



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI – UFSJ**  
**CAMPUS CENTRO-OESTE DONA LINDU – CCO**  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**

**BRUNA RENATA PIMENTA TARÔCO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO DE**  
*Achyrocline alata* (KUNTH) DC

**DIVINÓPOLIS – MG**

**ABRIL – 2016**

**BRUNA RENATA PIMENTA TARÔCO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO DE**  
***Achyrocline alata* (KUNTH) DC**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São João Del Rei, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosy Iara Maciel Azambuja Ribeiro

**DIVINÓPOLIS – MG**

**ABRIL – 2016**

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)  
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T191a Tarôco, Bruna Renata Pimenta .  
Avaliação da atividade cicatrizante do extrato de  
Achyrocline alata (Kunth) DC / Bruna Renata Pimenta  
Tarôco ; orientadora Rosy Iara Maciel Azambuja  
Ribeiro. -- Divinópolis, 2016.  
120 p.

Dissertação (Mestrado - Programa Multicêntrico de  
Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular) --  
Universidade Federal de São João del-Rei, 2016.

1. Cicatrização de feridas. 2. Achyrocline alata.  
3. camundongos. 4. linhagem celular. I. Ribeiro,  
Rosy Iara Maciel Azambuja, orient. II. Título.

## ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ao vigésimo- nono dia do mês de abril de 2016, às 13:30 horas, na sala 3.03 do Bloco C do Campus Centro Oeste Dona Lindu /UFSJ, realizou-se a Defesa de Dissertação da discente Bruna Renata Pimenta Tarôco, regularmente matriculada no Programa Multicêntrico de Pós- Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, nível Mestrado. A banca examinadora foi constituída pelos professores doutores: Rosy Iara Maciel Azambuja Ribeiro, orientadora e presidente da banca, Carlos Edmundo Salas Bravo (UFMG) e Débora de Oliveira Lopes (UFSJ). Após apresentação, durante 50 minutos, do trabalho intitulado por “Avaliação da atividade cicatrizante do extrato de *Achyrocline alata* (Kunth) DC” a mestranda foi arguida pelos examinadores. Reunidos em sessão secreta, a banca considerou a mestranda aprovada. Para constar, foi lavrada a presente ata que depois de lida e aprovada, foi assinada pelos membros da banca examinadora:

Prof. Dra. Rosy Iara Maciel Azambuja Ribeiro

Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo

Profa. Dra. Débora de Oliveira Lopes

*Dedicado à memória do meu querido avô Anacleto Pimenta Júnior.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem ele nada seria.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e confiança que sempre depositaram em mim.

Aos meus avós, pelo afeto, sabedoria e as orações.

Aos meus padrinhos, irmãos, tias, tios e demais familiares por toda força e companheirismo.

À “república das três meninas”, pelo carinho e amizade.

Aos meus primos Jenner e Webster, pelo apoio e acolhida maravilhosa.

Aos meus amigos, novos e velhos, pela amizade. Em especial, ao meu amigo Daniel por todo apoio e atenção.

À minha orientadora, pelos ensinamentos, competência, dedicação e esforço durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao professor João, pelo auxílio na parte de fitoquímica experimental.

Aos professores Hélio e Ralph, pelas dicas, sugestões e ajuda principalmente nos ensaios *in vivo*.

À Professora Miriam, à técnica Luciana, à aluna Katinha e o restante da equipe do laboratório de farmacologia experimental da UFMG, pela ajuda com os testes *in vitro*.

Ao GRUPO LAPATEX, cada um corroborou de forma singular, única e especial para mais essa vitória. Aprendi muito com cada um de vocês.

À UFSJ, ao Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular e ao CNPq, pelo incentivo financeiro, oportunidade e formação profissional.

Todos vocês contribuíram para mais essa conquista! Sem vocês nada disso seria possível!

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

(Chico Xavier)

## RESUMO

O Brasil apresenta grande heterogeneidade botânica, no entanto, muitas espécies de plantas medicinais ainda não foram investigadas do ponto de vista terapêutico, farmacológico e/ou fitoquímico. Este trabalho teve por objetivo investigar a ação cicatrizante das partições de *Achyrocline alata* em ensaios *in vivo* e *in vitro*. À princípio o extrato bruto de *A. alata* foi particionado com quatro solventes orgânicos: hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroálcool. Posteriormente, por meio da cromatografia por camada delgada, foi possível sugerir a presença de flavonoides e derivados de ácidos fenólicos tanto no extrato bruto como nas partições dessa espécie. No ensaio *in vitro*, as partições de *A. alata* foram analisadas quanto à citotoxicidade, proliferação e migração em L929 (fibroblastos de camundongos) e HacaT (queratinócitos humanos). No modelo *in vivo*, as feridas foram induzidas no dorso de camundongos Swiss, os quais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de tratamento, contendo cinco animais cada. Dos cinco grupos, somente um foi tratado com gel Natrosol® ao passo que os outros quatro foram submetidos a tratamento com as partições dissolvidas em gel Natrosol® (0,03 massa/massa). Todos os animais receberam tratamento por 12 dias consecutivos. Com auxílio de paquímetro manual, as mensurações do tamanho das lesões foram realizadas a cada dois dias, durante 17 dias. Em conjunto, os dados obtidos sugerem que as partições foram citotóxicas em L929 ao passo que em HacaT apenas a clorofórmica. Ademais, apenas a partição clorofórmica apresentou efeito migratório em L929. Em HacaT, todas as partições promoveram proliferação, ao passo que em L929, somente a partição de acetato de etila promoveu proliferação (5µg/mL). Com relação ao tempo de fechamento das feridas não houve diferenças entre os grupos tratados com as partições e o grupo controle, pois os extratos quando particionados não reduziram o tempo de cicatrização. Dessa forma, as partições de *A. alata* podem influenciar positivamente no processo cicatricial, visto que houve proliferação celular.

**Palavras-chave:** Cicatrização de feridas, *Achyrocline alata*, camundongos, linhagem celular.

## ABSTRACT

Brazil has great heterogeneity botany, however, many species of medicinal plants have not yet investigated the therapeutic point of view, pharmacological and /or phytochemical. This study aimed to investigate the healing action of *Achyrocline alata*'s partitions *in vivo* and *in vitro* assay. At first the *A. alata*'s crude extract of was partitioned with four organic solvents: hexane, chloroform, ethyl acetate and hidroalcohol. Thereafter, by thin layer chromatography, it was possible to suggest the presence of flavonoids and phenolic acids derived from both the crude extract and the even-embers of this kind. *In vitro* assay, *A. alata*'s partitions were assayed for cytotoxicity, proliferation and migration L929 (mouse fibroblasts) and HacaT (human keratinocytes). In the *in vivo* model, the wounds were induced on the back of Swiss mice, which were randomized into five treatment groups, with five animals each. Of the five groups, one treated with only Natrosol® gel while the other four were treated with partitions dissolved in Natrosol gel ® (0.03 pound/ pound). All animals received treatment for 12 consecutive days. With the aid of manual caliper measurements of the size of the lesions were performed every other day for 17 days. In conclusion, the data suggest that the partitions were cytotoxic in L929, while in HacaT only chloroform. Furthermore, only the chloroform partition introduced migratory effect on L929. In HacaT, all partitions promoted proliferation, while in L929, only the ethyl acetate partition promoted proliferation (5µg /ml). Regarding the wounds closing time there were no differences between the groups treated with the partitions and the control group, as the extracts when partitioned did not reduce the healing time. Thus, *A. alata* partitions can positively influence the healing process, since there was cell proliferation.

