico frente as bactérias *Enterobacter* ATCC 29004, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 29214, *Staphylococcus epidermidis* C213 e *Staphylococcus aureus* (3008, 3828, 3917, 4157, 4182 e ATCC 33591).....39

Tabela 2. Irritação dérmica aguda da pomada contendo o extrato de *Heteropterys brasiliensis* na concentração de 10%.....50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CNDB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS/UFV	Laboratório de Análises Clínicas
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ERO	Espécies reativas de oxigênio
G1	Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada
G2	Grupo controle com pomada comercial – Sulfadiazina de prata
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
PBS	Tampão fosfato salino
PEG	Polietilenoglicol
RAW 264.7	Células de macrófagos murinos
SBF	Soro fetal bovino
SDS	Lauryl sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético

TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TMPO	N-oxil-2,2,2,6,6-tetrametilpiperidima
U	Unidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFV	Universidade Federal de Viçosa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Coleta e preparo dos materiais vegetais.....	24
3.2. Avaliação da atividade antibacteriana	24
3.3. Avaliação do potencial anti-inflamatório dos extratos <i>in vitro</i>	25
3.3.1. Inibição de desnaturação da proteína na presença dos extratos.....	25
3.3.2. Produção de óxido nítrico em macrófagos na presença do extrato.....	26
3.4. Avaliação antioxidante dos extratos <i>in vitro</i>	27
3.4.1. Ensaio de DPPH.....	27
3.5. Avaliação <i>in vitro</i> do efeito cicatrizante	27
3.5.1. Ensaio de viabilidade celular.....	27
3.5.2. Efeito citoprotetor dos extratos.....	28
3.5.3. Avaliação do potencial cicatrizante por scratch assay.....	29
3.6. Preparo das pomadas.....	30
3.7. Avaliação <i>in vivo</i> do efeito cicatrizante	30
3.7.1. Desenho experimental.....	30
3.7.1.1. Animais.....	30
3.7.1.2. Toxicidade dérmica aguda.....	31
3.7.1.3. Procedimento cirúrgico.....	31
3.7.1.4. Grupos experimentais.....	32
3.7.1.5. Eutanásia.....	32
3.7.2. Análises macroscópicas das feridas.....	33
3.7.3. Análises histológicas.....	34
3.7.4. Análises hematológicas.....	35
3.8. Avaliação do perfil oxidativo tecidual	35
3.8.1. Concentração de malondialdeído (MDA).....	35
3.8.2. Dosagem de nitrito e nitrato.....	35
3.8.3. Atividade de superóxido dismutase (SOD).....	36
3.8.4. Atividade de catalase (CAT).....	36
3.8.5. Dosagem de glutathione S transferase (GST).....	36

3.8.6. Dosagem de proteínas totais.....	36
3.9. Análises estatísticas	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Atividade antibacteriana.....	38
4.2. Avaliação do potencial anti-inflamatório dos extratos <i>in vitro</i>	39
4.2.1. Inibição de desnaturação da proteína.....	39
4.2.2. Efeito dos extratos na produção de óxido nítrico.....	40
4.3. Potencial antioxidante dos extratos pelo ensaio de DPPH	41
4.4. Atividade cicatrizante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	42
4.4.1. Efeito dos extratos na proliferação celular <i>in vitro</i>	42
4.4.2. Efeito citoprotetor dos extratos.....	44
4.4.3. Potencial cicatrizante <i>in vitro</i> do extrato por scratch assay.....	45
4.4.4. Toxicidade dérmica aguda.....	50
4.4.5. Área e índice de contração da ferida.....	50
4.4.6. Análise histológica.....	52
4.4.7. Análises hematológicas.....	54
4.5. Perfil oxidativo tecidual	55
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO A	77

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo, devido sua grande extensão territorial e os diferentes habitats nos quais as plantas tiveram que se adaptar ao longo de sua evolução. Esse arsenal de espécies vegetais torna o país com o maior potencial para descobertas de novos fármacos (DUTRA et al., 2016). Apesar da flora brasileira possuir uma extraordinária diversidade química, dificilmente encontramos na literatura espécies vegetais brasileiras exaustivamente estudadas e que tenham tido seu potencial devidamente avaliado, por meio de ensaios farmacológicos (VALLI et al., 2018).

A biodiversidade brasileira é distribuída em seis biomas terrestres (Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Pampas) possuindo uma área territorial total de 8.511.996 km². Sendo que, a Mata Atlântica é um bioma que apresenta uma perda acelerada de diversidade biológica causada pela agricultura, pecuária e urbanização. Essa área é considerada hotspot de biodiversidade e contém várias espécies ameaçadas de extinção em um futuro próximo. A perda de espécies endêmicas desse ambiente acarretaria privação do conhecimento biológico e das atividades farmacológicas a elas associadas, visto que, apenas 0,5% das aproximadamente 300.000 espécies de plantas da região são catalogadas (VALLI et al., 2018). O conjunto desses fatores revela a necessidade de se pesquisar o potencial farmacológico das espécies vegetais brasileiras da Mata Atlântica, e assim transformar as plantas em produtos de valor comercial (BRANDÃO et al., 2008).

Dentre a infinidade de plantas endêmicas no hotspot mundial que é Mata Atlântica, se encontra *Heteropterys brasiliensis* (Figura 1). A espécie pertence à família Malpighiaceae, do gênero *Heteropterys*. Classificada como uma liana, *H. brasiliensis* é nativa e endêmica do Brasil, mais precisamente na região sudeste (PESSOA et al., 2022). A planta foi categorizada em perigo de extinção, pois suas subpopulações estão sujeitas a pressões antrópicas, como supressão de vegetação, fragmentação florestal, poluição e contaminação do ambiente (CNCFlora, 2022). Popularmente conhecida como douradinho, a espécie é utilizada pela medicina popular como depurativo, anti-inflamatório e cicatrizante na comunidade de Ubá Pequeno, Ubá – MG, *H. brasiliensis* não há nenhum relato científico sobre seu potencial efeito farmacológico.



Figura 1. Espécie vegetal *Heteropterys brasiliensis*.

Espécies do mesmo gênero, como *Heteropterys tomentosa*, conhecida tradicionalmente como nó-de-cachorro, é amplamente utilizada pela medicina popular da região Centro-Oeste por apresentar propriedades afrodisíacas, depurativa e revigorantes físico e mental. Relatos científicos comprovam a redução da fadiga, esgotamento mental e melhora física no uso de *H. tomentosa* (DA SILVA et al., 2022; MENDES & RODRIGUES, 2018). Além disso, Palazzo e colaboradores (2000) verificou o efeito cicatrizante da espécie em ratos ulcerados. No estudo foi testada uma pomada de extrato de nó-de-cachorro a 1% em feridas abertas em ratos para avaliar o poder de cicatrização da mesma, comparando-a com pomada de Nebacetin® como controle positivo. Os resultados demonstraram que a pomada teste a 1% apresentou, de forma semelhante, a mesma atividade que as pomadas nas concentrações de 2,5 e 5% e o controle positivo. *Heteropterys brachiata* outra espécie do gênero também foi descrita por apresentar atividade anti-HIV e antifúngica (HUERTA-REYES, 2021).

Embora já se tenha estudos científicos com atividades farmacológicas para o gênero *Heteropterys*, se faz necessário relatos científicos que comprovem o uso na medicina tradicional de *H. brasiliensis* de forma que contribua para a preservação da espécie e conseqüentemente ao arsenal químico a ela associado. Dentre as infinidades de atividades farmacológicas, as plantas podem, incluindo *H. brasiliensis*,

serem avaliadas quanto ao seu poder cicatrizante, anti-inflamatório, antioxidante e antibacteriano.

O processo de cicatrização de feridas compreende uma complexa e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido. Tal evento é dinâmico, interdependente e envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos de forma simultânea, a fim de garantir a restauração tissular (GUSHIKEN et al., 2021). O complexo evento de cicatrização pode ser dividido em três fases: inflamação, proliferação e remodelação tecidual (CAN & THAO, 2020).

A fase inflamatória começa imediatamente após a lesão, juntamente com hemostasia, sendo que a última precede a inflamação. Nesta etapa, a ruptura obrigatória dos vasos expõe o colágeno subendotelial às plaquetas e resulta na agregação de plaquetas e ativação da parte intrínseca da cascata de coagulação. O coágulo então formado localmente serve como um andaime para células invasoras como neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais (WITTE & BARBUL, 1997). Neutrófilos são as primeiras células a chegar à ferida, com maior concentração 24 horas após a lesão. São atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas por plaquetas. Os neutrófilos são responsáveis pelo desbridamento do tecido lesionado, fagocitose de agentes infecciosos e ativam a chamada "explosão respiratória" produzindo radicais livres essenciais para a proteção contra bactérias e outros microrganismos invasores. A presença de radicais livres resulta em estresse oxidativo levando à peroxidação lipídica, quebra de DNA e inativação enzimática, incluindo as enzimas que limitam os efeitos de espécies reativas de oxigênio, podendo desta forma, provocar danos às células presentes no tecido cicatricial e comprometer o processo de reparo (MAVER et al., 2015; SIES et al., 2017). Essas células são gradativamente substituídas por macrófagos. Os macrófagos são as principais células antes dos fibroblastos migrarem. Têm papel fundamental no término do desbridamento iniciado pelos neutrófilos e sua maior contribuição é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, fundamentais para a transição para a fase proliferativa (CASAO et al., 2020; SZWED & SANTOS, 2016).

Na fase proliferativa, o aumento e migração de fibroblastos e queratinócitos desempenham um papel fundamental. Os fibroblastos são células predominantes no local da ferida nesta fase, responsáveis pela nova produção de colágeno e da matriz

derivada de plaquetas e do plasma, dando origem ao tecido de granulação (CAN & THAO, 2020). Nesse tecido muito frágil observa-se a proliferação de células endoteliais, com formação de nova vascularização, infiltração densa de macrófagos e uma matriz extracelular composta principalmente por fibras colágenas do tipo III, que ajuda a proteger a ferida de mais danos (LANDÉN et al., 2016; MARIA DE FATIMA et al., 2008).

A fase de remodelação pode ocorrer por vários meses ou até anos, envolvendo mudança nos componentes da matriz extracelular no local da ferida e restauração de cerca de 80% da resistência à tração da pele normal (CAN & THAO, 2020). Inicialmente, na remodelação ocorrem etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. O colágeno tipo III vai sendo degradado mais ativamente com o decorrer do tempo, enquanto o colágeno tipo I vai tendo sua produção aumentada pelos fibroblastos, conferindo a matriz força e resistência (LANDÉN et al., 2016; SINGER & CLARK, 1999). Com o decorrer do processo de maturação, a maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem do local da ferida mediante processos de migração ou apoptose. Com isso, ocorre redução do volume da cicatriz e mudança gradual da coloração da ferida, passando do vermelho ao róseo pálido, o que caracteriza o processo final de cicatrização (JOHNSTON, 1990).

Apesar do processo cicatricial ocorrer de forma natural, alguns fatores podem causar interferência e agravamento das feridas, como a faixa etária, o estado nutricional, a existência de doenças como diabetes, alterações de coagulação sanguínea e problemas cardiovasculares. Além disso, o uso de medicamentos como anti-inflamatórios, antibióticos e quimioterápicos podem afetar a cicatrização (MANDELBAUM et al., 2003). Desta forma, a ferida pode tornar-se crônica, causando ao indivíduo desconforto e dor, e podendo evoluir para casos mais graves, como amputação, sepse e até mesmo a morte (STANOJCIC et al., 2018). Diante disso, torna-se necessário a utilização de uma terapia que diminua o tempo de cura das feridas, evitando piora do quadro clínico e dando uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

Várias opções de tratamento estão disponíveis para o manejo da ferida (analgésicos, antibióticos e anti-inflamatórios não esteroides), mas os métodos atuais não têm sido efetivos em vários casos (BRODERICK, 2009; PONNUSAMY et al., 2015). Por exemplo, a utilização de antibióticos em feridas não infectadas pode causar

efeito citotóxico sobre fibroblasto e queratinócitos, adicionalmente seu emprego na terapia preventiva em ferida não infectada contribui para o aumento da resistência bacteriana (ALTOÉ et al., 2019). Nos últimos anos, estudos têm sido realizados sobre medicamentos à base de plantas para explicar seu potencial no tratamento de feridas e esses remédios naturais comprovaram sua eficácia como uma terapia alternativa às drogas sintéticas disponíveis no mercado (NAGAR et al., 2016). Relatórios recentes sugerem que as plantas atuam em diferentes mecanismos de cicatrização de feridas devido suas atividades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias. Além disso, elas atuam na estimulação no DNA e síntese proteica, proliferação de células de epitélio, formação de colágeno e angiogênese (CAN & THAO, 2020; THANGAPAZHAM et al., 2016).

Dessa forma, baseado na importância de terapias eficazes para contribuir na redução do problema de saúde pública que é o tratamento de feridas cutâneas e a necessidade de explorar quanto ao potencial farmacológico a rica biodiversidade brasileira. A espécie *H. brasiliensis* se torna um alvo de investigação quanto as suas atividades farmacológicas, podendo auxiliar para o processo de cicatrização de feridas seja por meio de uma capacidade antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante e/ou atuante diretamente no próprio processo cicatricial.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade cicatrizante, antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante, *in vitro* e *in vivo*, dos extratos e das pomadas obtidas das folhas de *Heteropterys brasiliensis*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos em bactérias gram-positivas e gram-negativas;
- Determinar o potencial anti-inflamatório dos extratos vegetais, *in vitro*;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos, *in vitro*;
- Avaliar o efeito dos extratos obtidos quanto a atividade proliferativa e migratória *in vitro*, em culturas de células de fibroblastos e macrófagos murinos;
- Avaliar *in vitro* o efeito citoprotetor dos extratos, em culturas de células de fibroblastos e macrófagos murinos;
- Avaliar a toxicidade dérmica aguda da formulação na forma de pomada contendo o extrato;
- Avaliar o efeito cicatrizante do extrato ativo formulado como pomada em modelo *in vivo*, através do índice de contração da ferida e análise histomorfométrica de vasos sanguíneos e celularidade.
- Avaliar possíveis alterações nos parâmetros hematológicos dos animais tratados com as formulações contendo o extrato ativo;
- Avaliar o perfil oxidativo tecidual das formulações contendo o extrato ativo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta e preparo dos materiais vegetais

As folhas de *H. brasiliensis* foram coletadas na região de Ubá – MG. O material vegetal foi identificado por Dr. Rafael Felipe de Almeida e depositado no Herbário VIC - Viçosa - MG, Brasil; Departamento de Biologia Vegetal – UFV. Voucher N° VIC: 53.719.

As folhas foram lavadas exaustivamente com água corrente. Estas foram secas a 40°C em estufa de circulação de ar por 72 h. Em seguida, as folhas foram trituradas e colocadas em contato com os solventes extratores hexano e após etanol 95% por 24 h. Os macerados obtidos foram concentrados em evaporador rotativo até a retirada total do solvente. Esse processo foi repetido exaustivamente até completa extração dos metabólitos da planta. Posteriormente, os extratos foram liofilizados e armazenados a 4°C.

3.2. Avaliação da atividade antibacteriana

O potencial antibacteriano dos extratos foi investigado através de sua determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para as seguintes cepas bacterianas: *Enterobacter* ATCC 29004, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 29214, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* C213, *Staphylococcus aureus* 3828, *Staphylococcus aureus* 4157, *Staphylococcus aureus* 4182, *Staphylococcus aureus* 3008 e *Staphylococcus aureus* 3917.

Para este teste foi realizada a metodologia padronizada de microdiluição em caldo Mueller Hinton (MH; Himedia®), em microplacas de 96 cavidades (CLSI, 2012). Primeiramente, foi realizada uma diluição seriada dos extratos, onde a 100 µL de meio de cultura MH foram adicionados 100 µL de extrato ou óleo; desta solução, 100 µL foram retirados e homogeneizados com 100 µL de meio de cultura na cavidade seguinte, e assim sucessivamente, obtendo-se uma série de concentrações de extratos (inicialmente a 5,0 mg/mL) diluída em razão 2 (2,5 mg/mL na segunda cavidade; 1,25 mg/mL na terceira cavidade, e assim sucessivamente). Posteriormente, foram adicionados em 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®), sem extrato na concentração

final de 5% e como controle positivo foram adicionados 10 µL de cefoperazone (CEFAMIX; SWISSBRAS CHEMICAL LTDA). As microplacas foram mantidas em estufa de crescimento a 37 °C por 24h. Após incubação, foram adicionados 20 µL de resazurina (0,5 mg/mL). As microplacas foram incubadas por mais 3 horas.