**Key-words:** Wound healing, *Achyrocline alata*, mice, cell line.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS .....	xv
1.0. INTRODUÇÃO .....	1
2.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Tecido epitelial .....	3
2.1.1. Constituição da Pele .....	3
2.1.1.1.a) Epiderme.....	4
2.1.1.1.b) Derme .....	5
2.1.1.1.c) Tecido subcutâneo .....	5
2.2. Tecido Conjuntivo .....	6
2.3. Lesões .....	7
2.4. Cicatrização .....	7
2.4.1. As fases da cicatrização .....	7
2.4.1.a) Fase inflamatória .....	8
2.4.1.b) Fase proliferativa.....	9
2.4.1.c) Fase do remodelamento.....	12
2.5. Tratamento de feridas .....	16
2.5.1. Avanços terapêuticos .....	16
2.5.1.a) O uso de curativos mais avançados .....	16
2.5.2. O uso de plantas no tratamento de feridas .....	19
2.5.3. Fitocompostos presentes nos vegetais .....	20
2.5.3.a) Flavonoides, taninos e outros compostos fenólicos .....	21
2.5.3.b) Alcaloides.....	22
2.5.3.c) Terpenoides e saponinas.....	24
2.6. A família Asteraceae .....	26
2.6.1. Gênero <i>Achyrocline</i> .....	26

2.6.1. a) <i>Achyrocline alata</i> (Kunth) DC .....	26
3.0. OBJETIVOS .....	30
3.1. Objetivo Geral .....	30
3.2. Objetivos Específicos .....	30
4.0. METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	31
4.1. Avaliação fitoquímica de <i>Achyrocline alata</i> (Kunth) DC .....	32
4.1.1. Extrato bruto .....	32
4.1.2. Obtenção das partições de <i>Achyrocline alata</i> .....	32
4.1.3. Cromatografia por camada delgada. ....	33
4.2. Avaliação <i>in vitro</i> das partições de <i>A. alata</i> .....	34
4.2.1. Linhagens celulares .....	34
4.2.1.1. Análise da citotoxicidade.....	35
4.2.1.2. Análise da proliferação celular .....	35
4.2.1.3. Análise de migração celular .....	36
4.3. Avaliação da ação cicatrizante das partições de <i>A. alata in vivo</i> .....	37
4.3.1. Animais.....	37
4.3.3. Tratamento das lesões.....	38
4.3.4. Análise macroscópica da lesão excisional.....	38
4.4. Análise estatística .....	38
5.0. RESULTADOS .....	39
5.1. Obtenção das partições de <i>Achyrocline alata</i> .....	39
5.2. Cromatografia por camada delgada.....	39
5.3. Análise de citotoxicidade.....	43
5.3.1. Ensaio de citotoxicidade em L929.....	43
5.3.2. Ensaio de citotoxicidade em Hacat.....	47
5.4. Análise da proliferação celular .....	51
5.4.1. Ensaio de proliferação em L929 .....	51

5.4.2. Ensaio de proliferação em HacaT .....	55
5.5. Análise de migração celular .....	59
5.5.1. Ensaio de migração em L929 .....	59
5.5.2. Ensaio de migração em HacaT .....	61
5.6. Avaliação da ação cicatrizante das partições de <i>A. alata in vivo</i> .....	62
6.0. DISCUSSÃO .....	64
7.0. CONCLUSÕES .....	74
8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
9.0. ANEXOS .....	99
9.1. ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA .....	99
9.2. ANEXO B.....	99
9.3. ANEXO C.....	101

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Constituição básica da pele.....	3
<b>Figura 2.</b> Visão geral do processo cicatricial. (A). Principais células envolvidas no processo cicatricial. (B). Principais eventos relacionados à cicatrização.....	13
<b>Figura 3.</b> Exemplos de dois flavonoides: kaempferol (1) e Apigenina (2) .....	22
<b>Figura 4.</b> Exemplo de alcaloide: Songorina (1).....	23
<b>Figura 5.</b> Terpenóide Aucubina (A) e saponina cicloastragenol (B).....	25
<b>Figura 6.</b> Distribuição geográfica de <i>A. alata</i> no Brasil. ....	26
<b>Figura 7.</b> (A) Exemplar de <i>Achyrocline alata</i> (B) Inflorescências de <i>A. alata</i> .....	27
<b>Figura 8.</b> Fluxograma geral da metodologia experimental.....	31
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática da partição líquido-líquido.....	32
<b>Figura 10.</b> Representação geral do estudo <i>in vitro</i> . ....	34
<b>Figura 11.</b> Organograma geral do estudo <i>in vivo</i> . ....	37
<b>Figura 12.</b> Perfil cromatográfico com as partições hexânica (1), clorofórmica (2), de acetato de etila (3) e hidroalcoólica (4) de <i>A. alata</i> .....	39
<b>Figura 13.</b> (A) Perfil cromatográfico após a revelação com o extrato bruto, partições de <i>A. alata</i> e alguns compostos-padrão. ....	40
<b>Figura 14.</b> Perfil cromatográfico após a revelação do extrato bruto, partições de <i>A. alata</i> e alguns compostos-padrão.....	41
<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico após a revelação do extrato bruto, partições de <i>A. alata</i> e alguns compostos-padrão.....	42
<b>Figura 16.</b> Células viáveis de L929 (%) submetidas a tratamento com a partição hidroalcoólica (A) de <i>A. alata</i> .....	43
<b>Figura 17.</b> Células viáveis de L929 (%) submetidas a tratamento com a partição hexânica (B) de <i>A. alata</i> .....	44
<b>Figura 18.</b> Células viáveis de L929 (%) submetidas a tratamento com a partição clorofórmica (C) de <i>A. alata</i> .....	45
<b>Figura 19.</b> Células viáveis de L929 (%) submetidas a tratamento partição de acetato de etila de <i>A. alata</i> .....	46
<b>Figura 20.</b> Células viáveis (%) da HacaT submetidas a tratamento com a partição hidroalcoólica (A) de <i>A. alata</i> . ....	47
<b>Figura 21.</b> Células viáveis (%) da HacaT submetidas a tratamento com a partição hexânica (B) de <i>A. alata</i> . ....	48

<b>Figura 22.</b> Células viáveis (%) da HacaT submetidas a tratamento com a partição clorofórmica (C) de <i>A. alata</i> .....	49
<b>Figura 23.</b> Células viáveis (%) da HacaT submetidas a tratamento com a partição de acetato de etila (D) de <i>A. alata</i> .....	50
<b>Figura 24.</b> Células viáveis L929 (%) submetidas a tratamento com a partição hidroalcoólica (A) de <i>A. alata</i> .....	51
<b>Figura 25.</b> Células viáveis L929 (%) submetidas a tratamento com a partição hexânica (B) de <i>A. alata</i> .....	52
<b>Figura 26.</b> Células viáveis L929 (%) submetidas a tratamento com a partição clorofórmica (C) de <i>A. alata</i> .....	53
<b>Figura 27.</b> Células viáveis L929 (%) submetidas a tratamento com a acetato de etila (D) de <i>A. alata</i> .....	54
<b>Figura 28.</b> Células viáveis HacaT (%) submetidas a tratamento com a partição hidroalcoólica (A) de <i>A. alata</i> .....	55
<b>Figura 29.</b> Células viáveis HacaT (%) submetidas a tratamento com a partição hexânica (B) de <i>A. alata</i> . .....	56
<b>Figura 30.</b> Células viáveis HacaT (%) submetidas a tratamento com a partição clorofórmica (C) de <i>A. alata</i> .....	57
<b>Figura 31.</b> Células viáveis HacaT (%) submetidas a tratamento com a partição de acetato de etila (D) de <i>A. alata</i> .....	58
<b>Figura 32.</b> Efeito migratório das partições hidroalcoólica (A), hexânica (B) clorofórmica (C) e acetoetílica (D) .....	59
<b>Figura 33.</b> Imagem representativa do fechamento da microlesão (%) em células L929 submetidas a tratamento com a partição clorofórmica (PC).....	60
<b>Figura 34.</b> Efeito migratório das partições: hidroalcoólica (A), B (hexânica), C (clorofórmica) e D (acetato de etila).....	61
<b>Figura 35.</b> Tempo gasto no fechamento de feridas em camundongos. ....	62
<b>Figura 36.</b> Percentual de fechamento da área lesionada (%) em camundongos.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
<b>3D</b>	Espaço tridimensional
<i>A. alata</i>	<i>Achyrocline alata</i>
<i>A. satureioides</i>	<i>Achyrocline satureioides</i>
<b>AchOEt</b>	Acetato de Etila
<b>AcOH</b>	Ácido acético
<b>A<sub>f</sub></b>	Área da ferida
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BIOCE</b>	Biotério Central da Universidade Federal de São João del-Rei.
<b>CCO</b>	Campus Centro-Oeste D. Lindu
<b>CDD</b>	Cromatografia por Camada Delgada
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CG/MS</b>	Campo Grande/ Mato Grosso do Sul
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de alta eficiência
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CL50</b>	Concentração letal média
<b>COCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>DMEM/F12</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium Ham's F12 Nutrient Mixture</i> (meio eagle modificado de Dulbecco misturado com nutriente F12)

<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico
<b>FBS</b>	<i>Fetal bovine serum</i> (Soro fetal bovino)
<b>FGF</b>	Fator de crescimento de fibroblastos
<b>g</b>	Gramma
<b>GP IIb/IIIa</b>	Glicoproteína IIb/IIIa
<b>h</b>	Hora
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>IC50</b>	Metade da concentração máxima inibitória
<b>ICAM 1</b>	Molécula de adesão intracelular
<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biológicas
<b>Ig E</b>	Imunoglobulina E
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>KGF</b>	Fator de crescimento de queratinócitos
<b>LAPATEX</b>	Laboratório de Patologia Experimental
<b>LL37</b>	Fragmento C- terminal
<b>m/m</b>	Massa por massa
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MG</b>	Minas Gerais

<b>µg</b>	Microgramas
<b>µL</b>	Microlitros
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MTT</b>	Metil tiazol tetrazólio
<b>NLS</b>	Nanopartículas lipídicas sólidas
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NP-PEG</b>	Difenilboriloxietilamina-polietilenoglicol
<b>p</b>	Nível de significância
<b>PA</b>	Partição hidroalcoólica
<b>PB</b>	Partição hexânica
<b>PBMCs</b>	Células mononucleares humanas
<b>PC</b>	Partição clorofórmica
<b>PD</b>	Partição acetoetílica
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>PGA</b>	Ácido poliglicólico
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PLA</b>	Ácido polilático
<b>r</b>	Raio menor
<b>R</b>	Raio maior
<b>Radical-DPPH</b>	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAm</b>	RNA mensageiro
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura)
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TGF</b>	Fator transformador de crescimento
<b>TGF <math>\beta</math></b>	Fator transformador de crescimento beta
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>UFSJ</b>	Universidade Federal de São João del Rei
<b>UNIFESP</b>	Universidade Federal de São Paulo
<b>USP</b>	Universidade Estadual de São Paulo
<b>v/v</b>	Volume por volume
<b>VCAM 1</b>	Molécula de adesão vascular 1
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular
<b><math>\pi</math></b>	pi

## 1.0. INTRODUÇÃO

O conhecimento e o uso de plantas medicinais acompanham registros arqueológicos de persas, egípcios e outros povos da América pré-colombiana, há 60.000 anos antes de Cristo. No Brasil, as plantas medicinais já eram incorporadas na prática tradicional dos indígenas, ou seja, sua importância terapêutica antecede ao período colonial (ROCHA *et al.*, 2015).

Mais de 80% da população em países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais para o tratamento de diversas patologias (DURAZ e KHAN, 2011). Os vegetais por apresentarem uma diversidade estrutural e metabólica, possibilitam o desenvolvimento de novos fármacos através do isolamento e caracterização dos seus compostos (BALUNAS e KINGHORN, 2005). Os compostos bioativos de plantas medicinais como flavonoides, óleos essenciais, alcaloides, terpenoides e saponinas apresentam diversas atividades tais como: antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória e cicatrizante (THAKUR *et al.*, 2011). Desse modo, sugere-se que a atividade terapêutica das plantas medicinais é avaliada principalmente a partir da investigação de substâncias isoladas e/ou frações obtidas de extratos brutos de espécies vegetais (KLEIN *et al.*, 2010).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os fitoterápicos são medicamentos obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetais e são regularizados conforme os padrões de qualidade, segurança e eficácia similares aos medicamentos alopáticos (BRASIL, 2004). Vários métodos físico-químicos qualitativos ou quantitativos possibilitam a validação científica dos fitoterápicos (KLEIN *et al.*, 2010). No Brasil, por exemplo, mais de 500 fitoterápicos já foram registrados (CARVALHO, *et al.*, 2008). Em 2010, sob a aprovação da política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas, os fitoterápicos foram incorporados no sistema único de saúde (SUS) em diversos estados (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Alguns tratamentos baseados em engenharia tecidual, nanotecnologia, peptídeos microbianos e substitutos de pele podem ser eficazes no tratamento de feridas, contudo apresentam custos ainda bastante elevados. Além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na reestruturação tecidual a partir destas tecnologias avançadas (PEREIRA *et al.*, 2013; CHEN e LIU, 2015). O uso de espécies vegetais, geralmente de baixo custo e fácil obtenção, possibilita desvendar moléculas com diferentes propriedades terapêuticas. Tal fato justifica o maior desdobramento científico em investigar alternativas fitoterápicas (FERREIRA e NARDIN, 2015).

Dentro desta perspectiva terapêutica, é crescente o interesse científico em investigar plantas medicinais com atividades em cicatrização e/ou processos inflamatórios (SCHMIDT *et al.*, 2009; RAWAT *et al.*, 2012; PAZYAR *et al.*, 2014; MAVER *et al.*, 2015; BUDOVSKY *et al.*, 2015). Mais de 450 espécies vegetais já foram identificadas com propriedades cicatrizantes (GHOSH e GABA, 2013). O número de drogas a base de plantas tem aumentado, pois os fitoterápicos possuem efeitos indesejáveis mínimos (MAVER *et al.*, 2015) e mecanismo reparador espontâneo (RAWAT *et al.*, 2012). Um terço dos fitoterápicos destina-se a tratamentos de feridas e outras desordens da pele (BUDOVSKY *et al.*, 2015).

Alguns países como Brasil, Índia, Estados Unidos e Cuba mereceram destaque em pesquisas com enfoque no processo cicatricial. De 1993 a 2013, o Brasil teve 13 publicações, a Índia teve 11, os Estados Unidos e Cuba apresentaram cinco e quatro publicações, respectivamente. De um total de 52 vegetais pesquisados, 46 apresentaram potencial elevado de cicatrização (PIRIZ *et al.*, 2014). Outra pesquisa aponta aproximadamente 66 grupos de pesquisa envolvidos com tratamento de feridas, o que correspondem 88 linhas de pesquisa distintas ao longo do território nacional (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O Brasil possui grande heterogeneidade botânica, com aproximadamente 120 mil espécies de vegetais. Contudo apenas 10% são analisadas do ponto de vista biológico e fitoquímico (PAGANO E MARIA *et al.*, 2010). Desse modo, devido aos escassos estudos farmacológicos e cicatrizantes, este trabalho tem por objetivo avaliar a ação cicatrizante das partições da espécie *Achyrocline alata* e identificar as possíveis classes de metabólitos secundários presentes nessa espécie, por meio de uma triagem fitoquímica.

## 2.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Tecido epitelial

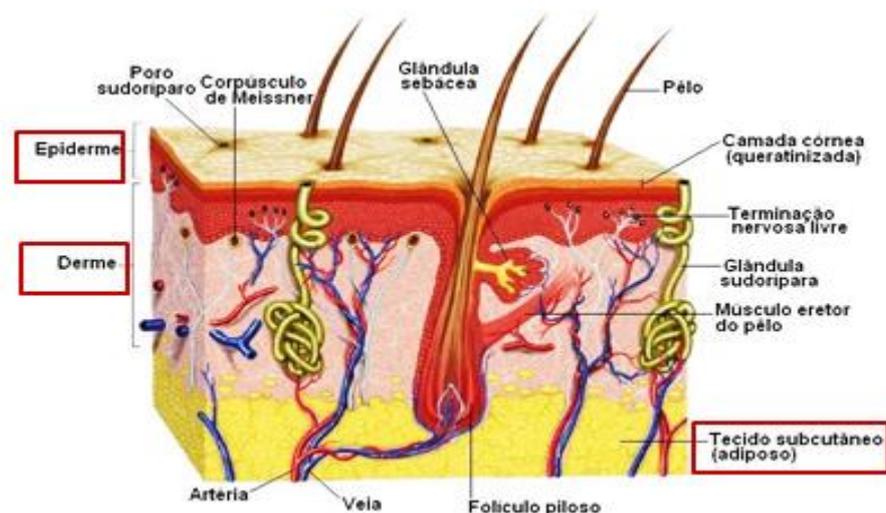
O tecido epitelial é também chamado por epitélio e está apoiada sobre o tecido conjuntivo (GENESER, 2003). Os epitélios são constituídos por células justapostas e geralmente apresentam o citoesqueleto desenvolvido, núcleo variável e com pouca substância extracelular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Morfofuncionamente, os epitélios podem ser classificados em: epitélios glandulares e de revestimento, no entanto os epitélios de revestimento podem secretar diversas substâncias, assim como os glandulares. Dentre os diferentes tipos de tecidos epiteliais de revestimento, a pele é formada por um tecido estratificado pavimentoso queratinizado, cujas células apresentam grande quantidade de filamentos de queratina (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

#### 2.1.1. Constituição da Pele

A pele é maior órgão que recobre a superfície do corpo e interage com ambiente externo (CARLSON, 1994). Esta exhibe espessura bastante variável, entre 75 a 150  $\mu\text{m}$  e recebe um terço do sangue circulante do organismo (ALMEIDA, 2009). A pele atua como barreira mecânica contra impactos, está envolvida na detecção sensorial (calor, frio, dor) e é limitante a microrganismos (MAVER *et al.*, 2015). Também desempenha papel importante na termorregulação, manutenção hídrica e na resposta imunológica. Do ponto de vista estrutural, a pele é basicamente composta três camadas: epiderme, derme e tecido subcutâneo (MASSON, 2011) (figura 1).