A determinação da CIM foi qualitativa e visual, uma vez que os poços com bactérias não viáveis permaneceram com a coloração azul e os poços com bactérias viáveis ficaram com a coloração rósea a transparente. Considera-se o valor do CIM a concentração do material no poço com coloração azul seguido por um poço com crescimento bacteriano (rósea a incolor). Os testes foram realizados em triplicata, e o resultado foi a média das replicatas seguido do desvio-padrão amostral.

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

O potencial anti-inflamatório dos extratos foi avaliado *in vitro*, através da inibição da desnaturação de proteína e pela inibição da produção de óxido nítrico (NO) induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos.

3.3.1. Inibição de desnaturação da proteína na presença dos extratos

A metodologia empregada foi descrita por Vicente (2018), com modificações. Primeiramente, foi adicionado 250 µL de solução BSA (bovine serum albumin) 1% com 250 µL de amostra na concentração desejada, e foi incubado durante 20 minutos a 20 °C, e posteriormente a 72 °C, durante 10 minutos. Por fim, juntou-se 1 mL de tampão fosfato sódico 66 mM pH 5,3, e leu-se a absorbância a 660 nm. Foram testadas as concentrações de 0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 2,5 mg/mL e 5 mg/mL dos extratos hexânicos e etanólicos. Foi utilizado a fórmula:

$$\text{Inibição desnaturação de proteína (\%)} = \frac{(A0 - A1)}{A0} \times 100$$

Em que o A0 é a absorbância do controle (com o volume de amostra substituído por tampão) e o A1 a absorbância da amostra. Como controle positivo foi utilizado o diclofenaco de sódio.

3.3.2. Produção de óxido nítrico em macrófagos na presença do extrato

Neste ensaio, foram utilizadas células de macrófagos de murino (RAW 264.7), cultivadas a 37°C em atmosfera umedecida e 5% de CO₂. Para o crescimento e manutenção das células foi utilizado o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo penicilina (1,60 mg/mL), estreptomicina (0,40 mg/mL) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF).

Neste teste, 200 µL de meio DMEM e células RAW 264.7 na concentração de 1,0x10⁵ células/poço foram distribuídas em microplacas de 96 poços e incubadas a 37 °C durante 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade para adesão das células, restabelecimento do crescimento e início de formação das camadas celulares. Após esse período, o meio de cultivo foi removido, as células foram tratadas com 200 µL de soluções de diferentes concentrações (400 a 25 µg/mL) do extrato juntamente com LPS 10 µg/mL, posteriormente foram novamente incubadas em estufa por 24 horas. Os controles deste ensaio foram realizados adicionando apenas o meio de cultura nos poços e meio de cultura acrescido de LPS 10 µg/mL para determinar a produção de NO nas células tratadas e não tratadas com LPS. O controle negativo foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) 0,8% sem LPS 10 µg/mL, mesma concentração de DMSO utilizada para solubilização dos extratos. O controle positivo foi utilizado dexametasona 200 µg/mL LPS com 10 µg/mL.

Como parâmetro da síntese de NO, as concentrações de nitrito foram dosadas no sobrenadante das culturas celulares de macrófagos RAW 264.7 pelo método de Griess (1879). Foram usados 50 µL do sobrenadante das culturas celulares e combinados com solução de Griess contendo: 50 µL de sulfanilamida (1% em H₃PO₄ a 2,5%) e 50 µL dihidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamino (0,1% em H₃PO₄ a 2,5%), em uma placa de 96 poços, em seguida submetida à medida em espectrofotômetro em 540 nm, usando leitor de microplaca. As concentrações de nitrito no sobrenadante foram determinadas pela medida comparativa com uma curva padrão de nitrito de sódio com concentrações de 2,5 a 2500 µM. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4. Avaliação antioxidante dos extratos *in vitro*

A atividade antioxidante dos extratos de *H. brasiliensis* foi avaliada pelo ensaio de DPPH que mede a capacidade dos compostos presentes nos extratos em inibir a ação de radicais livres.

3.4.1. Ensaio de DPPH

O ensaio mede a capacidade inibitória dos extratos quanto à ação dos radicais livres, através da redução da absorção do meio de reação. Para realização deste teste, foram adicionados em microplacas de 96 poços, 50 µL dos extratos diluídos em metanol nas concentrações de 4, 2, 1 e 0,5 mg/mL. Como controle positivo para atividade antioxidante, hidroxitolueno butilado (BHT), rutina e ácido ascórbico foram usados nas concentrações de 200, 100, 50 e 25 mg/mL, que também foram diluídos em metanol. Posteriormente, 250 µL de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0,004% diluído em metanol foi adicionado em todos os poços. Como branco foi utilizado DPPH solubilizado em metanol. A placa foi mantida ao abrigo da luz por 40 minutos e leitura foi realizada em 517 nm, e a inibição percentual dos radicais DPPH foi calculada usando a fórmula abaixo:

$$\text{Inibição DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs} \frac{\text{DPPH}}{\text{metanol}} - \text{Abs} \frac{\text{extrato}}{\text{metanol}}}{\text{Abs} \frac{\text{DPPH}}{\text{metanol}}} \times 100$$

3.5. Avaliação *in vitro* do efeito cicatrizante

Os extratos preparados a partir das folhas de *H. brasiliensis* tiveram seu potencial cicatrizante avaliado *in vitro* pelos testes de viabilidade e migração celular e efeito citoprotetor.

3.5.1. Ensaio de viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular, e conseqüentemente da atividade citotóxica dos extratos foram avaliadas microscopicamente por alteração da morfologia celular e mensurada através do método colorimétrico MTT (tetrazolium3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo).

Neste ensaio, foram utilizadas células de fibroblasto de murino (NIH/3T3) e macrófagos de murino (RAW 264.7), cultivadas a 37°C em atmosfera umedecida e 5% de CO₂. Para o crescimento e manutenção das células foi utilizado o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo penicilina (1,60 mg/mL), estreptomicina (0,40 mg/mL) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF).

Neste trabalho, 100 µL de meio DMEM e células NIH/3T3 ou RAW 264.7 na concentração de 9,0x10³ células/poço foram distribuídas em microplacas de 96 poços e incubadas a 37 °C durante 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após esse período, o meio de cultivo foi removido, as células foram tratadas com 200 µL de soluções de diferentes concentrações (400 a 12,5 µg/mL) dos extratos e incubadas novamente em estufa por 24 horas. Os controles deste ensaio foram realizados adicionando apenas células com meio de cultura nos poços (100% de células viáveis) e no controle negativo foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) 0,8%, mesma concentração utilizada para solubilização dos extratos. As microplacas foram monitoradas por microscopia óptica.

Após as 24 horas, o meio de cultivo foi removido e em cada poço foi adicionado 50 µL de solução de MTT (0,1 mg/mL). As placas foram novamente incubadas a 37°C e atmosfera 5% de CO₂ por 2 h. Posteriormente, a solução de MTT foi removida e adicionado 100 µL de DMSO em cada poço. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A viabilidade celular foi calculada para cada concentração testada, conforme a seguinte equação:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{média densidade óptica (células tratadas)}}{\text{média densidade óptica do controle (sem tratamento)}} \times 100$$

3.5.2. Efeito citoprotetor dos extratos

Neste ensaio foram preparadas placas de 96 poços contendo 100 µL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e células NIH/3T3 ou RAW 264.7 na concentração de 2,0x10⁴ células/poço e incubadas a 37 °C durante 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após esse período, o meio de cultivo foi removido, as células foram tratadas com 200 µL de soluções de diferentes

concentrações (400 a 25 µg/mL) dos extratos e incubadas novamente em estufa por 24 horas. Posteriormente, o meio de cultivo foi removido e adicionado 200 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM e as placas novamente incubadas por mais 3h. Os controles deste ensaio foram realizados adicionando apenas células com meio de cultura nos poços (100% de células viáveis) e meio de cultura com peróxido de hidrogênio 2 mM. Terminado o tempo de incubação, o peróxido foi removido e em cada poço foi adicionado 50 µL de solução de MTT (0,1 mg/mL). As placas foram novamente incubadas a 37°C e atmosfera 5% de CO₂ por 2 h. Finalmente, a solução de MTT foi removida e adicionado 100 µL de DMSO em cada poço. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5.3. Avaliação do potencial cicatrizante por scratch assay

O potencial cicatrizante dos extratos foi avaliado *in vitro* por scratch assay, adaptado de Paes et al. (2012), utilizando células NIH/3T3 e RAW 264.7. Para realização deste ensaio foram preparadas placas de 24 poços contendo 400 µL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e células na concentração de $2,0 \times 10^5$ células/poço e incubadas a 37 °C durante 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após atingir a confluência, o meio de cultura foi removido e foi realizada uma fenda com o auxílio de uma ponteira de 200 µL no diâmetro do poço. Logo após, os poços foram lavados 2 vezes com 200 µL de meio de cultura, com a finalidade de remover partículas e restos celulares deixados pela fenda. No final dessa etapa, foram aplicados 500 µL de meio de contendo mitomicina C 10 µg/mL com tratamentos nas concentrações de 400 µg/mL e 200 µg/mL dos extratos vegetais. Os controles foram realizados aplicando apenas de meio de cultura contendo mitomicina C 10 µg/mL e de meio de cultura contendo mitomicina C 10 µg/mL com DMSO 0,8%, mesma concentração utilizada para solubilização dos extratos. O ensaio foi realizado em triplicata.

Após a aplicação dos tratamentos, a área da fenda foi fotografada utilizando o microscópio óptico invertido acoplado a uma câmera fotográfica sendo este o instante 0h, partindo de um ponto específico inicial marcado na placa. Foram realizadas 3 fotos da fenda em sequência, em todos os grupos de tratamento e controle. Após este procedimento, as placas foram reincubadas a 37°C e novas fotos nos instantes 8h e 24h foram realizadas partindo do mesmo ponto na placa, de forma

a serem analisados os mesmos campos com a progressão do tempo. A mensuração das áreas foi realizada utilizando o software Image J, no qual a área da fenda de cada foto, no tempo e campo específico, foi delimitada e obtida em uma escala de 1µm.

3.6. Preparo das pomadas

Foram produzidas duas formulações na forma de pomadas a base do extrato etanólico de *H. brasiliensis* nas concentrações de 5% e 10%. As formulações foram feitas utilizando-se uma base de polietilenoglicol (PEG) e glicerina, onde foram incorporados os ativos hidrófilos e lipófilos. A composição foi PEG 4000 33%, glicerina 33% e PEG 400 qsp 100 g.

A pomada sulfadiazina de prata foi utilizada como controle positivo, pois já é encontrada no mercado, possui registro no Ministério da Saúde, possui eficácia comprovada no auxílio do processo cicatricial, é segura para o uso. Como controle negativo foi utilizado apenas o veículo para produção das pomadas.

3.7. Avaliação *in vivo* do efeito cicatrizante

Para as análises *in vivo*, foram testadas as formulações contendo o extrato com melhor atividade cicatrizante demonstrada pelas etapas *in vitro*.

3.7.1. Desenho experimental

3.7.1.1. Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados 84 camundongos machos (*Mus musculus*) da linhagem Balb-C, adultos jovens pesando em média 30g, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os animais foram mantidos na sala de experimentação animal do Laboratório de Biofármacos, em ambiente climatizado entre 22°C 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. As gaiolas foram higienizadas três vezes por semana. Durante todo experimento, foram alimentados com ração padronizada comercial para roedores de laboratório, e água “*ad libitum*”. Antes do início dos experimentos, os animais passaram por um período de adaptação e aclimatação durante 7 dias, para estabelecimento das condições fisiológicas do animal.

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), processo 35/2021 (Anexo A). O tamanho da amostra foi baseado na 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 e renovação de fitoterápicos. O item três do anexo desta resolução 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.

3.7.1.2. Toxicidade dérmica aguda

Antes de iniciar a avaliação da atividade cicatrizante *in vivo*, o teste de toxicidade dérmica aguda do extrato foi determinado de acordo com as diretrizes da OECD nº 402. Doze animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: 1 grupo com 6 animais foi tratado com pomada contendo extrato a 10% e outro grupo com 6 animais foi tratado apenas com veículo da pomada. Após a tricotomia na região dorsal, os animais receberam diariamente, pelo período de 14 dias, aproximadamente 100 mg da pomada de acordo com tratamento do seu grupo experimental, utilizando técnica asséptica. Os animais foram observados duas vezes ao dia, durante o período de tratamento, para quaisquer alterações cutâneas indicativas de reações adversas, como irritação, edema, prurido e eritema, e alguns sinais de toxicidade, como tremores, convulsões, salivação, diarreia, sono e padrão geral de comportamento.

3.7.1.3. Procedimento cirúrgico

Para realização das feridas, os animais foram sedados e anestesiados usando xilazina 2% 10mg/Kg e cloridrato de quetamina 50mg/Kg, adicionados na mesma seringa e administrado por via intraperitoneal. A verificação da anestesia foi observada pela ausência de reflexo palpebral e redução da frequência cardíaca e respiratória. Uma vez anestesiados, foi realizado a tricotomia do dorso dos animais com auxílio de lâmina de barbear. Posteriormente, foi realizada a assepsia com solução de álcool etílico 70% na região tricotomizada.

Para indução das feridas, primeiramente foi padronizado o tamanho das mesmas com o auxílio de um tubo de ensaio de 10 mL de coletar sangue, devidamente desinfetado. Este foi pressionado contra a pele, delimitando uma área aproximada de

1cm². Os cortes foram seccionados utilizando lâmina de bisturi N° 11, tesoura curva e pinça anatômica dente de rato, até a exposição da fáscia muscular.

3.7.1.4. Grupos experimentais

Após o procedimento cirúrgico, os animais (n=72) foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=18): 1) Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada (G1); 2) Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata (G2); 3) Grupo tratamento pomada 5% (G3); 4) Grupo tratamento pomada 10% (G4). Seis animais cada grupo, em cada tempo de observação (3, 8 e 12 dias).

Após a indução das feridas, os animais receberam, diariamente o equivalente a 100 mg da formulação de acordo com tratamento do seu grupo experimental, utilizando técnica asséptica durante 12 dias. Os curativos foram realizados em intervalo de 24h, utilizando a mesma técnica e no mesmo horário até o 12º dia de pós-operatório. Para isso os animais foram contidos manualmente, sendo segurados pela base da cauda.

3.7.1.5. Eutanásia

Nos dias pré-estabelecidos para a eutanásia (3, 8 ou 12 dias), seis animais de cada grupo tiveram o tecido cicatricial coletado e em seguida foram eutanasiados por exsanguinação com prévia administração de uma sobredosagem de xilazina 2% e cloridrato de quetamina por via intraperitoneal. Após os animais entrarem em anestesia profunda, foi realizada a punção cardíaca, a fim de coletar amostras sanguíneas, o que resultou em choque hipovolêmico e morte do animal por exsanguinação.

As feridas operatórias foram examinadas com uso de lupa de 2,5 vezes de aumento para verificação de crostas, secreções e cicatriz hipertrófica. O tamanho da ferida residual em duas direções, foram medidos com paquímetro digital. A ferida foi excisada com margem de 1 mm de pele íntegra em torno da lesão, em profundidade até a fáscia muscular. Parte das amostras foram fixadas em formaldeído tamponado 10%, outra parte em solução de Karnovisk e uma terceira parte imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultra freezer à temperatura de - 80°C até o início das análises. A figura 2 apresenta o desenho experimental da avaliação cicatrizante *in vivo*.