**Figura 1.** Constituição básica da pele. Fonte: (Adaptada de BEAR *et al.*, 2002).



### 2.1.1.1.a) Epiderme

A epiderme não possui terminações nervosas e é avascular, pois é nutrida por vasos sanguíneos presentes na derme (MASSON, 2011). Ela contém folículos pilosos, unhas, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas (GANTWERKER e HOM, 2011) e age essencialmente contra lesões e a perda de líquidos (GENESER, 2003).

A epiderme é composta por queratinócitos, células de Langerhans, células de Merkel e melanócitos. As células de Langerhans são responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T ao passo que as células de Merkel formam terminações nervosas a partir do contato com fibras amielínicas (ALMEIDA, 2009). Os queratinócitos representam 95% da epiderme e sofrem o processo de diferenciação ao longo desta camada (GANTWERKER e HOM, 2011). O processo de diferenciação dos queratinócitos é estabelecido através da expressão de conexinas e diferentes tipos de queratina ao longo da epiderme (FANIKU *et al.*, 2015). Além disso, os melanócitos são responsáveis pela pigmentação da pele através da síntese de melanina (MASSON, 2011).

A epiderme é subdividida em cinco camadas ou estratos: o basal, o espinhoso, o granuloso, o estrato lúcido e o estrato córneo da camada mais interna para superfície externa, nessa ordem (ALMEIDA, 2009; MASSON, 2011; GANTWERKER e HOM, 2011).

O estrato basal conhecido também por estrato germinativo é formado por células cilíndricas ou cúbicas, as quais se apoiam na membrana basal através de hemidesmossomos (GENESER, 2003). As células desta camada são pouco diferenciadas, entretanto possuem intensa atividade mitótica, originando as outras células dos demais estratos (ALMEIDA, 2009). Além disto, as células basais podem circundar as glândulas sebáceas e folículos pilosos presentes na derme (MASSON, 2011). Apesar da predominância de queratinócitos basais, os melanócitos compreendem aproximadamente 5% deste estrato (VENUS *et al.*, 2011).

O estrato espinhoso é uma camada mais espessa e está acima da camada basal, geralmente formada por células poligonais, as quais são separadas por pontes intercalares. A denominação espinhosa advém da forma parecida aos espinhos dos prolongamentos citoplasmáticos, os quais estabelecem a junção entre as células (GENESER, 2003). A camada espinhosa possui células de Langerhans (VENUS *et al.*, 2011) e as de Malpighi, mais resistentes aos atritos (ALMEIDA, 2009).

O estrato granuloso é superior ao espinhoso e possui células repletas por grânulos citoplasmáticos bastante basófilos, de querato-hialina (MASSON, 2011; VENUS *et al.*, 2011). Estes grânulos por conterem lorícina e filagrina auxiliam na organização da queratina no espaço intracelular (BRYANT e NIX, 2015).

O estrato lúcido, situado entre o estrato granuloso e córneo, está presente nas regiões das palmas dos pés e mãos e ausente em sobrelhas (BRYANT e NIX, 2015). Histologicamente, essa camada apresenta-se translúcida e é formada por células que sofreram a degeneração dos seus núcleos (MASSON, 2011; BRYANT e NIX, 2015).

O estrato córneo é a camada mais superior da epiderme e apresenta aproximadamente 80% de células mortas (córneas) e outras proteínas insolúveis. Na superfície desta camada ocorre a separação de células como resultado da degradação proteolítica. Ademais, essa camada é enriquecida por uma matriz lipídica, a qual aumenta a proteção da pele (BRYANT e NIX, 2015).

#### **2.1.1.1.b) Derme**

A derme é um tipo de tecido conjuntivo caracterizado por reentrâncias conhecidas por papilas dérmicas, as quais possibilitam maior contato entre a derme e epiderme (ALMEIDA, 2009). Derivada da mesoderme, ela contém colágeno, fibras, vasos sanguíneos, fibroblastos, glândulas sebáceas, terminações nervosas e até músculos eretores do pêlo (MASSON, 2011). Além disso, a derme é composta por mucopolissacarídeos (principalmente ácido hialurônico), sulfato de condroitina e glicoproteínas adesivas (CARLSON, 1994; ALMEIDA, 2009).

Os fibroblastos sintetizam e secretam o procolágeno e são as principais células presentes nesta camada, contudo a derme possui uma boa quantidade de mastócitos e macrófagos (GENESER, 2003; ALMEIDA, 2009). A derme é subdividida em: derme papilar e reticular (ALMEIDA, 2009; GANTWERKER e HOM, 2011).

A derme papilar fica situada abaixo da epiderme e é constituída essencialmente por colágeno tipo III, ao passo que a derme reticular é mais densa e possui predominantemente colágeno tipo I (GENESER, 2003). A derme possui predominantemente colágeno, contudo as fibras elásticas conferem um grau de elasticidade a essa camada (VENUS *et al.*, 2011). Danos provocados na derme reticular (mais profunda), por exemplo, necessitam de enxertos a fim de serem reestruturados (GANTWERKER e HOM, 2011).

#### **2.1.1.1.c) Tecido subcutâneo**

O tecido subcutâneo conhecido também por hipoderme funciona como isolante térmico e/ou reserva energética, pois é formado essencialmente por adipócitos (HARRIS, 2005). Além disso, a hipoderme permite a expansão de glândulas sebáceas e folículos pilosos (BRYANT e NIX, 2015).

## 2.2. Tecido Conjuntivo

O tecido conjuntivo exibe uma diversidade estrutural e funcional de células (fibroblastos, mastócitos, macrófagos, adipócitos, leucócitos). Estas células possibilitam o armazenamento de metabólitos, respostas inflamatórias e a reparação tecidual (KIERSZERBAUM e TRES, 2012).

Os macrófagos e mastócitos são derivados dos monócitos e possuem diferentes funcionalidades dependendo do órgão encontrado. De maneira geral, os macrófagos são produtores de citocinas, participam da fagocitose e apresentam antígenos. Os mastócitos são mediadores de respostas alérgicas, através da degranulação de substâncias vasoativas, proteínas solúveis e leucotrienos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; KIERSZERBAUM e TRES, 2012). Os fibroblastos são responsáveis pela síntese de quase toda a matriz extracelular (MEC) e permitem a proliferação celular. Em estado quiescente, os fibroblastos são conhecidos por fibrócitos (GARTNER e HIATT, 2007; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008). Por meio de sinalizações celulares na matriz, os fibroblastos sofrem modificações e transformam em miofibroblastos. Os miofibroblastos contêm grande quantidade de actina e miosina, além de serem abundantes em processos lesivos, pois participam do fechamento das feridas (GARTNER e HIATT, 2007).

A MEC do tecido conjuntivo é composta por fibras elásticas, proteínas fibrosas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas (GARTNER e HIATT, 2007; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Os glicosaminoglicanos e os proteoglicanos modulam a síntese e organização do colágeno (LARSON *et al.*, 2010). Em seres humanos, o colágeno corresponde cerca de um terço do percentual total de proteína, sendo distribuído em mais de 20 tipos diferentes. Devido a sua baixa imunogenicidade, o colágeno desempenha um papel líder no tratamento de feridas, pois controla a liberação de moléculas bioativas e promove o progresso no campo da engenharia tecidual (CHATTOPADHYAY e RAINES, 2014).

Estes diferentes componentes da matriz atuam em processos de adesão, proliferação e migração celulares (VITURI *et al.*, 2008). Além disso, estas substâncias influenciam em vários estágios do reparo tecidual, principalmente no remodelamento da matriz, ou seja, na arquitetura final da matriz, pois interferem no comportamento celular (ALTMAYER *et al.*, 2012).

### 2.3. Lesões

A lesão pode ser definida como uma alteração anatômica e celular do tecido, causado por um trauma (TSALA *et al.*, 2013; MAVER *et al.*, 2015). As lesões, principalmente de pele, apontam dificuldades clínicas, visto que a frequência e os gastos com estes tratamentos aumentaram em vários países (SCHREML *et al.*, 2010). No Brasil, por exemplo, a qualidade de vida é afetada devido à maior incidência de pessoas acometidas por essas lesões (ALMEIDA *et al.*, 2014).

### 2.4. Cicatrização

O reparo tecidual é caracterizado por uma sequência de eventos bioquímicos, celulares e moleculares interdependentes, com intuito de promover a integridade funcional e anatômica do tecido (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009; CAVALCANTE, *et al.*, 2012; MAQUART E MONBOISSE, 2014).