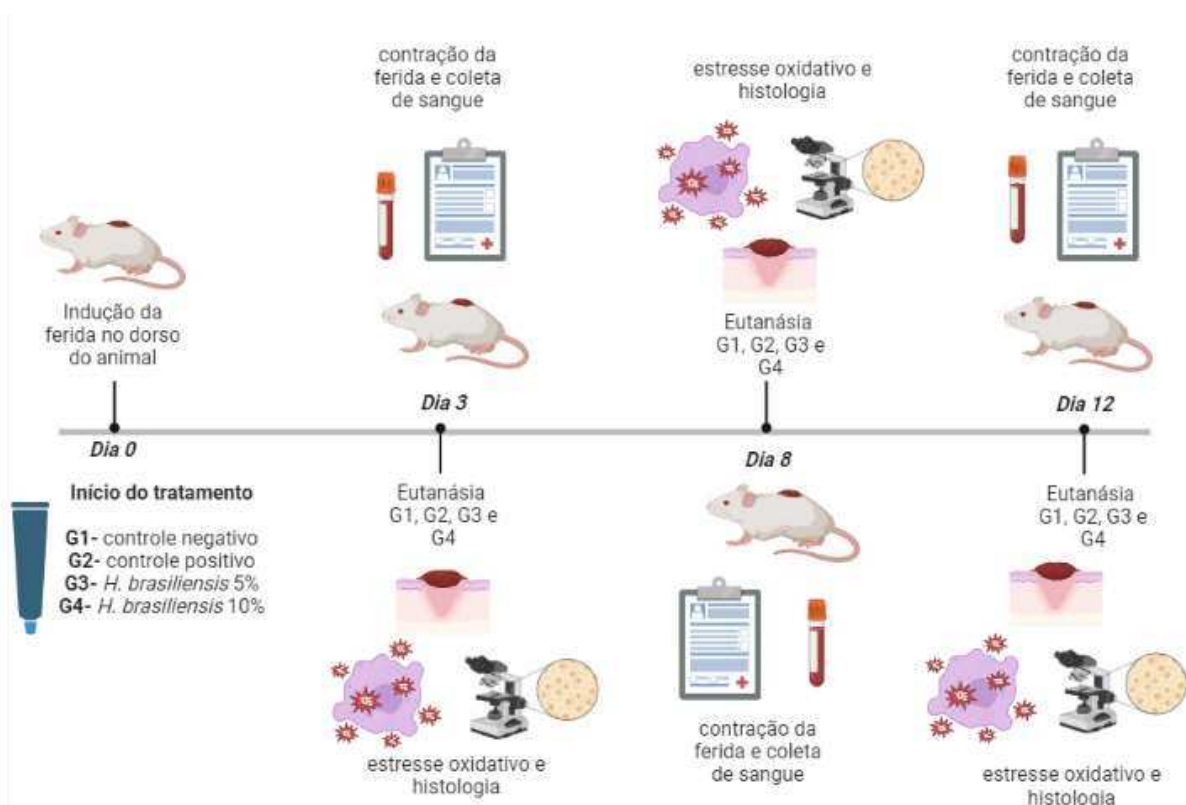


Figura 2. Desenho experimental da avaliação cicatrizante das pomadas de *Heteropterys brasiliensis* nas concentrações de 5% e 10% (m/m), *in vivo*.

3.7.2. Análises macroscópicas das feridas

As feridas foram avaliadas pelo Índice de Contração (IC), mensurado no 3°, 8° e 12° dias após a execução das feridas, as medidas foram realizadas com uso de paquímetro digital, em duas direções, tomando os pontos mais distantes na horizontal e vertical, formando um ângulo de 90°. Após este procedimento, multiplica-se os valores encontrado na horizontal e vertical, proporcionando o valor real da ferida conforme a figura 3.

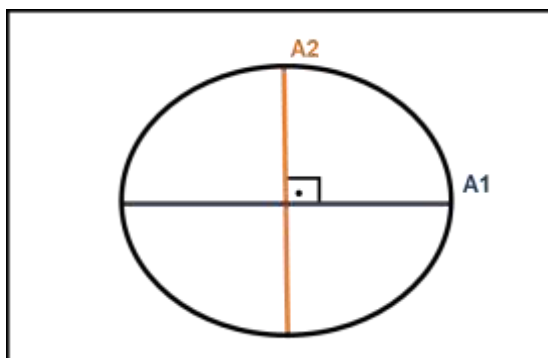


Figura 3. Determinação da área da ferida por medição com paquímetro. A1: área horizontal; A2: área vertical. 90° (ângulo de 90 graus).

$$\text{Área da ferida em cm}^2 = A1 \times A2$$

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

3.7.3. Análises histológicas

As amostras de pele coletadas foram imediatamente fixadas em solução de Karnovisk por 24h e posteriormente inseridas em frascos com álcool 70% até a confecção das preparações 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 5 μm de espessura. As lâminas foram coradas rotineiramente em Hematoxilina-Eosina (HE) para a avaliação global do tecido, avaliando fibroblastos, vasos sanguíneos e células inflamatórias (GONÇALVES et al., 2010).

As lâminas foram visualizadas e capturadas em Microscópio Leica DM 750 acoplado a uma câmera digital Leica MC 170 HD (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Usando uma lente objetiva de 20X, dez campos de cada lâmina foram fotografados aleatoriamente e submetidos à análise histomorfométrica. A histomorfometria foi realizada usando o software Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Para esta análise, uma grade contendo 300 pontos dentro de uma área padrão, foi sobreposta a cada imagem contando-se pontos sobre celularidade e vasos sanguíneos. Os parâmetros histomorfométricos foram calculados utilizando as médias de vasos sanguíneos e celularidade.

3.7.4. Análises hematológicas

As análises hematológicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas (DNS/UFV) e foram avaliadas as concentrações de hemoglobina, plaquetas e leucócitos pelo método de impedância.

3.8. Avaliação do perfil oxidativo tecidual

Fragmentos de pele (150 mg) foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (pH 7.4) 0.2 M com 1M EDTA e a suspensão centrifugada a 12000 RPM por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante e precipitado resultante foi utilizado para realização da atividade antioxidante dos seguintes marcadores:

3.8.1. Concentração de malondialdeído (MDA)

A determinação de MDA foi realizada pelo teste de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Em um microtubo foram adicionados 200 µL de homogeneizado e 400 µL de TBARS. Em seguida, as amostras foram agitadas em vortex por 10 segundos e incubadas em banho maria por 40 minutos a 90°C. As amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos e adicionadas de 600 µL de n-butanol e agitadas por 2 minutos, seguida por centrifugação a 3000 RPM por 10 minutos. Foram retiradas 200 µL do sobrenadante e adicionado em microplaca de 96 poços. A leitura foi realizada na absorvância de 540 nm.

Os valores finais foram calculados por meio de curva-padrão sendo utilizado o reagente 1,1,3,3-Tetramethoxypropane (TMPO), com a concentração variando de 0 µM a 4 µM.

3.8.2. Dosagem de nitrito e nitrato

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% H₃PO₄. Desta forma, 50 µL do sobrenadante das amostras foi adicionado em microplacas com 100 µL 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 µM a 9,75 µM de nitrito de sódio.

3.8.3. Atividade de superóxido dismutase (SOD)

Em microplaca de 96 poços foram utilizados no meio de reação 30 μL de sobrenadante do homogeneizado de pele, 6 μL MTT (brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazolium) 1,25 mM, 15 μL de pirogalol 100 μm , completando para 200 μL com tampão fosfato salino (PBS) 0,2 M (pH 8,0). Como branco foi utilizado 45 μL de PBS/sem adição de piragalol e amostra, e como padrão foi utilizado 30 μL de PBS/sem amostra. Em seguida, a placa foi incubada a 40°C por 15 minutos. A reação foi parada utilizando 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) em todos os poços. A leitura de absorvância foi realizada em 570 nm.

3.8.4. Atividade de catalase (CAT)

Em microplaca de 96 poços foram adicionados 5 μL do sobrenadante do homogeneizado de pele, juntamente com 100 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 20 mM. 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.

3.8.5. Dosagem de glutathione S transferase (GST)

Para essa análise 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. Posteriormente, ocorreu a leitura no espectrofotômetro a 340nm. Foi realizada leituras nos tempos T0, T30, T60 e T90 minutos. O teste foi realizado em triplicata.

3.8.6. Dosagem de proteínas totais

As proteínas totais presentes nas amostras do sobrenadante do homogenato foram determinadas pelo método de Bradford, 1976. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 10 μL das amostras previamente diluídas em 20 vezes em água

destilada. Uma curva padrão foi preparada utilizando 10 μ L 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 μ L de água destilada. Posteriormente, foram adicionados em todos os poços 150 μ L 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).

3.9. Análises estatísticas

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. A igualdade de variâncias foi verificada utilizando-se o teste de Bartlett e os dados paramétricos foram comparados utilizando-se análise de variância ANOVA de um fator, seguido pelo teste pós-hoc de Tukey. A significância estatística foi estabelecida em $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

Nesta sessão está descrito os resultados obtidos na avaliação dos extratos de *H. brasiliensis* quanto à atividade antibacteriana pelo teste do CIM, potencial antioxidante *in vitro* pelo ensaio de DPPH, a atividade anti-inflamatória pelo ensaio de desnaturação de proteínas e produção de óxido nítrico em macrófagos. A atividade cicatrizante *in vitro* pelos ensaios de viabilidade, citoproteção e migração celular. Potencial cicatrizante *in vivo* pelo índice de contração da ferida, parâmetros bioquímicos e análise histológica. Adicionalmente, está representado os resultados obtidos da análise do perfil oxidativo tecidual pela determinação de MDA, NO, SOD, CAT, GST.

4.1. Atividade antibacteriana

Os extratos hexânico e etanólico de *H. brasiliensis* foram avaliados para a concentração inibitória mínima (CIM), sendo definida como a menor concentração em que um composto/extrato apresenta inibição da atividade bacteriana. Quanto menores os resultados de CIM do composto/extrato, melhor a sua atividade antibacteriana, uma vez que se necessita menos do composto/extrato para se eliminar uma quantidade fixa de bactérias. A tabela 1 apresenta os valores de CIM obtidos.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL) dos extratos hexânico e etanólico de *Heteropterys brasiliensis* frente as bactérias *Enterobacter* ATCC 29004, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 29214, *Staphylococcus epidermidis* C213 e *Staphylococcus aureus* (3008, 3828, 3917, 4157, 4182 e ATCC 33591)

Bactéria	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL)		
	Extrato <i>H. brasiliensis</i> hexano	Extrato <i>H. brasiliensis</i> etanol	Controle positivo*
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	5,0	5,0	0,006
<i>E. coli</i> ATCC 29214	5,0	5,0	0,025
<i>Enterobacter</i> ATCC 29004	5,0	5,0	0,013
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	5,0	5,0	0,008
<i>S. aureus</i> 3008	0,3	2,5	0,008
<i>S. aureus</i> 3828	0,6	2,5	0,013
<i>S. aureus</i> 3917	0,3	2,5	0,008
<i>S. aureus</i> 4157	0,6	1,2	0,013
<i>S. aureus</i> 4182	1,2	2,5	0,025
<i>S. enterica</i> ATCC 14028	5,0	5,0	0,013
<i>S. epidermidis</i> C213	5,0	2,5	0,002

*Cefoperazone

No trabalho de Aligiannis e colaboradores (2001), extratos foram classificados quanto a sua capacidade antibacteriana. A pesquisa considera que extratos que apresentam um valor de CIM até 0,5 mg/mL como fortes inibidores bacterianos, para valores entre 0,6 mg/mL e 1,5 mg/mL inibidores moderados e valores acima de 1,6 mg/mL os extratos são considerados como fracos inibidores. Conforme essa classificação, o extrato hexânico de *H. brasiliensis* é forte inibidor para os isolados *S. aureus* 3008 e 3917 e um inibidor moderado para *S. aureus* 3828, 4157, 4182. O extrato etanólico apresentou como um moderado inibidor apenas para o isolado *S. aureus* 4157 e foi fraco inibidor para as demais cepas bacterianas testadas.

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

4.2.1. Inibição de desnaturação da proteína

Os extratos orgânicos foram avaliados quanto a atividade anti-inflamatória *in vitro* pelo método de desnaturação de albumina. A desnaturação das proteínas é uma

causa conhecida dos processos inflamatórios (LEELAPRAKASH & DASS, 2011). A albumina (BSA) é uma proteína e que desnatura, isto é, perde a sua estrutura terciária e secundária na presença de temperaturas elevadas. Desta forma, neste método, o calor é usado para desnaturar a proteína BSA, e o objetivo é avaliar a capacidade dos extratos impedirem esta desnaturação que pode causar inflamação.

Dos extratos avaliados, o extrato hexânico de *H. brasiliensis* apresentou atividade na desnaturação da proteína BSA nas concentrações de 1,0 mg/mL, 2,5 mg/mL e 5 mg/mL, com taxa de inibição da desnaturação de $97,2 \pm 0,8\%$, $98,6 \pm 0,9\%$ e $99,3 \pm 0,8\%$, respectivamente. Na concentração de 0,5 mg/mL a inibição foi de $83,5 \pm 0,9\%$, valor significativamente superior ao determinado para o anti-inflamatório comercial diclofenaco de sódio ($36,3 \pm 1,1\%$), na mesma concentração. Em concentrações inferiores a taxa de inibição foi diminuindo tanto para o extrato quanto para o diclofenaco. O extrato etanólico apresentou valores inferiores da taxa de inibição da BSA, atingindo um valor de $23,5 \pm 0,4\%$ na maior concentração testada (Figura 4).

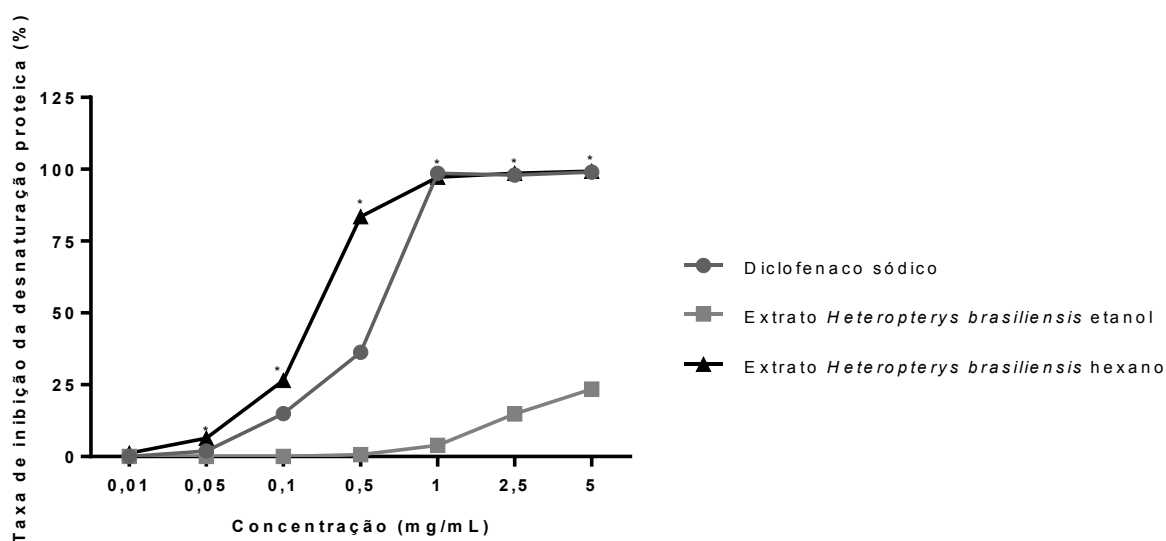


Figura 4. Inibição da desnaturação proteica. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão e letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

4.2.2. Efeito dos extratos na produção de óxido nítrico

Os efeitos dos extratos de *H. brasiliensis* na produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas por LPS são mostrados na Figura 5. As células RAW 264.7 foram

tratadas com várias concentrações dos extratos (25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$) e LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h. A produção de NO induzido por LPS foi significativamente diminuída por ambos os extratos de forma dose-dependente. Sendo que o extrato hexânico apresentou menor produção de NO comparativamente ao extrato etanólico. Para a concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ o extrato hexânico apresentou significativamente a mesma produção de NO do anti-inflamatório dexametasona utilizado como controle positivo.

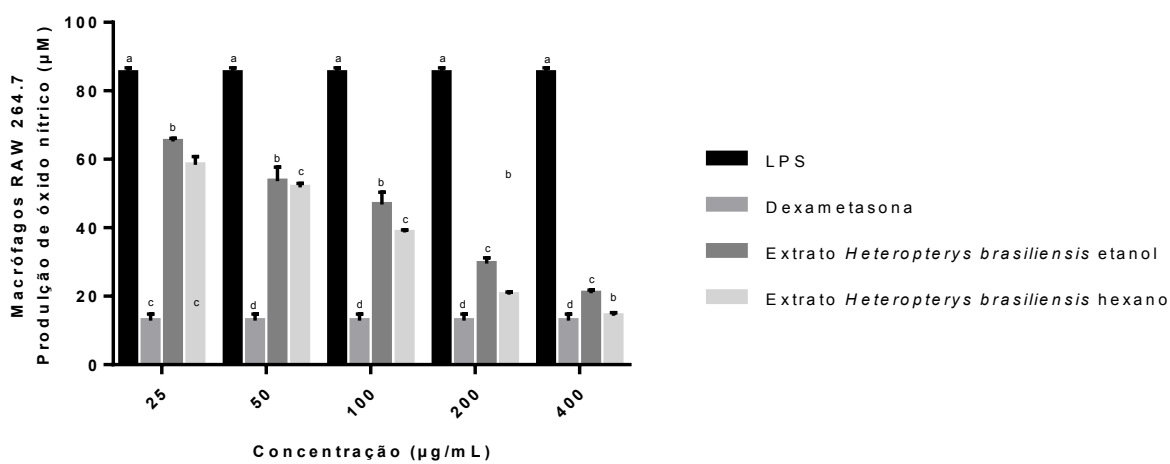


Figura 5. Produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 tratados com dexametasona (controle positivo), extrato hexânico e etanólico de *Heteropterys brasiliensis* e LPS (controle negativo). Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão e letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

4.3. Potencial antioxidante dos extratos pelo ensaio de DPPH

Na análise *in vitro* da capacidade antioxidante, o extrato etanólico de *H. brasiliensis* teve uma alta taxa de eliminação do radical DPPH, apresentando uma relação dose-resposta. Na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ o mesmo mostrou valor significativamente superior aos controles ácido ascórbico e rutina, já em 200 $\mu\text{g/mL}$, o extrato demonstrou valores superiores a todos controles positivos utilizados (ácido ascórbico, rutina e BHT). Na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ não houve diferença entre extrato, rutina e BHT. Ao passo que em 100 $\mu\text{g/mL}$, o extrato etanólico também apresentou maior atividade antioxidante que o BHT e nenhuma diferença foi

observada entre ele e a rutina. O extrato hexânico apresentou baixa efeito antioxidante *in vitro* para todas as concentrações testadas (Figura 6).