É um processo altamente dinâmico e multifatorial, o qual abrange diferentes tipos celulares, a produção de mediadores químicos, substâncias solúveis e componentes da MEC. Além disso, o reparo tecidual pode estar relacionado aos patógenos presentes e às alterações físico-químicas no microambiente da lesão e das áreas circunjacentes (EMING *et al.*, 2007; GHOSH e GABA, 2013; CLARK, 2013).

A cicatrização envolve a quimiotaxia, inflamação, agregação plaquetária, angiogênese, formação de tecido de granulação e fibroplasia. Ela está associada à proliferação e/ou diferenciação celular, ao remodelamento de colágeno, a reepitelização e a resolução da ferida (BALBINO *et al.*, 2005).

#### 2.4.1. As fases da cicatrização

As fases da cicatrização embora não sejam mutuamente excludentes, são sobrepostas no tempo (CLARK, 2013). O número de fases pode variar de três a quatro dependendo do autor. Na abordagem de quatro fases consideram a fase de hemostasia separada da fase inflamatória (VELNAR *et al.*, 2009; REINKE e SORG., 2012; GREAVES *et al.*, 2013). Por outro lado, SHAW e MARTIN, (2009); SABINO e AUF DEM KELLER, (2015) restringem a cicatrização em apenas três etapas, ainda que a descrição das características das fases seja similar à abordagem da de quatro fases. Na verdade, os últimos autores consideram a hemostasia como resposta imediata da fase inflamatória. Assim, a descrição a seguir seguirá à classificação dos últimos autores.

### 2.4.1.a) Fase inflamatória

A primeira e imediata resposta à injúria é conhecida por hemostática. Essa etapa ocorre em torno de cinco a dez minutos após a lesão e é caracterizada pela ruptura de vasos sanguíneos e extravasamento de seus elementos figurados. Desse modo, as plaquetas são as primeiras células participantes do processo de reparação tecidual. Elas desencadeiam a vasoconstrição e limitam a hemorragia (SABINO e AUF DEM KELLER, 2015).

As plaquetas através do seu receptor GP IIb/IIIa (glicoproteína IIb/IIIa) e tornam-se ativas para a formação do coágulo sanguíneo na superfície da ferida, promovendo o início da cascata de coagulação. A partir da agregação plaquetária, o coágulo de sangue contendo fibrina, fibronectina e vitronectina forma uma matriz provisória e promove a infiltração de leucócitos, fibroblastos e queratinócitos (GANTWERKER e HOM, 2011).

A trombina exerce uma função reguladora, visto que estimula a coagulação, agregação plaquetária e a vasodilatação (HE *et al.*, 2010). As prostaglandinas e leucotrienos também auxiliam na ativação e agregação das plaquetas (GHOSH e GABA 2013).

Ademais, o coágulo sanguíneo atua como um reservatório de citocinas e fatores de crescimento. O fator derivado das plaquetas (PDGF) e o fator endotelial vascular (VEGF), liberados por degranulação de plaquetas, atraem os neutrófilos ao local da lesão (SHAW e MARTIN 2009; VELNAR *et al.*, 2009).

Conforme SABINO e AUF DEM KELLER (2015), a vasoconstrição é seguida pela vasodilatação (hiperemia local), permitindo um maior influxo de células inflamatórias e plaquetas na matriz provisória. Logo após, ocorre a desidratação na superfície externa do coágulo, formando uma crosta que recobre a ferida (ROBBINS e COTRAN, 2010).

Durante um período de vinte horas, a resposta inflamatória continua com o recrutamento e migração de neutrófilos para a superfície da ferida. Os neutrófilos são responsáveis pela liberação de enzimas proteolíticas, de substâncias reativas de oxigênio (ROS) eliminando partes de tecidos danificados e evitando a infecção (GHOSH e GABA 2013). Com intuito de amplificar a resposta inflamatória, os neutrófilos liberam ainda, diversas moléculas proinflamatórias como IL1 (interleucina-1), IL6 (interleucina 6) e VEGF (SABINO e AUF DEM KELLER, 2015). Duas moléculas de adesão: a ICAM 1 (molécula de adesão intracelular 1) e VCAM 1 (molécula de adesão vascular 1) regulam a penetração de neutrófilos, bem como das células endoteliais. A falta destes quimiotáticos provoca uma reestruturação tecidual mais prolongada (BEHM *et al.*, 2012).

Em seguida, em torno de três a quatro dias após a lesão, ocorre à infiltração de mastócitos. Eles possuem receptores de alta afinidade à Ig E e estão associados com situações

alérgicas, entretanto podem identificar a presença de patógenos e iniciar a resposta inflamatória. Os mastócitos liberam as interleucinas IL-6 e IL-8 (interleucina 8), as quais estimulam a reepitelização, angiogênese e o remodelamento da matriz extracelular. Estas células auxiliam o recrutamento de neutrófilos, além de liberarem histamina e VEGF que permitem a permeabilidade vascular. A histamina facilita a vasodilatação e sua liberação é fundamental na recuperação tecidual adequada (WULFF e WILGUS, 2013).

Por análises histomorfométricas, WELLER *et al.*, (2006) demonstraram que a cicatrização tornou-se prejudicada em camundongos deficientes de mastócitos, pois nas primeiras horas a área da ferida foi quase duas vezes maior quando comparada ao grupo controle. Corroborando estes resultados, SHIOTA *et al.*, (2010) observaram reduções tanto na proliferação fibroblástica como na vascularização em camundongos deficientes de mastócitos.

Em aproximadamente 42 horas após a lesão, os monócitos se diferenciam em macrófagos (DELAVARY *et al.*, 2011) e por meio de alterações físico químicas no microambiente da lesão (hipóxia, baixo pH) estes são ativados (BALBINO *et al.*, 2005). Os macrófagos auxiliam no debridamento da ferida, removendo resíduos extracelulares e patógenos presentes no local lesionado (ROBBINS E COTRAN, 2010). Juntamente com neutrófilos, eles liberam diversas citocinas adicionais como o PDGF, o fator fibroblástico (FGF), fator transformador  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) e estimulam tanto a migração celular como a produção de uma nova matriz extracelular (LAUREANO e RODRIGUES 2011; CLARK, 2013; SABINO e AUF DEM KELLER, 2015).

Os macrófagos assumem papel transitório entre a inflamação e o remodelamento, pois podem estar associados à reepitelização, angiogênese e a formação do tecido de granulação (RODERO e KHOSROTEHRANI, 2010; DELAVARY *et al.*, 2011). Essas células também controlam a síntese de colágeno a partir da regulação da atividade da arginase. Essa enzima converte arginina a ornitina, precursor da produção de colágeno (SCHREML *et al.*, 2010).

#### **2.4.1.b) Fase proliferativa**

Essa fase inicia-se em torno do terceiro dia e dura aproximadamente duas semanas após a lesão (VELNAR *et al.*, 2009). Esse período é caracterizado principalmente por proliferação celular, reepitelização, fibroplasia, formação do tecido de granulação e a angiogênese (SCHREML *et al.*, 2010; SABINO e AUF DEM KELLER, 2015).

Repor a perda de massa tecidual é um dos objetivos básicos desse período. Existem duas teorias clássicas que tentam explicar os mecanismos relacionados à reepitelização e a formação do tecido de granulação (BALBINO *et al.*, 2005). A primeira teoria postulada por

MONTESANO e ORCI (1988), conhecida por “efeito de borda livre” foi descrita pela movimentação de células próximas à região da ferida em direção ao centro da lesão. A segunda estratégia, descrita por PEACOCK (1984), baseou-se no movimento das margens da ferida, uma em direção a outra. Essa movimentação ocorre devido à diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (modulação fenotípica).

Atualmente sabe-se que as duas estratégias ocorrem simultaneamente. Partindo deste pressuposto, a reepitelização é estabelecida a partir de um “*cross talk*” entre as células (PASTAR *et al.*, 2014; WOODLEY *et al.*, 2015), e assegurada pela proliferação e migração de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, a partir do fenômeno de “efeito de borda livre” (BALBINO *et al.*, 2005).

Os queratinócitos são os protagonistas no processo de reepitelização, além de serem capazes de sintetizar hormônios, neuropeptídeos, colesterol e participar da defesa contra patógenos (PASTAR *et al.*, 2014). Os queratinócitos através de proteínas quinases sofrem um processo de diferenciação ao longo das diversas camadas da epiderme. A renovação de queratinócitos é contínua e dinâmica, sendo orientada por diferentes fatores de crescimento como: epidérmico (EGF) e o de queratinócitos (KGF) (REINKE e SORG, 2012). Dessa maneira, alterações no citoesqueleto e em sua morfologia são necessárias para iniciar o processo de reepitelização (PASTAR *et al.*, 2014).