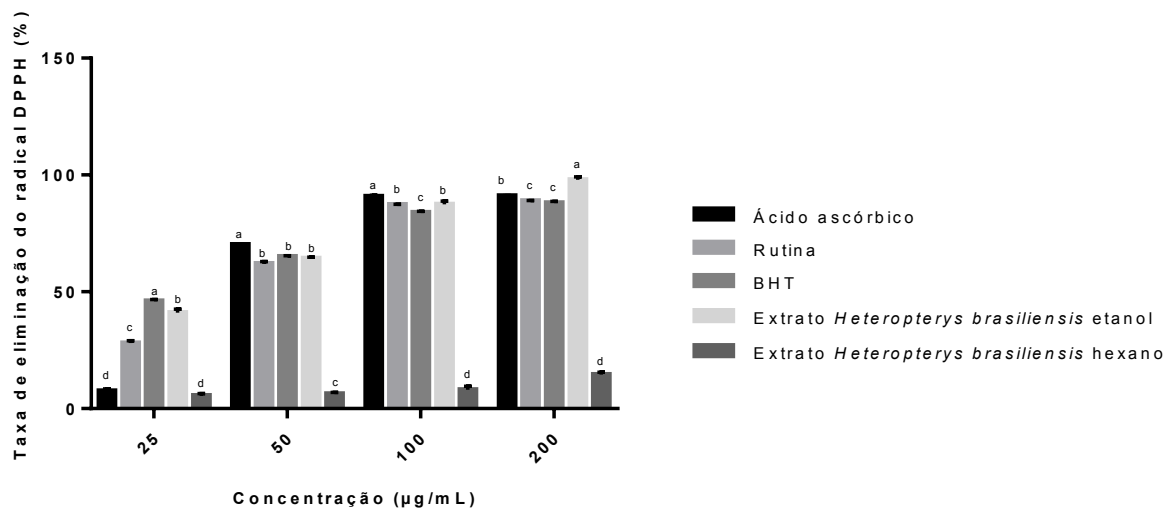


Figura 6. Taxa de eliminação percentual do radical DPPH. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão e letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

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

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

Os extratos orgânicos de *H. brasiliensis* auxiliaram no processo de proliferação de macrófagos RAW 267.7 e fibroblastos NIH/3T3 (Figura 7). Ambos os extratos apresentaram significativamente a mesma proliferação em macrófagos na concentração de 25 µg/mL. Em 50 µg/mL e 100 µg/mL o extrato hexânico apresentou valores de $137,1 \pm 3,9\%$ e $145,3 \pm 4,6\%$, respectivamente. Ao passo que o extrato etanólico demonstrou proliferação de $128,7 \pm 0,7\%$ e $134,6 \pm 6,7\%$ para respectivamente as mesmas concentrações. Nas maiores dosagens testadas, o extrato etanólico obteve maior taxa de proliferação quando comparado ao hexânico (Figura 7A).

Em fibroblasto NIH/3T3, o extrato etanólico demonstrou ser significativamente superior na proliferação celular ao extrato hexânico em todas as concentrações testadas. A taxa de proliferação do extrato etanólico variou de $111 \pm 1\%$ a $146,33 \pm 1,53\%$ para as concentrações de 25 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente. Os resultados demonstraram um efeito dose-resposta com os melhores resultados a 400

$\mu\text{g/mL}$ (Figura 7B). Baseado na alta taxa de proliferação celular, principalmente em fibroblastos e no potencial antioxidante *in vitro*, o extrato etanólico de *H. brasiliensis* foi selecionado para avaliação da migração celular *in vitro* e para os experimentos *in vivo*.

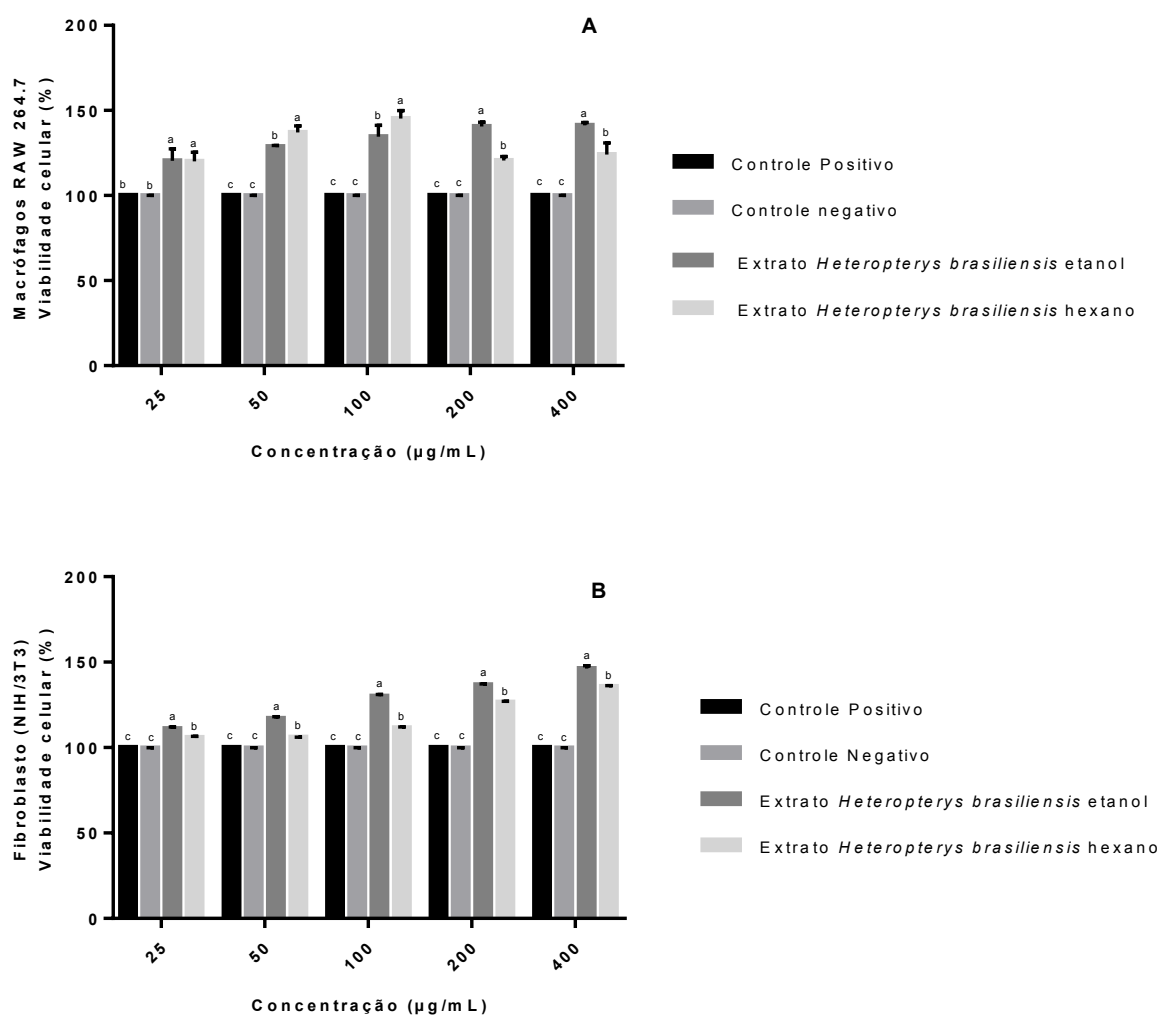


Figura 7. Proliferação celular de macrófagos RAW 264.7 (A) e de fibroblastos NIH/3T3 (B) na presença do extrato hexânico e etanólico de *Heteropterys brasiliensis*. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT e calculada em relação a absorbância do controle positivo (meio de cultura + células). Controle negativo: células tratadas com DMSO 0,8%. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão e letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

4.4.2. Efeito citoprotetor dos extratos

Macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos NIH/3T3 quando tratados previamente com os extratos orgânicos de *H. brasiliensis* apresentaram baixo efeito citoprotetor ao serem expostos ao tratamento com peróxido de hidrogênio 2 mM (Figura 8). Ambos os extratos apresentaram uma citoproteção de aproximadamente 11% para todas as concentrações analisadas em macrófagos (Figura 8A). Em fibroblastos, o extrato hexânico foi significativamente superior ao extrato etanólico em três concentrações testadas, porém a maior taxa atingida pelo mesmo foi de $16,9 \pm 1,2\%$ quando avaliado na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8B).

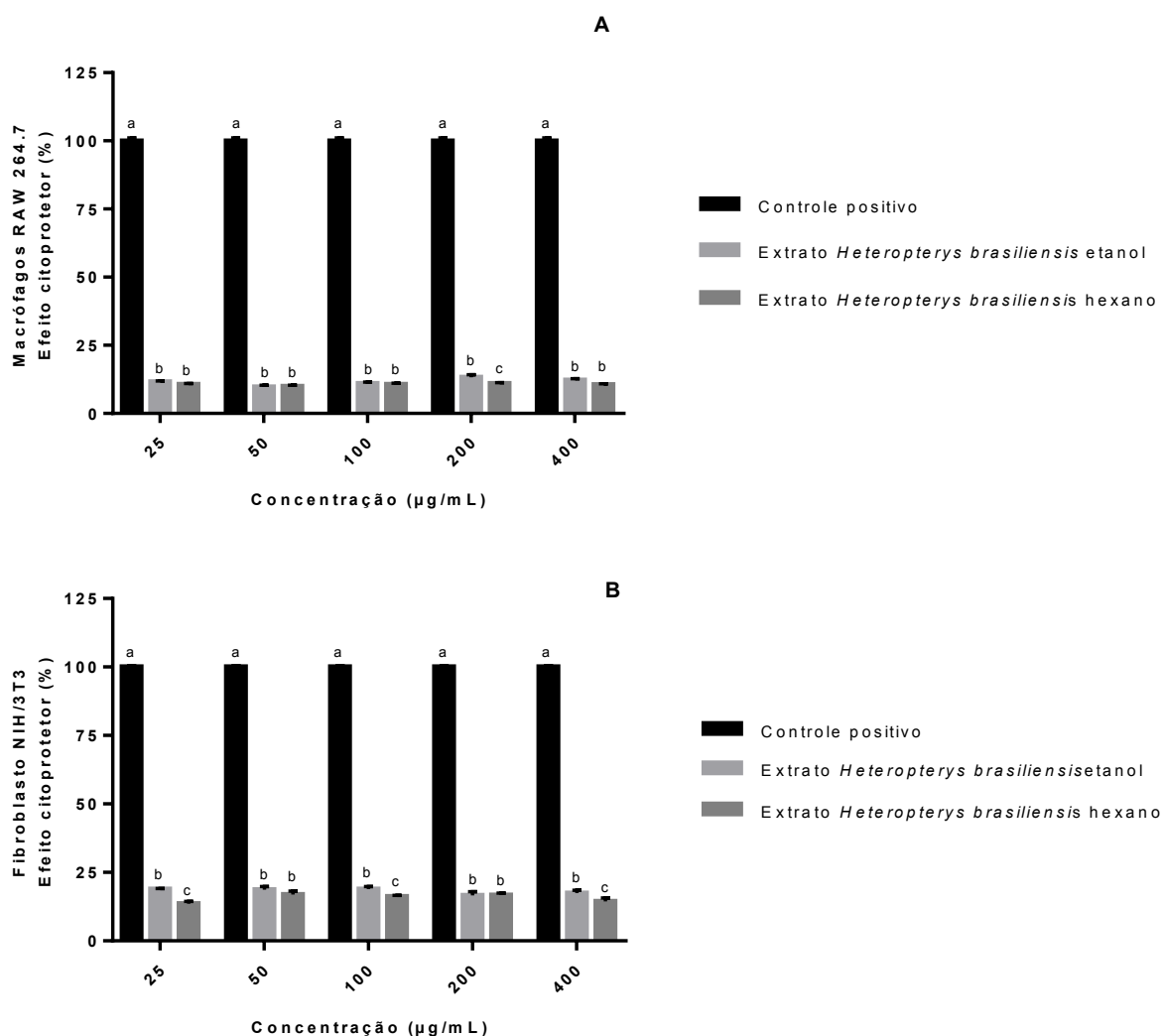


Figura 8. Efeito citoprotetor do extrato etanólico e hexânico de *Heteropterys brasiliensis* em macrófagos RAW 264.7 (A) e fibroblastos NIH/3T3 (B). Controle positivo: células + meio de cultivo sem tratamento com peróxido de hidrogênio. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão e letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

4.4.3. Potencial cicatrizante *in vitro* do extrato por scratch assay

O extrato etanólico de *H. brasiliensis* foi o mais promissor na proliferação celular. Desta forma, este foi escolhido para analisar a migração dos macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos NIH/3T3 por scratch assay. As figuras 9 e 10 apresentam os resultados obtidos através desse ensaio durante um período de 24 horas.

Em macrófagos RAW 264.7, não houve diferença estatística entre o controle de meio de cultura contendo mitomicina C 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e células (controle positivo) e controle contendo meio de cultura, mitomicina C 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com DMSO 0,8% e células (controle negativo). Dessa forma, é possível determinar que o DMSO na mesma concentração utilizada para solubilizar os extratos, não interferiu na migração celular. O extrato nas concentrações de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi significativamente superior na taxa de migração quando comparado aos controles. O extrato em 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ teve uma taxa de migração de $13,9\% \pm 0,6\%$ e $49,8 \pm 4,2\%$ nos tempos 8h e 24h, respectivamente. Os melhores resultados foram obtidos em 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, na qual a taxa de migração foi de $30,5 \pm 1,8\%$ e $87,3 \pm 7,2\%$ respectivamente os tempos de 8h e 24h (Figura 9).

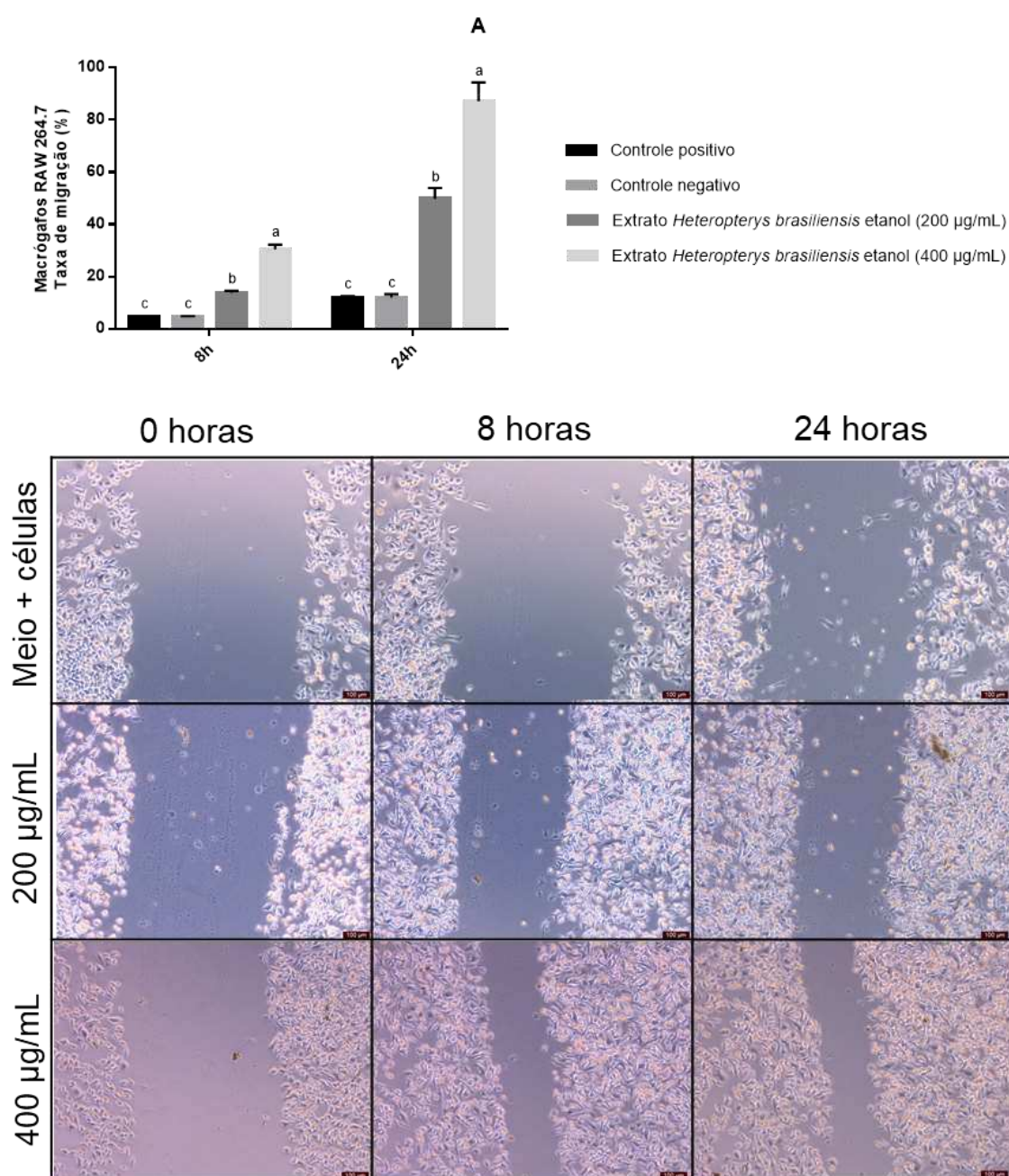


Figura 9. Efeito do extrato etanólico de *Heteropterys brasiliensis* sobre a taxa de migração celular de macrófagos RAW 264.7. Controle positivo: meio de cultura + células + mitomicina C. Controle negativo: meio de cultura + células + mitomicina C + DMSO 0,8%. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão e letras diferentes representam diferença estatisticamente significante (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

A figura 10 apresenta o resultado da migração de fibroblastos quando tratados com o extrato etanólico nas concentrações de 200 µg/mL e 400 µg/mL. Assim como

em macrófagos, nesta linhagem celular não houve diferença entre os controles. É possível notar uma relação dose-resposta na migração celular, de forma que a maior concentração testada apresentou o melhor resultado. Em 24h de tratamento o extrato demonstrou taxa de migração de $74,9 \pm 0,1\%$ em $200 \mu\text{g/mL}$, já na concentração de $400 \mu\text{g/mL}$ a taxa foi de $91,7 \pm 1,9\%$. Logo, o tratamento utilizando extrato foi capaz induzir a migração de forma a encobrir praticamente toda a fenda realizada pelo ensaio de arranhadura.

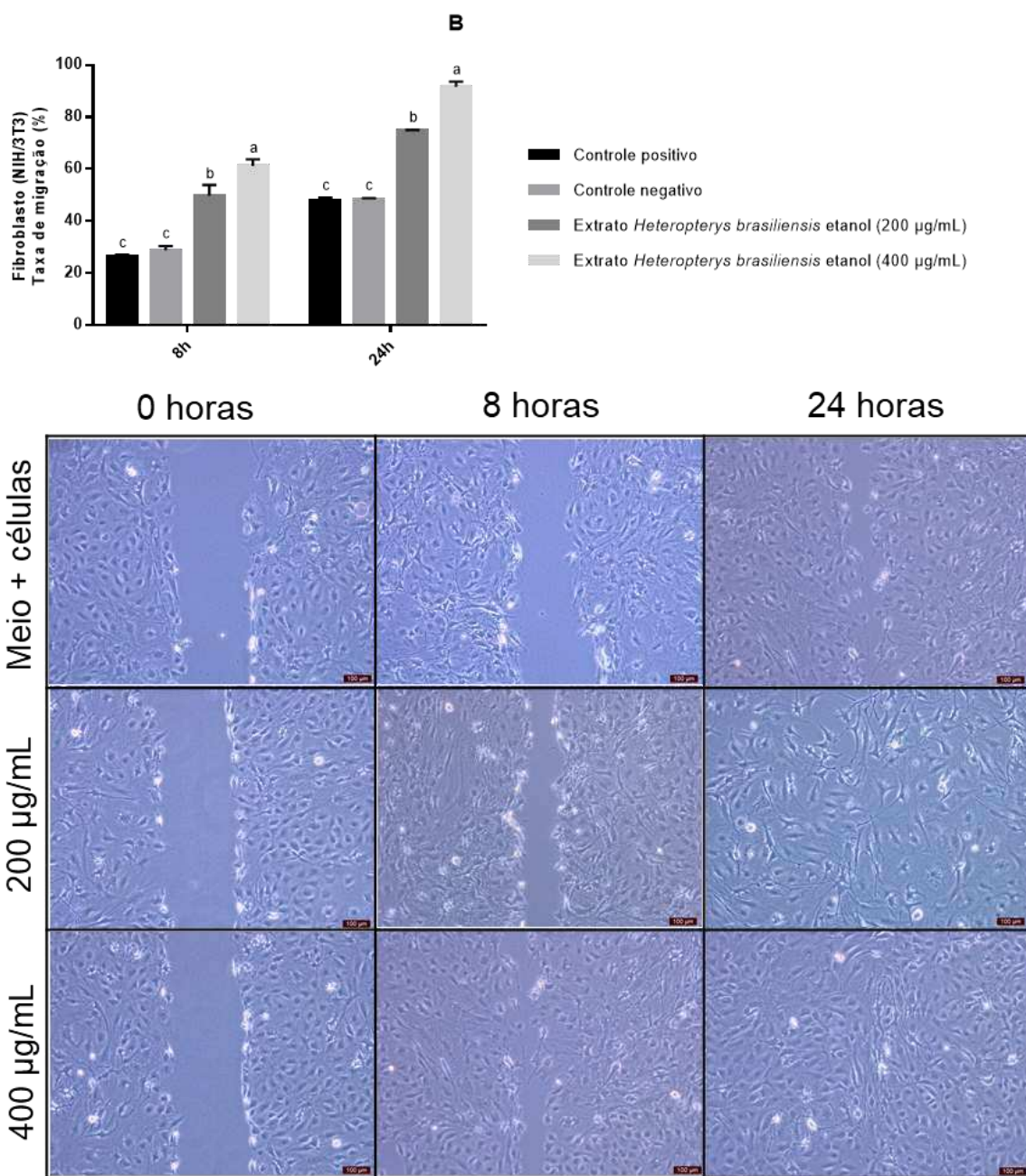


Figura 10. Efeito do extrato etanólico de *Heteropterys brasiliensis* sobre a taxa de migração celular de fibroblastos NIH/3T3. Controle positivo: meio de cultura + células + mitomicina C. Controle negativo: meio de cultura + células + mitomicina C + DMSO 0,8%. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão e letras diferentes representam diferença estatisticamente significante (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

4.4.4. Toxicidade dérmica aguda

A aplicação tópica da pomada à base do extrato etanólico de *H. brasiliensis* na concentração de 10% não demonstrou nenhuma reação adversa na pele do camundongo, ou seja, irritação, edema, prurido e eritema, em relação aos grupos controles. Também não foram observados sinais de toxicidade ou alterações comportamentais, como tremores, diarreia, convulsões, irritabilidade, contorções abdominais e problemas de locomoção (Tabela 2).

Tabela 2. Irritação dérmica aguda da pomada contendo o extrato de *Heteropterys brasiliensis* na concentração de 10%

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

* valor que representa a normalidade de acordo com a toxicologia não clínica e os estudos de segurança farmacológica necessária para o desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 2013).

4.4.5. Área e índice de contração da ferida

Não houve nenhum sinal de infecção nas feridas durante todo o processo experimental. Os animais permaneceram saudáveis, sem perda de peso, alertas e se alimentando normalmente. A partir do terceiro dia de tratamento houve a formação de crosta nas feridas em todos os grupos experimentais. Animais tratados com a pomada nas concentrações de 5% e 10% tiveram crosta mais expressa e de cor escura até o oitavo dia de tratamento. A pigmentação advinda do próprio extrato que compõe a pomada pode ter contribuído para a coloração mais escura (Figura 11C).

No décimo segundo dia após a lesão, a área da ferida foi significativamente menor nos grupos tratados com sulfadiazina de prata (G2), pomada à base do extrato 5% (G3) e 10% (G4) em comparação com o grupo controle utilizando apenas o veículo (G1). No mesmo período, a pomada contendo o extrato 5% (G3) apresentou uma área menor em comparação a todos os grupos. A pomada do extrato 10% (G4) e sulfadiazina de prata (G2) foram estatisticamente iguais para este mesmo tempo de observação (Figura 11A).

A figura 11B apresenta os resultados obtidos para o índice de contração da ferida. No terceiro dia, as feridas foram reduzidas em $7,6 \pm 1,6\%$, $14,6 \pm 2,3\%$, $18,7 \pm 0,9\%$ e $13,9 \pm 2,4\%$ respectivamente para G1, G2, G3 e G4. No oitavo dia, o maior índice de contração foi observado na pomada contendo o extrato 5% (G3) ($39,6 \pm 1,6\%$). A pomada à base do extrato 10% (G4) teve significativamente a mesma taxa de contração do que grupo de controle positivo (G2). As mais altas taxas de contração da ferida foram observadas no décimo segundo dia nos grupos G3 ($93,3 \pm 3,2\%$), seguido dos grupos G2 e G4 ($74,6 \pm 2,3\%$ e $78,9 \pm 2,7\%$, respectivamente). A menor taxa de contração foi observada no controle negativo (G1) com $39,4 \pm 3,5\%$ no mesmo tempo experimental.

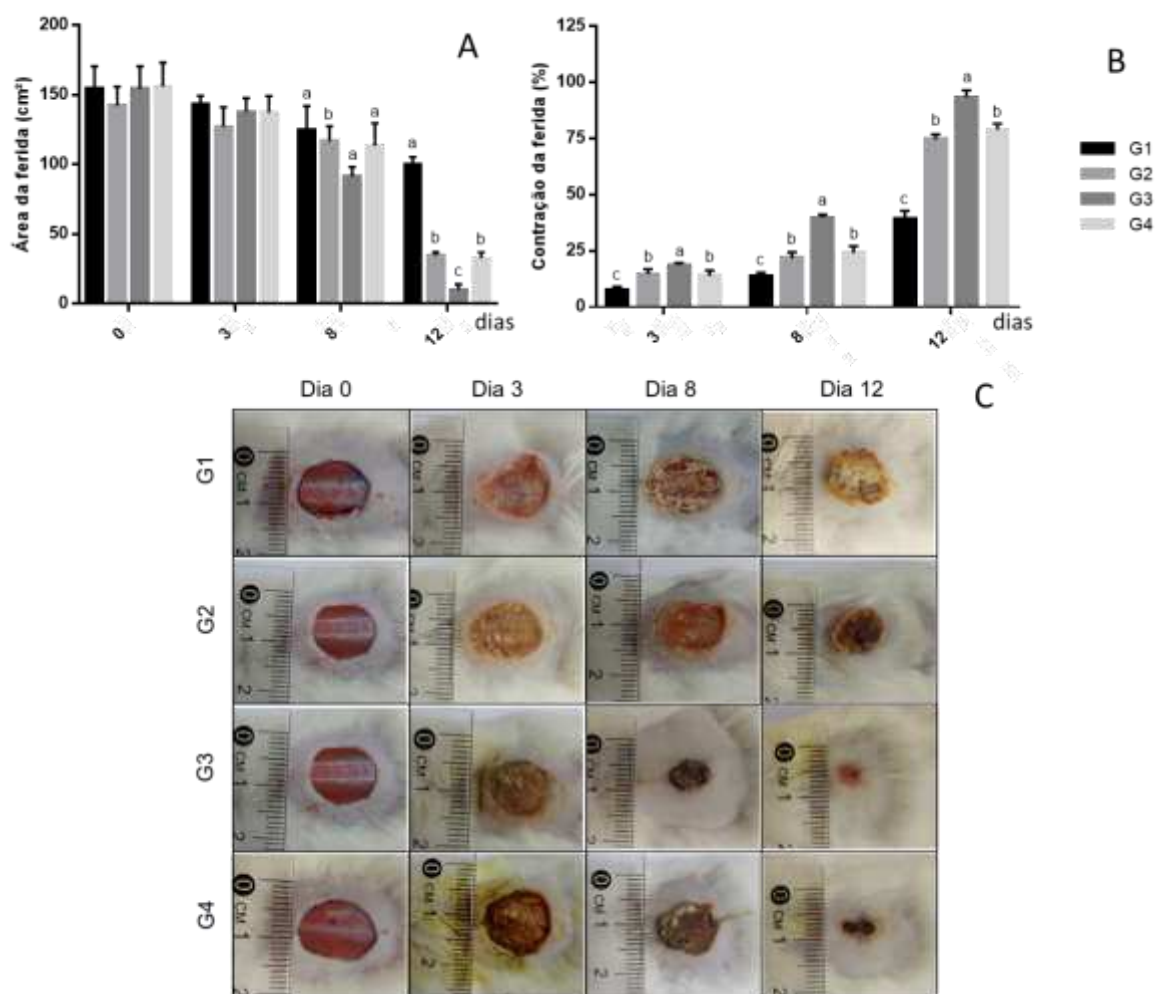


Figura 11. Evolução do processo de cicatrização de feridas induzidas em camundongo não tratados e tratados com a pomada contendo extrato etanólico de *Heteropterys brasiliensis* nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. A - Área total da ferida (cm²). B - Índice de contração da ferida (%). C - Imagens representativas das feridas induzidas em camundongos. G1 - Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada; G2 - Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata; G3 - Grupo tratamento pomada 5%; G4 - Grupo tratamento pomada 10%. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

4.4.6. Análise histológica

Os resultados histopatológicos mostraram que a pomada 10% (G1), foi significativamente superior a pomada 5% (G3), seguida do controle positivo (G2) e

controle negativo (G1) quanto a celularidade nos tempos 3 e 8 dias após a indução da ferida. Em 12 dias, a celularidade foi superior no grupo controle positivo ao passo que nos demais grupos não houve diferença significativa entre eles em relação ao número total de células (Figura 12).

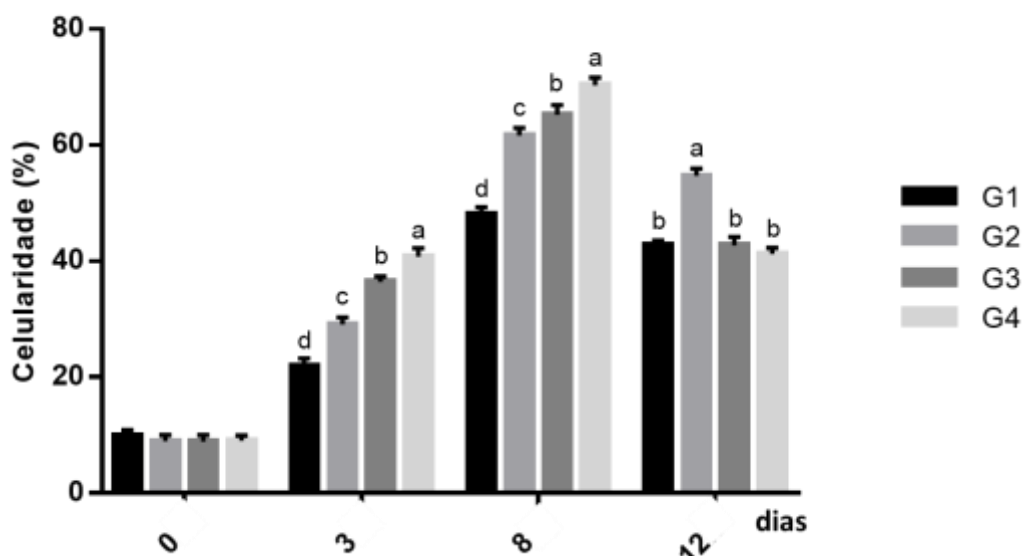


Figura 12. Efeito da pomada contendo extrato etanólico de *Heteropterys brasiliensis* sobre o percentual de celularidade nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. G1 - Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada; G2 - Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata; G3 - Grupo tratamento pomada 5%; G4 - Grupo tratamento pomada 10%. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

O grupo pomada à base do extrato 10% (G4) apresentou aumento significativo no percentual de vasos sanguíneos no oitavo dia após indução da ferida em comparação com os outros grupos experimentais. Já no décimo segundo dia não houve diferença entre os grupos controle positivo (G2), pomada do extrato 5% (G3) e pomada do extrato 10% (G4), porém foram superiores ao controle negativo (G1) para o mesmo tempo de análise (Figura 13).