A MEC é também considerada um andaime, um suporte mecânico, pois facilita a migração de fibroblastos e queratinócitos (DINH *et al.*, 2015). A direção da migração celular é consequência direta da quimiotaxia e de múltiplas vias de sinalização, as quais coordenam as alterações morfológicas e a formação de actina. O processo migratório ocorre a partir da perda de contato de célula-matriz e a dissolução de desmossomos, sendo interrompido pelo fenômeno conhecido por inibição por contato (VELNAR *et al.*, 2009).

Além disso, a fibroplasia e angiogênese só ocorrem a partir da migração de queratinócitos (PASTAR *et al.*, 2014). A fibroplasia inicia-se com aumento no número de fibroblastos e com a síntese de grande quantidade de colágeno e proteínas da matriz extracelular, que substituem a matriz provisória (SABINO e AUF DEM KELLER, 2015). O crescimento e proliferação de fibroblastos ocorrem simultaneamente à angiogênese e dependem dos fatores PDGF, FGF-2 e TGF  $\beta$  (GREAVES *et al.*, 2013). A inibição do PDGF provoca a diminuição proliferativa de fibroblastos e a adição exógena de TGF  $\beta$  estimula a proliferação fibroblástica (CHRISOULI *et al.*, 2010).

A angiogênese envolve uma cascata complexa de sinalização entre os fatores de crescimento e os receptores presentes nas células endoteliais (REINKE e SORG, 2012). A

formação de uma rede vascular permite a oxigenação e troca de substâncias entre células metabolicamente ativas, além de substituir vasos danificados e facilitar a formação do tecido de granulação (SHAW e MARTIN, 2009). A angiogênese evita também a hipóxia tecidual por meio de alterações fenotípicas em células endoteliais após a lesão (GREAVES *et al.*, 2013).

A fibroplasia e angiogênese estão intimamente relacionadas através da reciprocidade e dinamismo entre diferentes tipos celulares, moléculas quimiotáticas e proteínas da MEC (GREAVES *et al.*, 2013). O colágeno, vitronectina, lamina e fibronectina, importantes no processo de fibroplasia, podem influenciar na proliferação e migração de células endoteliais (SOTTILE, 2004). Desse modo, se houver desequilíbrio no evento angiogênico ou na fibroplasia, o sistema de restauração é perturbado e há a formação de condições patológicas (GREAVES *et al.*, 2013).

Concomitante à reepitelização, a fibroplasia e angiogênese, os fibroblastos e as células endoteliais formam um tipo de tecido conjuntivo, o de granulação. Este, por sua vez, expõe histologicamente uma aparência avermelhada, uma vez que há o predomínio de vasos neoformados. Estes vasos são permeáveis à passagem de proteínas e líquido extracelular, portanto o novo tecido exhibe frequentemente edema (ROBBINS e COTRAN, 2010).

O tecido de granulação começa a ser sintetizado após quatro dias da injúria, participa da reconstituição dérmica e preenche a área da ferida, sendo influenciado pelo tamanho e intensidade da ferida. Durante sua síntese, este tecido deve possuir características morfofuncionais similares à pele íntegra (CLARK, 2013).

O tecido de granulação recebe esta denominação devido à alta densidade de granulócitos, células endoteliais, capilares, fibroblastos e colágeno (REINKE e SORG 2012; SABINO e AUF DEM KELLER, 2015). Além disso, ele expressa em torno de 40% de colágeno tipo III (VELNAR *et al.*, 2009).

A fase proliferativa é essencial ao passo que estabelece suporte mecânico para reconstrução da área lesionada (SHAW e MARTIN, 2009). A utilização de calreticulina na forma tópica em lesões, não só facilita a formação de tecido de granulação como também a reepitelização. A calreticulina induz ainda a proliferação e migração de queratinócitos e fibroblastos (SCHREML *et al.*, 2010).

### 2.4.1.c) Fase do remodelamento

O remodelamento é um estágio final e mais prolongado do reparo tissular, conhecido também como fase de maturação. Essa fase ocorre a partir da terceira semana a dois anos após a lesão. O remodelamento tecidual é caracterizado principalmente pela reorganização da matriz extracelular e redução da área da ferida (SABINO e AUF DEM KELLER, 2015).

Nesse período, o tecido de granulação é substituído por tecido conjuntivo mais denso, a cicatriz. Essa substituição envolve o equilíbrio entre a síntese e degradação de componentes da MEC, em especial, o colágeno (VELNAR *et al.*, 2009; HSU e MUSTOE, 2010; GANTWERKER e HOM, 2011). Fatores proangiogênicos e antiangiogênicos também influenciam na deposição de substâncias na matriz extracelular e consequentemente, na formação da cicatriz (GREAVES *et al.*, 2013).

Durante a formação da cicatriz, o infiltrado inflamatório e o edema desaparecem, há a troca de colágeno tipo III para o tipo I, que apresenta maior resistência à tração e adquire aspecto de massa fibrótica (ROBBINS e COTRAN, 2010; REINKE e SORG, 2012). Em comparação à pele íntegra, o tecido cicatricial apresenta 70% de resistência à tração (TSALA *et al.*, 2013). A cicatriz caracteriza-se por um tecido avascular mais rígido, quando comparado ao tecido normal e de aparência esbranquiçada, devido à falta de regeneração de melanócitos. O aumento da síntese de colágeno e/ou a deficiência da colagenólise resultam na formação de cicatrizes hipertróficas ou quelóides (TAZIMA, *et al.*, 2008). Nas cicatrizes hipertróficas ou quelóides há superprodução de vários componentes celulares, mas o número de fibroblastos não é alterado (HSU e MUSTOE, 2010).

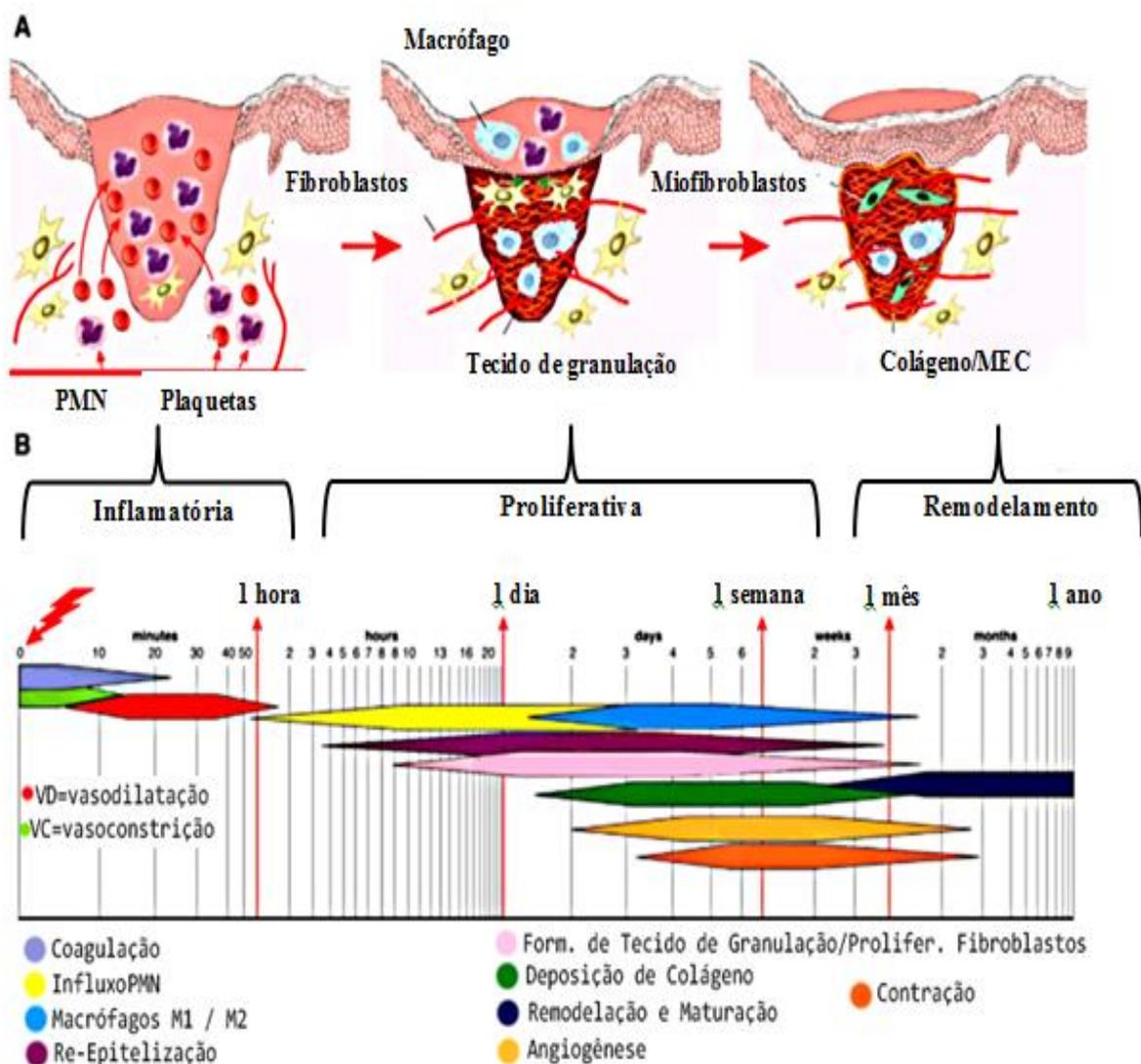
Os fibroblastos e miofibroblastos auxiliam no remodelamento da MEC, bem como na contração da ferida. A regulação da atividade miofibroblástica é estabelecida pelo bloqueio de integrinas ao fator TGF, contudo mais estudos são necessários a fim de compreender melhor o mecanismo de ação destes inibidores de TGF (DARBY *et al.*, 2014).

O mecanismo de contração da ferida destaca-se pela diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos em conjunto com o fator TGF  $\beta$  (HSU e MUSTOE, 2010; MAVER *et al.*, 2015) e essa diferenciação ocorre tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KONDO e ISHIDA, 2010). Os miofibroblastos assemelham-se funcionalmente às células musculares lisas, aliam-se ao redor da matriz, promovem uniões célula-célula, gerando força tênsil suficiente para retração da área lesada, aproximando assim as bordas das feridas (PAGANELA *et al.*, 2009). A contração da ferida reduz a área de superfície e diminui as lacunas das margens dérmicas, através da expressão da proteína alfa actina do músculo liso (ROBBINS e COTRAN, 2010). Essa proteína é o principal marcador fenotípico presente em miofibroblastos, contudo ainda não é

esclarecido se os miofibroblastos podem readquirir o fenótipo de fibroblastos (DARBY *et al.*, 2014).

O remodelamento tecidual pode também ser comprometido pela ação dos mastócitos (WULFF e WILGUS, 2013). Alterações no número ou na atividade dessas células podem reduzir a formação de cicatrizes, pois mastócitos estimulam a síntese de colágeno (CHEN *et al.*, 2014). Por sua vez, a triptase secretada por estas células pode induzir também a contração da ferida (NG, 2010). A figura 2 resume as principais fases, mecanismos e as células associadas à cicatrização de feridas.

**Figura 2.** Visão geral do processo cicatricial. (A) Células envolvidas no processo cicatricial. (B) Principais fases e eventos relacionados à cicatrização. Fonte: (Modificado de GREAVES *et al.*, 2013).



#### 2.4.2. Alguns mediadores químicos presentes no processo cicatricial

Os principais mediadores químicos ao longo do processo de restauração tecidual podem basicamente ser classificados em: fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Essas moléculas quimiotáticas variam de peso molecular, atuam sobre expressão de genes no metabolismo celular, orquestram interações celulares e estão associados aos principais eventos relacionados à cicatrização (GANAPATHY *et al.*, 2012).

Existe uma interação interdependente entre estes mediadores e a MEC. Os fatores de crescimento regulam tanto a produção como degradação de componentes da MEC, com ou sem a participação de integrinas, ou seja, de forma indireta ou direta (SCHULTZ e WYSOCKI, 2009).

Os mediadores químicos sustentam as fases de reparo e modulam as respostas de forma parácrina, autócrina ou endócrina. Dependendo da fase cicatricial, um mesmo fator pode apresentar um efeito distinto. Vários destes quimioatraentes não estão envolvidos apenas em eventos separados ao longo do processo, ocorre “*cross-talk*” entre eles (BARRIENTOS *et al.*, 2008; BEHM *et al.*, 2012). Desse modo, é importante desvendar os benefícios da administração tópica destes mediadores no tratamento de feridas, possibilitando o esclarecimento dos efeitos sinérgicos destes (GANAPATHY *et al.*, 2012).

Vários fatores aparecem e desaparecem ao longo do processo cicatricial. Assim, a quantificação destes fatores ainda é uma tarefa difícil, visto que apenas as plaquetas liberam mais de 60 tipos de substâncias químicas (GHOSH e GABA, 2013). Além disso, mais de 30 citocinas estão relacionadas à restauração tissular (GANTWERKER e HOM, 2011).

Os fatores de crescimento não apenas estimulam crescimento celular como regulam a comunicação, proliferação, migração e diferenciação entre as células. As plaquetas, macrófagos, queratinócitos, células musculares lisas e células endoteliais são capazes de sintetizar tanto o PDGF, como o VEGF (ROBBINS e COTRAN, 2010). O VEGF apresenta homologia estrutural com PDGF, ambos aumentam a permeabilidade vascular e promovem angiogênese (DINH *et al.*, 2015). A combinação entre VEGF e PDGF possibilita também maior integridade de vasos sanguíneos e o PDGF facilita proliferação fibroblástica (BARRIENTOS *et al.*, 2008).

O EGF é sintetizado por plaquetas e macrófagos e estimula a formação de tecido de granulação. O EGF pode ser mitogênico tanto para fibroblastos como queratinócitos (ROBBINS e COTRAN, 2010). O tratamento tópico de EGF aumenta a resistência à tração e

reduz o tempo cicatricial (DINH *et al.*, 2015). O EGF já é utilizado no tratamento de feridas crônicas (BARRIENTOS *et al.*, 2008).

A família dos FGFs também merece destaque, no entanto, os envolvidos na cicatrização são especialmente o FGF-2, FGF-7 e FGF-10. Os FGFs são encontrados em macrófagos, mastócitos e células endoteliais (GANAPATHY *et al.*, 2012). Eles apresentam participação tanto na migração de fibroblastos e queratinócitos, como na angiogênese (ROBBINS e COTRAN, 2010). O FGF-2 regula a síntese e deposição de vários componentes extracelulares, inclusive o colágeno. O FGF7 e FGF10 aumentam a transcrição de fatores envolvidos com os ROS (BARRIENTOS *et al.*, 2008). Segundo DINH *et al.*, (2015) a aplicação tópica de FGF favorece a contração da ferida e o aumento no número de fibroblastos.

O TNF é sintetizado principalmente por macrófagos, linfócitos T e mastócitos e atua na regulação de outras citocinas (ROBBINS e COTRAN, 2010). Este fator é importante durante o período inflamatório, pois atinge valores máximos em 3 horas após a injúria (ABDEL-SALAM, 2014). Por outro lado, alta concentração de TNF pode provocar o aumento da metaloproteinases e conseqüentemente, inibir a deposição de colágeno (BARRIENTOS *et al.*, 2008).

O TGF  $\beta$ , por apresentar efeitos pleiotrópicos, assume um papel central durante todo processo de reconstituição tecidual, visto que pode influenciar a angiogênese, formação de tecido de granulação, inflamação, reepitelização, além de influir na diferenciação de miofibroblastos (RAMIRES *et al.*, 2014).

## 2.5. Tratamento de feridas

### 2.5.1. Avanços terapêuticos

Durante séculos, especialmente em civilizações mesopotâmicas e egípcias, as feridas eram tratadas com água, mel, lama, resina, tiras de pano, folhas e cascas de vegetais. Hipócrates, por exemplo, além de classificar os diferentes tipos de lesões, sugeriu o calor como opção, no entanto o iodo e cloro ganharam destaque nos séculos XVIII e XIX, a partir do desenvolvimento da química (BLANES, 2004).

Recentemente, os avanços terapêuticos concentram-se basicamente em nanobiotecnologia, engenharia de tecidos, curativos a base de colágeno, síntese de biopolímeros combinados a fatores de crescimento, oxigenoterapia hiperbárica e pressão negativa. Além disso, destacam-se o desenvolvimento dos peptídeos antimicrobianos, o uso de micro-RNAs e terapias celulares a partir do uso de células estaminais. Todas essas modalidades terapêuticas são capazes de abordar os aspectos da ferida do ponto de vista molecular, bioquímico e celular (WU *et al.*, 2010; SCHREML *et al.*, 2010; MURPHY e EVANS, 2012; DINH *et al.*, 2015; SABINO e AUF DEM KELLER, 2015; BANERJEE *et al.*, 2011).

Há mais de duas décadas de pesquisa e desenvolvimento, reconhecem-se o arsenal de formas terapêuticas, contudo é fundamental discutir e determinar o tratamento mais adequado ao tipo de lesão, visto que uma gama de fatores intervêm no processo cicatricial (TILLMANN *et al.*, 2015).