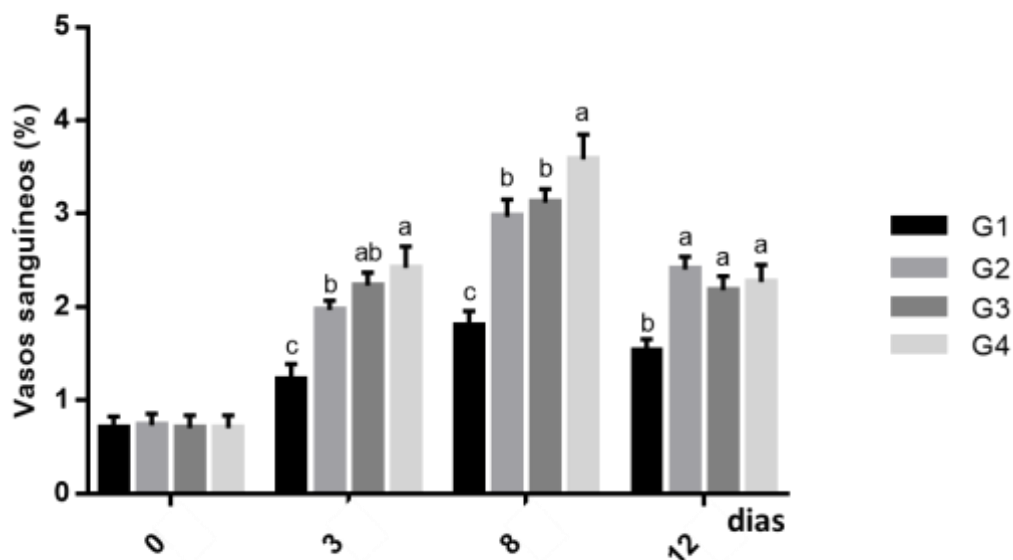


Figura 13. Efeito da pomada contendo extrato etanólico de *Heteropterys brasiliensis* sobre o percentual de vasos sanguíneos nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. G1 - Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada; G2 - Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata; G3 - Grupo tratamento pomada 5%; G4 - Grupo tratamento pomada 10%. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

4.4.7. Análises hematológicas

As análises hematológicas do sangue dos camundongos foram realizadas nos tempos 3, 8 e 12 dias após indução das feridas. A avaliação de leucócitos mostrou que não houve diferença entre os grupos experimentais nos 3 tempos de análise (Figura 14B). Houve uma diminuição nas hemácias e plaquetas para o grupo pomada contendo extrato de *H. brasiliensis* 5% (G3) no décimo segundo dia pós-lesão. Para os demais grupos experimentais não houve diferença significativa com relação ao tempo e tratamentos (Figura 14A e 14B).

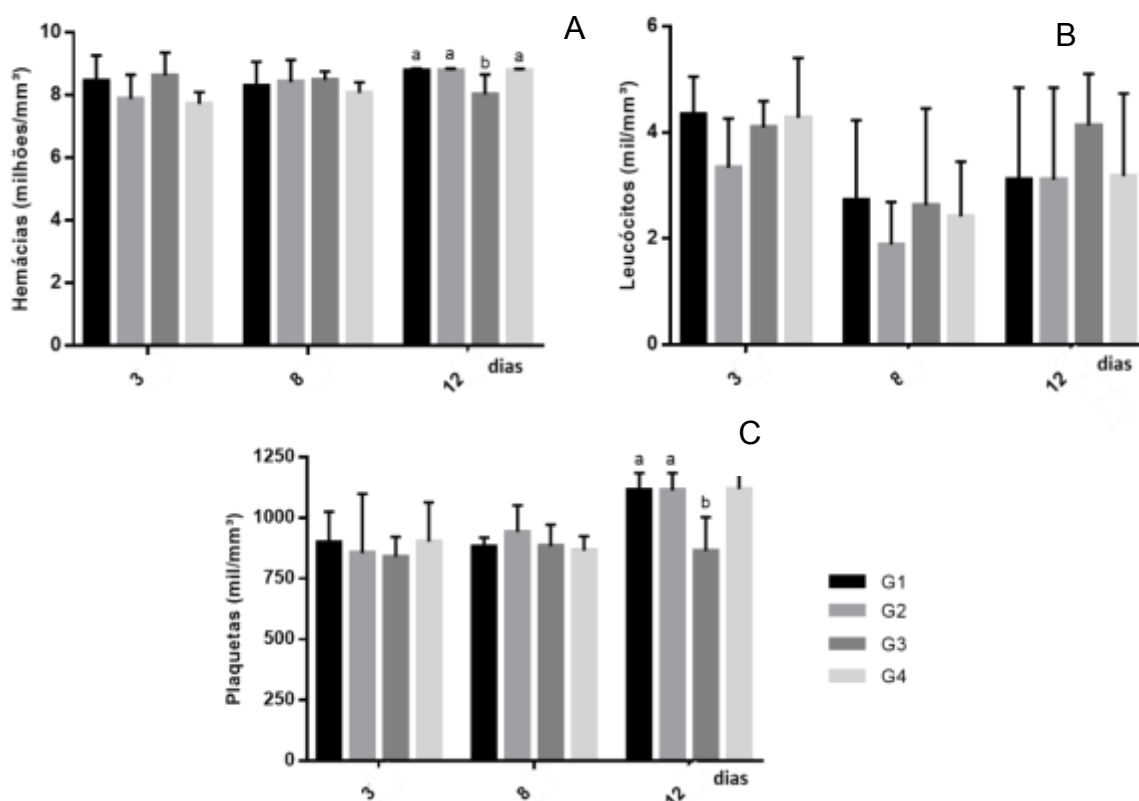


Figura 14. Análise hematológica dos animais durante o tratamento das feridas com a pomada contendo extrato etanólico de *Heteropterys brasiliensis* nos tempos 3, 8 e 12 dias. A - Hemácias (milhões/ mm^3). B – Leucócitos (mil/ mm^3). C – Plaquetas (mil/ mm^3). G1 - Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada; G2 - Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata; G3 - Grupo tratamento pomada 5%; G4 - Grupo tratamento pomada 10%. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

4.5. Perfil oxidativo tecidual

O perfil oxidativo tecidual foi determinado através da avaliação de marcadores de estresse oxidativo (óxido nítrico e malondialdeído) e atividade de enzimas antioxidantes (catalase, glutathione S-transferase e superóxido dismutase). As taxas de malondialdeído (MDA) foram significativamente maiores para o controle contendo apenas o veículo (G1) nos tempos 3, 8 e 12 dias pós-lesão. No terceiro e décimo segundo dia após a indução das feridas, os menores valores de MDA foram notados para o controle positivo (G2) e pomada à base do extrato 10% (G4) (Figura 15).

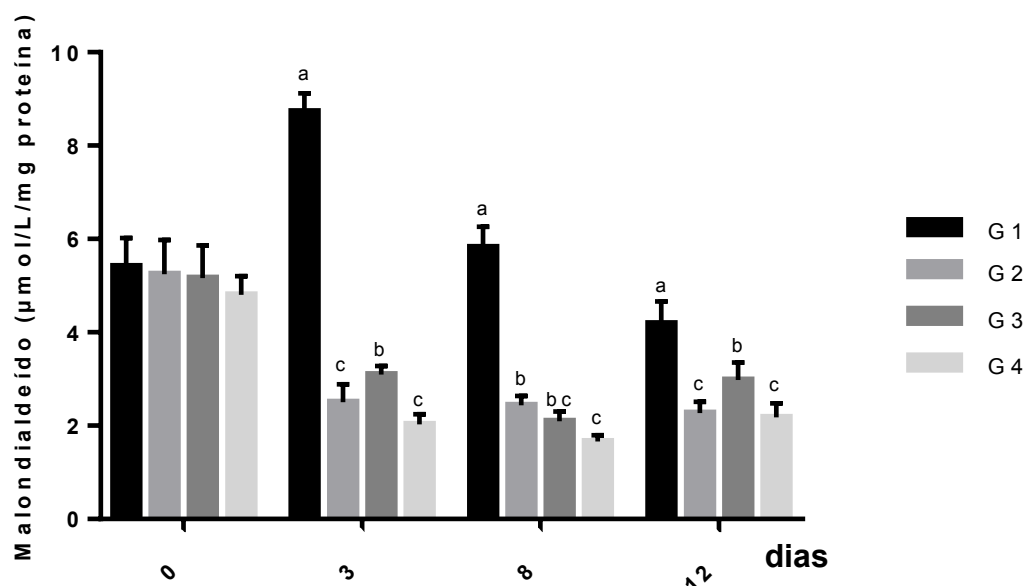


Figura 15. Efeito da pomada contendo extrato etanólico de *Heteropterys brasiliensis* sobre a concentração tecidual de malondialdeído (MDA) ($\mu\text{mol/L/mg}$ de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão de 6 animais em cada grupo. G1 - Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada; G2 - Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata; G3 - Grupo tratamento pomada 5%; G4 - Grupo tratamento pomada 10%. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

Os níveis de óxido nítrico nas amostras de pele dos camundongos eutanasiados nos dias 3, 8 e 12 após a indução da ferida foi significativamente superior no grupo experimental pomada com o extrato 10% (G4) no terceiro e oitavo dia pós-lesão. No décimo segundo dia, os níveis de óxido nítrico de G4 reduziram, sendo significativamente igual ao controle positivo (G2). O tratamento com a pomada do extrato a 5% (G3) foi estatisticamente igual ao controle positivo (G2) nos tempos 3 e 8 dias pós-lesão (Figura 16).

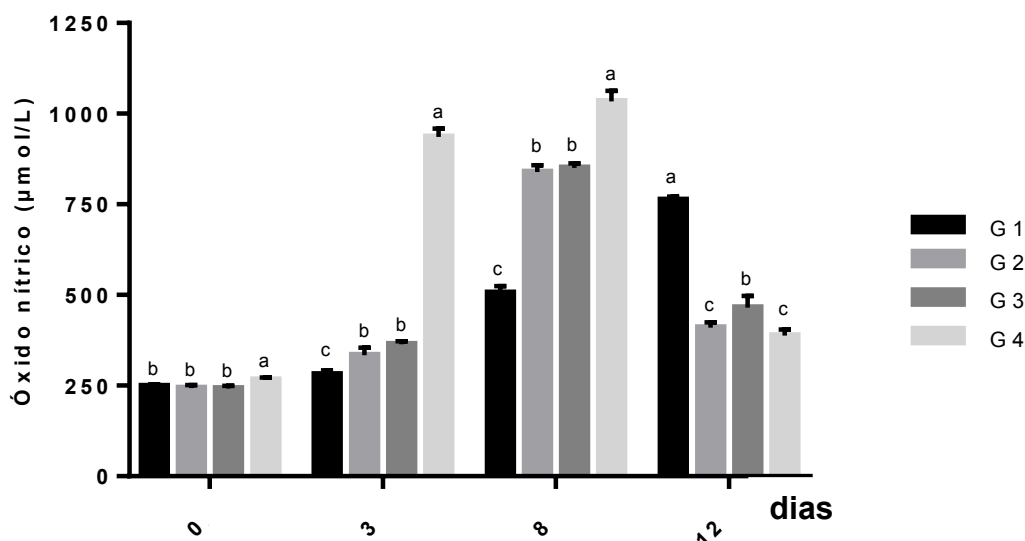


Figura 16. Efeito da pomada contendo extrato etanólico de *Heteropterys brasiliensis* sobre a concentração tecidual de óxido nítrico ($\mu\text{mol/L}$) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão de 6 animais em cada grupo. G1 - Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada; G2 - Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata; G3 - Grupo tratamento pomada 5%; G4 - Grupo tratamento pomada 10%. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

A atividade de catalase teve seu nível aumentado no terceiro dia após a indução da ferida. Para este tempo, não houve diferença estatística entre os tratamentos com sulfadiazina de prata (G2), pomada contendo o extrato de *H. brasiliensis* 5% (G3) e pomada do extrato 10% (G4). No oitavo dia pós-lesão, nota-se um aumento mais significativo no nível de catalase nos grupos G3 e G4. Ao final do tratamento, décimo segundo dia, o maior nível de catalase foi notado em G3. Os grupos experimentais G2 e G4 foram significativamente iguais para este mesmo período. Em todos os tempos de análise o grupo controle negativo (G1) apresentou os menores níveis de catalase (Figura 17).

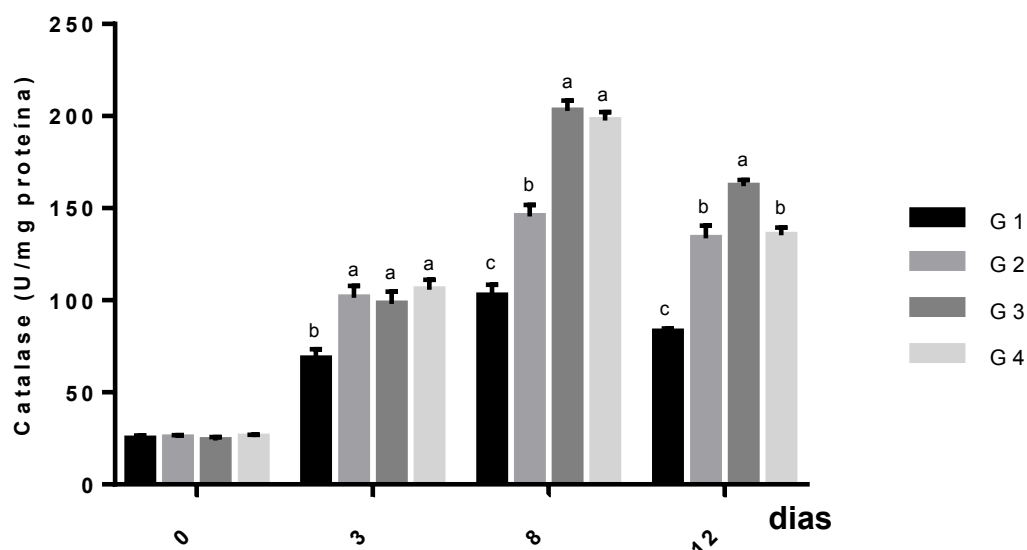


Figura 17. Efeito da pomada contendo extrato etanólico de *Heteropterys brasiliensis* sobre atividade da enzima catalase (CAT) (U/mg de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão de 6 animais em cada grupo. G1 - Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada; G2 - Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata; G3 - Grupo tratamento pomada 5%; G4 - Grupo tratamento pomada 10%. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

Na figura 18 estão apresentados os resultados obtidos na determinação de superóxido dismutase (SOD). Os níveis de SOD foram mais elevados no oitavo dia após a indução da ferida, na qual para o tratamento com a pomada do extrato na concentração de 10% (G4) o nível foi de $52 \pm 0,8$ U/mg de proteína e o segundo maior valor obtido foi para o tratamento com a pomada 5% (G3) com $44,2 \pm 1,2$ U/mg de proteína.

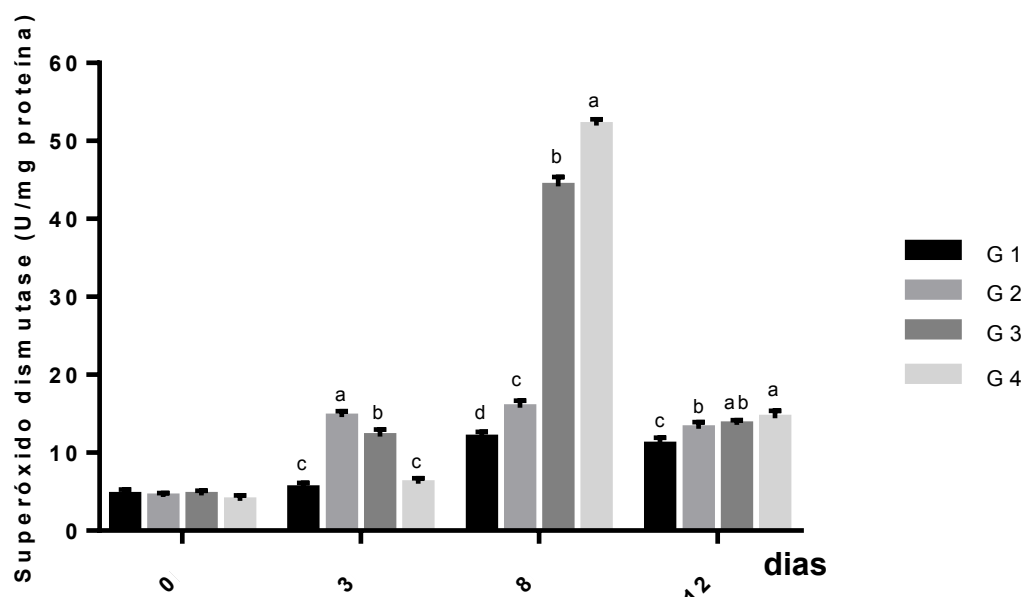


Figura 18. Efeito da pomada contendo extrato etanólico de *Heteropterys brasiliensis* sobre atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (U/mg de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. G1 - Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada; G2 - Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata; G3 - Grupo tratamento pomada 5%; G4 - Grupo tratamento pomada 10%. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

A figura 19 apresenta os resultados obtidos na determinação de glutathione S-transferase (GST). No terceiro dia após indução da lesão, o maior nível de GST foi observado para o tratamento com a pomada à base do extrato na concentração de 10% (G4), seguida do grupo controle positivo (G2). O tratamento com a pomada 5% (G3) foi estatisticamente igual ao controle negativo (G1) para este mesmo tempo de análise. No oitavo dia pós-lesão, os níveis de GST foi maior para o G3, seguido de G4, G2 e G1. No décimo segundo dia, o nível mais elevado foi determinado em G4, ao passo que G2 e G3 foram significativamente iguais.