#### 2.5.1.a) O uso de curativos mais avançados

Basicamente, as terapias tópicas possibilitam a remoção de partes necróticas, absorvem o excesso de exsudato e impedem a invasão microbiana, através do desbridamento. Podem-se citar diferentes tipos entre hidrogéis, hidroalcalóides, esponjas hidrofílicas, filmes oclusivos e curativos a base de queratina, elastina e colágeno enriquecidos com fatores de crescimento e agentes antioxidantes (VASCONCELOS e CAVACO-PAULO, 2011; CHATTOPADHYAY e RAINES, 2014).

Hidrogéis e nanocompostos de quitosano derivados de siris e camarões são claramente promissores, uma vez que possibilitam a formação do tecido de granulação e o desenvolvimento dos capilares sanguíneos (MURAKAMI, *et al.*, 2010). Estes curativos podem ainda influir na agregação plaquetária e possuem propriedades antiinflamatória e

antibacteriana (BAI *et al.*, 2013). Além disso, estes biopolímeros de quitosano são agentes antimicrobianos e possuem baixa toxicidade (JAYAKUMAR *et al.*, 2011).

Alguns polissacarídeos de plantas marítimas, como fucoidanos combinados ou não a quitosano, facilitam a formação dérmica e o rápido fechamento da ferida (CHANDIKA *et al.*, 2015). Em *Opuntia ficus-indica*, por exemplo, os polissacarídeos aceleram a reepitelização e modulam a deposição de lamina (TROMBETTA *et al.*, 2006). Além disso, compostos polifenólicos oriundos dos vegetais podem expor atividade imunomodulatória e estimular a proliferação de fibroblastos e queratinócitos ao redor da ferida (AGYARE *et al.*, 2011).

Conforme CHANDIKA *et al.*, (2015), algumas substâncias naturais derivadas de animais marinhos também apresentam potencial cicatrizante, visto que o ecossistema marinho é fonte rica em substâncias precursoras de inúmeros medicamentos. Estes compostos podem ser usados como substitutos em engenharia tecidual, curativos ou pequenas moléculas moduladoras, incluindo colágeno, ácido hialurônico, alginatos, quitinas e ácidos polinsaturados, pois atuam no progresso da cicatrização.

O alginato é um polímero de grande aceitação biológica extraído de algumas espécies como *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera* e *Laminaria japonica*, que mantém o ambiente propício à cicatrização. Sua administração é especialmente vantajosa em tecidos mucosos e é utilizado também em engenharia de tecidos (CHANDIKA *et al.*, 2015). O alginato, por apresentar uma porosidade elevada, permite a difusão de macromoléculas e uma biodegradação em condições normais, além de possibilitar a entrega de proteínas e células aos sistemas biológicos (GOMBOTZ e WEE, 2012).

O ácido hialurônico participa da proliferação, diferenciação e migração celulares, assim como os ácidos poliinsaturados atuam na inflamação e quimiotaxia (CHANDIKA *et al.*, 2015). O colágeno pode ser sintetizado a partir de alguns organismos marinhos como água viva (HOYER *et al.*, 2014) e esponjas do mar (HEINEMANN *et al.*, 2007).

Em âmbito clínico, o colágeno dos mamíferos já está sendo desenvolvido sob a forma de membranas, como por exemplo, Cares (Arthro Kinetics AG, Alemanha), Cartimaix® (Matricel GmbH, Alemanha), Novocart® 3D (TETEC® Engenharia de Tecidos Technologies AG, Alemanha) (HOYER *et al.*, 2014). O colágeno em pó é também investigado, pois é eficaz em feridas crônicas e promove ativação da fase inflamatória. As esponjas a base de colágeno possibilitam um modelo para construção de um novo tecido, é andaime para aplicação de fatores de crescimento e uma forma de entrega de antibióticos e queratinócitos. Mesmo as esponjas formadas por colágeno sintético favorecem a reepitelização (CHATTOPADHYAY e RAINES, 2014).

Em processos infecciosos, o nitrato de prata e sulfadiazina de prata são frequentemente utilizados, contudo, a prata torna-se inativa contra alguns patógenos, pois reage com íons presentes no exsudato da ferida (SABINO e AUF DEM KELLER, 2015). Segundo VALENTE (2014), a sulfadiazina de prata, além de sua propriedade antimicrobiana, é responsável pelo debridamento dos tecidos necrosados e potencializa a epitelização.

A leptina, um hormônio secretado por uma variedade de tecidos, influencia a angiogênese; sua administração tópica é eficaz no processo cicatricial. Estudo indica que a proliferação e migração de queratinócitos humanos são notórias, assim como a maior formação vascular em torno da ferida (TADOKORO *et al.*, 2015).

Por sua vez, os filmes oclusivos permitem a troca de gases no leito da ferida. Um exemplo é o Duoderm, tipo de filme oclusivo que mantém o ambiente úmido e absorve o exsudato (MURPHY e EVANS, 2012). De modo geral, os curativos mais sofisticados são capazes de manter o ambiente lesionado úmido, no entanto são mais caros (PEREIRA *et al.*, 2013).

Diferentes tipos de nanopartículas tais como nanopartículas de prata, nanotubos de carbono, nanoesferas e nanocápsulas estão sendo usadas no tratamento de feridas. Particularmente, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo extrato de uva foram capazes de possibilitar melhoria na resposta inflamatória e na reepitelização em camundongos diabéticos (FLORIM, 2013). Estudo comprova que nanopartículas modificadas promovem a modulação de colágeno e coordenam a diferenciação de fibroblastos (KWAN *et al.*, 2011).

Nanopartículas de ácido hialurônico encapsuladas a partir do extrato bruto de *Arrabidaea chica* induziram a formação de vasos sanguíneos e potencializaram a atividade cicatrizante do extrato (DE SOUZA, 2012). Além disso, um novo biopolímero de alquilamina modificado e derivado de sementes de *Cyamopsis tetragonoloba* promoveu o fechamento da lesão em tempo reduzido por induzir a migração dos queratinócitos e modular a deposição de colágeno (GHOSH *et al.*, 2013).

Peptídeos antimicrobianos também são responsáveis por estimular a proliferação e migração de queratinócitos (SCHAUBER e GALLO, 2007). A catelicina é um tipo de peptídeo, fragmento da LL37, capaz de limitar o processo inflamatório, ativar EGF e estimular a proliferação celular (TOKUMARU, *et al.*, 2005). No tratamento de feridas crônicas, um peptídeo antimicrobiano derivado de rã é um candidato promissor, uma vez que estimula a migração de queratinócitos HacaT de maneira mais eficiente que catelicina humana (DI GRAZIA *et al.*, 2015).

Ainda podem ser citados como novos tratamentos, a engenharia de tecidos e a utilização de substitutos de pele *in situ* em 3D (PEREIRA *et al.*, 2013; LAZIC e FALANGA, 2012; CHEN e LIU, 2015). Os polímeros sintéticos especialmente utilizados são os ácidos poliláctico (PLA) e poliglicólico (PGA) (PAN e DING, 2012). Além disso, há o Biobrane (formado por nylon e revestido por polipeptídios), a Tracyte (formado a partir nylon e revestida com colágeno e fibroblastos humanos) e a Integra (camada formada por camada de silicone sobre colágeno bovino e sulfato condroitina) (MURPHY e EVANS, 2012).

Outra estratégia presente na engenharia de tecidos implica na utilização de células estaminais multipotentes, as quais possuem propriedades imunomoduladoras, com participação indireta na cicatrização de feridas e regeneração. Células estaminais podem ser combinadas a biomateriais de colágeno e podem melhorar a recuperação das feridas, inclusive para feridas crônicas (WU *et al.*, 2010).

### 2.5.2. O uso de plantas no tratamento de feridas

A triagem das espécies vegetais no tratamento de feridas é um dos grandes desafios, pois é importante desvendar não apenas os compostos bioativos bem como os mecanismos de ação destas plantas nos processos fisiológicos envolvidos (THAKUR *et al.*, 2011).

Várias plantas medicinais têm sido estudadas devido as suas ações cicatrizantes (PIRIZ *et al.*, 2014; MAVER *et al.*, 2015; BUDOVSKY *et al.*, 2015). A romã (ALI *et al.*, 2014), calêndula (PARENTE *et al.*, 2011; PARENTE *et al.*, 2012), camomila (DUARTE, 2011; DOGOURY *et al.*, 2015), erva de São João (PRISACARU *et al.*, 2013), pérpétua-domato (BARUA *et al.*, 2009) a babosa (ORYAN *et al.*, 2010; ATIBA *