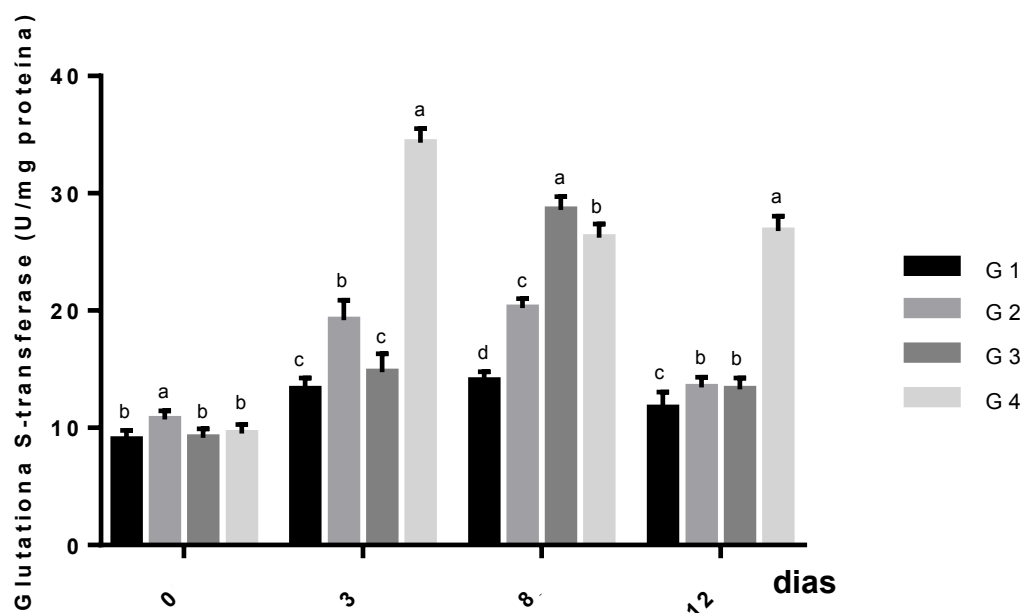


Figura 19. Efeito da pomada contendo extrato etanólico de *Heteropterys brasiliensis* sobre atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) (U/mg de proteína) nos tempos 0, 3, 8 e 12 dias. Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão de 6 animais em cada grupo. G1 - Grupo controle com veículo usado para o preparo da pomada; G2 - Grupo controle com pomada sulfadiazina de prata; G3 - Grupo tratamento pomada 5%; G4 - Grupo tratamento pomada 10%. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante (ANOVA seguida pelo teste post-hoc de Tukey).

5. DISCUSSÃO

O retardo no processo de cicatrização de feridas é uma das intercorrências mais críticas que afeta negativamente a qualidade de vida dos pacientes e impõe maiores gastos hospitalares (RAZIYEVA et al., 2021). Além disso, os processos infecciosos causados por patógenos é um dos fatores agravantes para o atraso na cicatrização e tem se tornado uma séria ameaça a vida humana (FARAHANI et al., 2020). Esse evento ocorre, pois, quando uma pele é lesionada o tecido danificado perde sua função primária como barreira protetora e torna propensa às infecções induzidas por bactérias como, *E. coli*, *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*). Desta forma, a busca por extratos vegetais que apresentem capacidade antibacteriana torna-se altamente atraente em pesquisas que visam o tratamento de feridas cutâneas (ZHANG et al., 2021).

Na avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *H. brasiliensis*, embora tenha-se resultados relevantes para todas as espécies bacterianas testadas, observou-se os menores valores de CIM, ou seja, uma melhor atividade antibacteriana, para isolados bacterianos de *S. aureus* tanto no extrato hexânico quanto no extrato etanólico. Essa variação de CIM pode ser atribuída à composição da parede celular das bactérias testadas. As bactérias gram negativas, como *E. coli*, têm uma estrutura de parede celular compreendendo duas camadas de membrana lipídica flanqueando de cada lado de uma fina camada de peptidoglicano. Em contrapartida, as bactérias gram positivas, como *S. aureus*, apresentam uma camada mais espessa de peptidoglicano no espaço periplasmático da membrana celular (CHINNASAMY et al., 2019). Conseqüentemente, os compostos ativos presentes nos extratos de *H. brasiliensis* podem ter sido capazes de penetrar com maior facilidade a parede celular de *S. aureus* e desta forma, inviabilizar mais eficientemente essas bactérias.

Além do efeito antibacteriano, para que uma formulação seja considerada preferida para cicatrização de feridas a mesma deve inibir a superprodução de radicais livres e a secreção de longo prazo de citocinas pró-inflamatórias no tecido da ferida, independentemente se a formulação é constituída por produtos naturais e/ou compostos sintéticos (AHMADIAN et al., 2021). Este fator está relacionado a primeira e essencial fase do processo de cicatrização de feridas que é a fase inflamatória. Iniciada durante a hemostasia, esta etapa é caracterizada pelo influxo de células

inflamatórias, acúmulo de mediadores lipídicos e inflamatórios como citocinas, e liberação de enzimas de degradação da matriz extracelular (RODRIGUES et al., 2019). Um processo inflamatório localizado e adequadamente controlado atua como um gatilho para as fases proliferativa e de remodelação. Por outro lado, as respostas inflamatórias descontroladas ou prolongadas levam ao comprometimento das fases subsequentes do processo de cicatrização da ferida (HOLL et al., 2021). Nesse processo, o NO é uma potente molécula pró-inflamatória que causa vasodilatação e migração celular (GARCÍA-ARANDA et al., 2020). Portanto, a redução do NO pode ser um bom alvo terapêutico para reduzir uma longa resposta inflamatória e consequentemente promover a cicatrização eficiente de feridas (CHANIAD et al., 2020). Assim, no presente estudo, a atividade anti-inflamatória dos extratos de *H. brasiliensis* foi determinada em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS, uma importante endotoxina capaz de aumentar fortemente a resposta imunológica e a produção de NO (SIMPSON & TRENT, 2019; VAN EEDEN et al., 2020; YU et al., 2019). Os resultados revelaram que ambos os extratos reduziram a produção de óxido nítrico de forma dose-dependente. Sendo que, o extrato hexânico apresentou uma maior taxa de redução de NO quando comparado ao extrato etanólico para todas as concentrações testadas.

Outro parâmetro que foi utilizado para determinar o potencial anti-inflamatório dos extratos *in vitro* é a avaliação da inibição de desnaturação de proteína. Os extratos de *H. brasiliensis* atuaram como fortes inibidores da desnaturação da albumina bovina após tratamento com calor. O extrato hexânico chegou a taxa de inibição de $99,3 \pm 0,81\%$ e $98,56 \pm 0,92\%$ para as concentrações de 5 mg/mL e 2,5 mg/mL, respectivamente. Valores muito semelhantes ao controle positivo utilizado (diclofenaco de sódio) com $99 \pm 0,91\%$ e $98 \pm 1,1\%$, para respectivamente as mesmas concentrações. A desnaturação de proteínas é uma causa bem documentada de inflamação (GOVINDAPPA et al., 2011). Anteriormente, também com intuito de determinar o potencial anti-inflamatório, vários pesquisadores analisaram o efeito de diferentes partes de plantas na desnaturação de proteínas, por exemplo, o extrato aquoso de *Malvastrum coromandelianum* em albumina do ovo (YADAY & MOHITE, 2020), extratos de folhas de *Moringa oleífera* em albumina bovina (SALEEM et al., 2020) e os extratos alcoólicos de flores de *Cocos nucifera* também em albumina bovina (SELVAKUMAR et al., 2022). Além disso, já foi comprovado que anti-inflamatórios não esteroidais convencionais como, fenilbutazona e indometacina além

de inibirem a produção endógena de prostaglandinas, bloqueando as enzimas COX-1 e COX-2, também previnem a desnaturação de proteínas (YESMIN et al., 2020). No entanto, o mecanismo real pelo qual a desnaturação proteica se relaciona ao processo inflamatório ainda não está bem estabelecido. Foi sugerido que quando não há desnaturação de proteínas, há uma maior estabilização das membranas celulares. Desta forma, foi proposto que os extratos podem inibir a liberação dos constituintes lisossômicos dos neutrófilos no local da inflamação. Os constituintes lisossômicos são enzimas bactericidas e proteinases que, após a liberação extracelular, aumentam a inflamação e dano tecidual (GUNATHILAKE et al., 2018).

Durante o dano tecidual, como na ferida, baixos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) são favoráveis à cicatrização eficiente, uma vez que a migração celular e formação de novos vasos sanguíneos são estimulados (XU et al., 2020). Porém, altas e sustentadas taxas de ERO leva ao estresse oxidativo prejudicando o reparo de feridas causando o comprometimento das funções dos fibroblastos e queratinócitos. Portanto, manter o equilíbrio de redox nas células, ou seja, alcançar efetivamente o efeito antioxidante é necessário para o bom processo de cicatrização (DUNNILL et al., 2017). Enzimas antioxidantes são responsáveis por controlar ERO na cicatrização de feridas (SARANDY et al., 2022). Neste estudo, foram avaliados *in vivo* a atividade antioxidante das pomadas de *H. brasiliensis* através da determinação da concentração de importantes enzimas antioxidantes celulares, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) e dos marcadores malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (NO) (SARANDY et al., 2022; SAXENA et al., 2022; STEPHENIE et al., 2020; TUZET et al., 2019).

O extrato etanólico das folhas de *H. brasiliensis* apresentou uma atividade antioxidante *in vivo*, corroborando com os resultados obtidos no ensaio *in vitro*. No oitavo dia após a indução da lesão os resultados mostraram um aumento significativo de SOD, CAT e GST evidenciando o efeito antioxidante para ambas as pomadas de *H. brasiliensis* e conseqüentemente um auxílio na cicatrização das feridas. Outro importante marcador de estresse oxidativo avaliado foi a produção de MDA, um produto final bem conhecido da peroxidação lipídica, que tem sua concentração diretamente regulada em resposta ao aumento da quantidade de radicais livres (ALIZADEH & KHEIROURI, 2019). As taxas de MDA das pomadas contendo o extrato etanólico de *H. brasiliensis* foram inferiores ao tratamento contendo apenas o veículo da pomada para todos os tempos experimentais.

Adicionalmente, o perfil oxidativo foi avaliado pela determinação de NO, os resultados obtidos mostraram os níveis mais evidentes no tratamento com a pomada de *H. brasiliensis* a 10% no terceiro e oitavo dia após a indução da ferida. O NO pode atuar na redução da oxidação, atuando na inibição de reações de peroxidação lipídica e oxidação de lipoproteínas (HUMMEL et al., 2006). Desta forma, foi possível notar a eficiência da pomada de *H. brasiliensis* no controle do estresse oxidativo. Embora os resultados obtidos na determinação de NO pareçam ser contraditórios, visto que *in vitro* houve uma diminuição de NO na atividade anti-inflamatória e *in vivo* um aumento do mesmo na atividade antioxidante. O NO apresenta uma diversidade química muito grande e conseqüentemente uma variabilidade na atividade biológica, dado que o NO pode ser um sinalizador, uma molécula, uma toxina, um pró-oxidante e um antioxidante dependendo das condições do meio (HUMMEL et al., 2006). Assim, essa contradição nos resultados da quantificação de NO *in vitro* e *in vivo* se justifica, uma vez que houve uma diferença no tempo de análise, além do modelo animal existir uma complexidade das vias atuantes no processo de cicatrização.

Outras espécies do gênero *Heteropterys* já foram descritas por apresentarem atividade antioxidante. Galvão e colaboradores (2011) investigaram o efeito do tratamento oral com o extrato de *Heteropterys aphrodisiaca* sobre a memória de ratos e a atividade antioxidante pela determinação de MDA. Os resultados demonstraram uma melhora do aprendizado e memória dos animais tratados com o extrato, além de uma atividade antioxidante. Mattei e colaboradores (2001) pesquisaram os efeitos dos extratos de *H. aphrodisiaca* nas defesas antioxidantes dos cérebros de ratos. Os níveis de SOD foram aumentados nos animais tratados, porém as enzimas antioxidantes CAT e GST não apresentaram valores significativos com os tratamentos. Os relatos do efeito antioxidante de outras espécies do gênero corroboram com os dados obtidos para os extratos de *H. brasiliensis*.

Quanto ao efeito cicatrizante propriamente dito, foi inicialmente utilizado uma análise *in vitro* para dar prosseguimento com os experimentos *in vivo*, visto que os estudos utilizando análises *in vitro* são uma ferramenta muito importante para ajudar a direcionar os estudos *in vivo* (JAMIESON et al., 2017). O teste de viabilidade celular possibilita a avaliação do efeito citotóxico ou proliferativo quando células são submetidas ao tratamento em diferentes concentrações de um determinado composto/extrato (ADAN et al., 2016). Os resultados obtidos demonstraram que os

extratos hexânico e etanólico de *H. brasiliensis* contribuíram para a proliferação celular tanto em fibroblastos quanto em macrófagos, sendo que a maior taxa de proliferação foi observada no extrato etanólico na maior concentração testada (400 µg/mL). A proliferação *in vitro* dessas linhagens celulares são importantes indicadores da atividade cicatrizante *in vivo* de espécies vegetais (DINDA et al., 2016; MHLONGO et al., 2022). Os fibroblastos apresentam um papel fundamental na contração da ferida, exercendo estresse na matriz extracelular circundante e estimulando a secreção de proteínas da matriz extracelular, como o colágeno (THEOCHARIS et al., 2019). Os macrófagos são células do sistema imunológico que atuam na coordenação de processos inflamatórios, proliferativos e angiogênicos (KIM et al., 2019). Apesar dos extratos contribuírem de forma significativa para a proliferação celular, não foi observado um elevado efeito citoprotetor para as linhagens celulares testadas. Os achados na atividade antioxidante *in vitro* e proliferação celular de fibroblastos e macrófagos foram determinantes para o prosseguimento das análises utilizando apenas o extrato etanólico.

O método de scratch assay foi utilizado para a determinação da taxa de migração celular de fibroblastos NIH/3T3 e macrófagos RAW 264.7. O método se trata de uma técnica *in vitro* importante para avaliar compostos terapêuticos antes do uso clínico, em especial na busca de terapias que auxiliem no processo de cicatrização de feridas (BOBADILLA et al., 2019). Neste ensaio, as células foram tratadas com mitomicina C juntamente com o extrato etanólico de *H. brasiliensis* nas concentrações de 200 µg/mL e 400 µg/mL. A utilização da mitomicina C garante a inibição da proliferação das células, possibilitando a análise apenas da taxa de migração celular (BLAKE et al., 2006). Os resultados mostraram que o extrato etanólico foi capaz de acelerar o processo migratório, chegando a encobrir quase que a totalidade da fenda realizada após 24h com o tratamento na maior concentração (400 µg/mL). É sabido que durante a cicatrização de feridas a migração de células, em especial de fibroblastos é fundamental para o reparo da ferida (SAHELI et al., 2020). Desta forma, a notória migração das linhagens celulares testadas quando tratadas com *H. brasiliensis* possibilitou inferir um grande potencial cicatrizante e o prosseguimento para os testes *in vivo*.

Na análise do processo de cicatrização de feridas *in vivo*, foi possível notar que as pomadas de *H. brasiliensis* atuaram na contração das feridas e auxiliaram na proliferação celular. Saiko e colaboradores (2020) afirmam que o índice de contração

da ferida é um bom indicador de cicatrização potencial. Dey e colaboradores (2019) retrataram em sua pesquisa que compostos presentes em extratos vegetais podem aumentar a contração da ferida e taxa de epitelização através de suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e efeitos antioxidantes. No terceiro e oitavo dia após indução da ferida foram observados um aumento da celularidade e vasos sanguíneos nos tratamentos utilizando a pomada contendo *H. brasiliensis* 5% e 10%. Este evento é um indicativo que o processo de cicatrização nos animais está na fase de proliferação, caracterizada pelo aumento do número de células, principalmente fibroblastos, bem como vascularização e síntese de fibras de colágeno (SUBRAMANIAM et al., 2016). No décimo segundo dia pós-ferida, observou-se uma diminuição de vasos sanguíneos e celularidade, demonstrando que a ferida está em processo de maturação (SARANDY et al., 2022).

6. CONCLUSÃO

Os extratos hexânico e etanólico da planta *Heteropterys brasiliensis* apresentaram atividade antibacteriana para bactérias gram-positivas e gram-negativas. A atividade anti-inflamatória *in vitro* foi demonstrada nos dois extratos testados, com melhores resultados para o extrato hexânico. O potencial cicatrizante foi notado *in vitro* pela proliferação e migração de células envolvidas no processo de cicatrização, sendo o extrato etanólico com uma maior taxa de proliferação de fibroblastos e macrófagos. A análise *in vivo* corroborou com os resultados obtidos *in vitro*, as pomadas contendo o extrato etanólico auxiliaram na contração da ferida, aumento de vasos sanguíneos e celularidade, principalmente na formulação contendo 5% (m/m) do extrato. A atividade antioxidante tecidual foi notória nas lesões tratadas com as pomadas de *H. brasiliensis*. Por fim, o efeito anti-inflamatório, antibacteriano e antioxidante de *H. brasiliensis* foram favoráveis na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em camundongos, além dos extratos auxiliarem no processo de cicatrização propriamente dito.

REFERÊNCIAS

Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current pharmaceutical biotechnology*, 17(14), 1213-1221. doi: 10.2174/1389201017666160808160513

Ahmadian, Z., Correia, A., Hasany, M., Figueiredo, P., Dobakhti, F., Eskandari, M. R., ... & Shahbazi, M. A. (2021). A hydrogen-bonded extracellular matrix-mimicking bactericidal hydrogel with radical scavenging and hemostatic function for pH-responsive wound healing acceleration. *Advanced healthcare materials*, 10(3), 2001122. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001122>

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>

Alizadeh, M., & Kheirouri, S. (2019). Curcumin reduces malondialdehyde and improves antioxidants in humans with diseased conditions: A comprehensive meta-analysis of randomized controlled trials. *BioMedicine*, 9(4). 10.1051/bmdcn/2019090423

Altoé, L. S., Alves, R. S., Sarandy, M. M., Morais-Santos, M., Novaes, R. D., & Gonçalves, R. V. (2019). Does antibiotic use accelerate or retard cutaneous repair? A systematic review in animal models. *PLoS One*, 14(10), e0223511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223511>

Anvisa, B. (2013). Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. *Anvisa, Brasília. ALP, H*, 970-975.

Blake, D. A., Sahiner, N., John, V. T., Clinton, A. D., Galler, K. E., Walsh, M., ... & Ayyala, R. S. (2006). Inhibition of cell proliferation by mitomycin C incorporated into P (HEMA) hydrogels. *Journal of glaucoma*, 15(4), 291-298. 10.1097/01.ijg.0000212236.96039.9c

Bobadilla, A. V. P., Arévalo, J., Sarró, E., Byrne, H. M., Maini, P. K., Carraro, T., ... & Alarcón, T. (2019). *In vitro* cell migration quantification method for scratch

assays. *Journal of the Royal Society Interface*, 16(151), 20180709. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0709>

Brandão, M. G., Zanetti, N. N., Oliveira, P., Graell, C. F., Santos, A. C., & Monte-Mór, R. L. (2008). Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.004>

Broderick, N. (2009). Understanding chronic wound healing. *The Nurse Practitioner*, 34(10), 16-22. DOI: 10.1097/01.NPR.0000361299.88402.f6

Can, N. M., & Thao, D. T. P. (2020). Wound Healing Activity of *Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore. Leaf Hydroethanolic Extract. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2483187>

Casao, T. D. R. L., Pinheiro, C. G., Sarandy, M. M., Zanatta, A. C., Vilegas, W., Novaes, R. D., ... & Leite, J. P. V. (2020). Croton urucurana Baillon stem bark ointment accelerates the closure of cutaneous wounds in knockout IL-10 mice. *Journal of ethnopharmacology*, 261, 113042. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113042>

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>

Chinnasamy, G., Chandrasekharan, S., & Bhatnagar, S. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Melia azedarach*: Enhancement of antibacterial, wound healing, antidiabetic and antioxidant activities. *International journal of nanomedicine*, 9823-9836. 10.2147/IJN.S231340

CLSI, W. (2012). Clinical and laboratory standards institute methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. *Approved Standard M7-A7, CLSI, seventh ed., PA, USA*.

CNCFlora. *Heteropterys brasiliensis* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em

<<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Heteropterys brasiliensis>>. Acesso em 30 dezembro 2022.

da Silva, F. H., Moreira, C., & Bertolini, G. R. F. (2022). *Heteropterys tomentosa* and Interactions with the Musculoskeletal System: Systematic Review. *Journal of Health Sciences*, 24(1), 47-51. <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2022v24n1p47-51>

Dev, S. K., Choudhury, P. K., Srivastava, R., & Sharma, M. (2019). Antimicrobial, anti-inflammatory and wound healing activity of polyherbal formulation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 555-567. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.075>

Dinda, M., Mazumdar, S., Das, S., Ganguly, D., Dasgupta, U. B., Dutta, A., ... & Karmakar, P. (2016). The water fraction of *Calendula officinalis* hydroethanol extract stimulates *in vitro* and *in vivo* proliferation of dermal fibroblasts in wound healing. *Phytotherapy Research*, 30(10), 1696-1707. <https://doi.org/10.1002/ptr.5678>

Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., ... & Georgopoulos, N. T. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International wound journal*, 14(1), 89-96. <https://doi.org/10.1111/iwj.12557>

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>

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>

Galvão, S. M. P., Mendes, F. R., Oliveira, M. G. M. D., Mattei, R., Mello, J. C. P. D., Roman Júnior, W. A., & Carlini, E. D. A. (2011). Memory retrieval improvement by *Heteropterys aphrodisiaca* in aging rats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47, 825-832. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000400020>

García-Aranda, M. I., Gonzalez-Padilla, J. E., Gómez-Castro, C. Z., Gómez-Gómez, Y. M., Rosales-Hernández, M. C., García-Báez, E. V., ... & Padilla-Martínez, I. I. (2020). Anti-inflammatory effect and inhibition of nitric oxide production by targeting COXs and iNOS enzymes with the 1, 2-diphenylbenzimidazole pharmacophore. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28(9), 115427. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115427>

Gonçalves, R. V., Novaes, R. D., Matta, S. L., Benevides, G. P., Faria, F. R., & Pinto, M. V. (2010). Comparative study of the effects of gallium-aluminum-arsenide laser photobiomodulation and healing oil on skin wounds in wistar rats: a histomorphometric study. *Photomedicine and Laser Surgery*, 28(5), 597-602. <https://doi.org/10.1089/pho.2009.2669>

Govindappa, M., Naga Sravya, S., Poojashri, M. N., Sadananda, T. S., Chandrappa, C. P., Santoyo, G., ... & Anil Kumar, N. V. (2011). Antimicrobial, antioxidant and *in vitro* anti-inflammatory activity and phytochemical screening of water extract of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *Journal of medicinal plants research*, 5(24), 5718-5729.

Gunathilake, K. D. P. P., Ranaweera, K. K. D. S., & Rupasinghe, H. V. (2018). *In vitro* anti-inflammatory properties of selected green leafy vegetables. *Biomedicines*, 6(4), 107. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6040107>

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>

Holl, J., Kowalewski, C., Zimek, Z., Fiedor, P., Kaminski, A., Oldak, T., ... & Eljaszewicz, A. (2021). Chronic diabetic wounds and their treatment with skin substitutes. *Cells*, 10(3), 655. <https://doi.org/10.3390/cells10030655>

Huerta-Reyes, M., Sánchez-Vargas, L. O., Villanueva-Amador, G. S., & Gaitán-Cepeda, L. A. (2021). Anti-HIV and Anti-Candidal Effects of Methanolic Extract from *Heteropterys brachiata*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(14), 7270. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147270>

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>

Jamieson, L. E., Asiala, S. M., Gracie, K., Faulds, K., & Graham, D. (2017). Bioanalytical measurements enabled by surface-enhanced Raman scattering (SERS) probes. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 10, 415-437. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071015-041557>

Johnston, D. E. (1990). Wound healing in skin. *Veterinary clinics of North America: small animal practice*, 20(1), 1-25. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(90\)50001-7](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(90)50001-7)

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/advs.201900513>

Landén, N. X., Li, D., & Stähle, M. (2016). Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(20), 3861-3885. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2268-0>

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.

Mandelbaum, S. H., Di Santis, É. P., & Mandelbaum, M. H. S. A. (2003). Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 78(4), 393-408. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962003000400002>

Maria de Fátima, G. S., Andrade, Y. A. D. M. V., & Moriya, T. (2008). Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina (Ribeirao Preto Online)*, 41(3), 259-264. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v41i3p259-264>

Mattei, R., Paz Barros, M., Pereira Galvão, S. M., Bechara, E. J. H., & de Araujo Carlini, E. L. (2001). *Heteropteris aphrodisiaca* O. Machado: effects of extract BST 0298 on the oxidative stress of young and old rat brains. *Phytotherapy Research*, 15(7), 604-607. <https://doi.org/10.1002/ptr.838>

Maver, T., Maver, U., Stana Kleinschek, K., Smrke, D. M., & Kreft, S. (2015). A review of herbal medicines in wound healing. *International Journal of Dermatology*, 54(7), 740-751. <https://doi.org/10.1111/ijd.12766>

Mendes, F. R., & Rodrigues, E. (2018). *Heteropterys tomentosa* A. Juss. In *Medicinal and Aromatic Plants of South America* (pp. 227-239). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1552-0_20

Mhlongo, F., Cordero-Maldonado, M. L., Crawford, A. D., Katerere, D., Sandasi, M., Hattingh, A. C., ... & Viljoen, A. M. (2022). Evaluation of the wound healing properties of South African medicinal plants using zebrafish and *in vitro* bioassays. *Journal of Ethnopharmacology*, 286, 114867. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114867>

Nagar, H. K., Srivastava, A. K., Srivastava, R., Kurmi, M. L., Chandel, H. S., & Ranawat, M. S. (2016). Pharmacological investigation of the wound healing activity of *Cestrum nocturnum* (L.) ointment in Wistar albino rats. *Journal of pharmaceuticals*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9249040>

OECD. Guidelines for Testing of Chemicals (Test No. 402), Acute Dermal Toxicity (1987).

Paes, C., Nakagami, G., Minematsu, T., Nagase, T., Huang, L., Sari, Y., & Sanada, H. (2012). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone enhances keratinocyte migration and induces Mmp13 gene expression *in vitro*. *Biochemical and biophysical research communications*, 427(2), 273-279. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.037>

Palazzo, F.; Pereira, L.C.M.S.; Mello, E.V.S.L. & Mello, J.C.P. Cicatrização de feridas cutâneas com aplicação de pomada de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil., 16, Recife. 2000. Programa e Resumos... Recife, p.183. 2000.

Pessoa, C.; Almeida, R.F.; Amorim, A.M.A. *Heteropterys* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB114627>>. Acesso em: 30 dezembro 2022.

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>

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>

Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound healing: a cellular perspective. *Physiological reviews*, 99(1), 665-706.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>

Saheli, M., Bayat, M., Ganji, R., Hendudari, F., Kheirjou, R., Pakzad, M., ... & Piryaeei, A. (2020). Human mesenchymal stem cells-conditioned medium improves diabetic wound healing mainly through modulating fibroblast behaviors. *Archives of dermatological research*, 312, 325-336. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-02016-6>

Saiko, G., Lombardi, P., Au, Y., Queen, D., Armstrong, D., & Harding, K. (2020). Hyperspectral imaging in wound care: a systematic review. *International Wound Journal*, 17(6), 1840-1856. <https://doi.org/10.1111/iwj.13474>

Saleem, A., Saleem, M., & Akhtar, M. F. (2020). Antioxidant, anti-inflammatory and antiarthritic potential of *Moringa oleifera* Lam: An ethnomedicinal plant of Moringaceae family. *South African Journal of Botany*, 128, 246-256.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.023>

Sarandy, M. M., Gusmão, L. J., Purgato, G. A., Píccolo, M. S., da Matta, S. L. P., Pizziolo, V. R., ... & Diaz, M. A. N. (2022). Hydroalcoholic extract of *Remijia ferruginea* accelerates the closure of skin wounds by modulating tissue morphology and antioxidant profile: An *in vitro* and *in vivo* study. *Journal of Ethnopharmacology*, 296, 115464.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115464>

Saxena, P., Selvaraj, K., Khare, S. K., & Chaudhary, N. (2022). Superoxide dismutase as multipotent therapeutic antioxidant enzyme: Role in human diseases. *Biotechnology Letters*, 1-22. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03200-3>

Selvakumar, P., Kapupara, D. J., Monica, C. L., & Husain, D. (2022). Anti-Inflammatory Activity Comparative of *Cocos Nucifera* Male and Female Flowers Alcoholic Extracts.

Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>

Simpson, B. W., & Trent, M. S. (2019). Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nature Reviews Microbiology*, 17(7), 403-416. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0201-x>

Singer, A. J., & Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, 341(10), 738-746. DOI: 10.1056/NEJM199909023411006

Stanojic, M., Vinaik, R., & Jeschke, M. G. (2018). Status and challenges of predicting and diagnosing sepsis in burn patients. *Surgical infections*, 19(2), 168-175. <https://doi.org/10.1089/sur.2017.288>

Stephenie, S., Chang, Y. P., Gnanasekaran, A., Esa, N. M., & Gnanaraj, C. (2020). An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *Journal of Functional Foods*, 68, 103917. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103917>

Subramaniam, T., Fauzi, M. B., Lokanathan, Y., & Law, J. X. (2021). The role of calcium in wound healing. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6486. <https://doi.org/10.3390/ijms22126486>

Szwed, D. N., & dos Santos, V. L. P. (2016). Fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de pele. *Cadernos da Escola de Saúde*, 1(15).

Thangapazham, R. L., Sharad, S., & Maheshwari, R. K. (2016). Phytochemicals in wound healing. *Advances in wound care*, 5(5), 230-241. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0505>

Theocharis, A. D., Manou, D., & Karamanos, N. K. (2019). The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *The FEBS journal*, 286(15), 2830-2869. <https://doi.org/10.1111/febs.14818>

Tuzet, A., Rahantaniaina, M. S., & Noctor, G. (2019). Analyzing the function of catalase and the ascorbate–glutathione pathway in H₂O₂ processing: Insights from an experimentally constrained kinetic model. *Antioxidants & redox signaling*, 30(9), 1238-1268. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7601>

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>

van Eeden, W. A., van Hemert, A. M., Carlier, I. V., Penninx, B. W., Lamers, F., Fried, E. I., ... & Giltay, E. J. (2020). Basal and LPS-stimulated inflammatory markers and the course of individual symptoms of depression. *Translational psychiatry*, 10(1), 235. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-00920-4>

Vicente, E. M. D. N. S. (2018). *Quantificação e classificação do teor de antocianinas e suas atividades biológicas em três variedades de Hibiscus rosasinensis L* (Doctoral dissertation).

Witte, M. B., & Barbul, A. (1997). General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 509-528. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(05\)70566-1](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(05)70566-1)

Xu, Z., Han, S., Gu, Z., & Wu, J. (2020). Advances and impact of antioxidant hydrogel in chronic wound healing. *Advanced healthcare materials*, 9(5), 1901502. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901502>

Yadav, A., & Mohite, S. (2020). Screening of *In-vitro* anti-inflammatory and Antibacterial assay of *Malvastrum Coromandelianum*. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 11(4), 68-70.

Yesmin, S., Paul, A., Naz, T., Rahman, A. B. M., Akhter, S. F., Wahed, M. I. I., ... & Siddiqui, S. A. (2020). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of ethanolic root extract of Choi (*Piper chaba*). *Clinical Phytoscience*, 6(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00207-7>

Yu, R., Li, Q., Feng, Z., Cai, L., & Xu, Q. (2019). m6A reader YTHDF2 regulates LPS-induced inflammatory response. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1323. <https://doi.org/10.3390/ijms20061323>

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**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 35/2021, intitulado “**Atividade cicatrizante *in vitro* e em feridas cutâneas induzidas em ratos de extratos de plantas da mata atlântica e cerrado**”, coordenado pela professora Marisa Nogueira Diaz 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/MCTI, a DBCA (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 28/05/2021, com validade de 2 anos.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 35/2021, named “**Healing activity in vitro and in skin wounds induced in rats from plant extracts from the Atlantic and Cerrado forests**”, 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/MCTIC therefore being approved by the Committee on May 28, 2021 valid for 2 years.



Prof. Mariella Bontempo Duca de Freitas

Coordenadora

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV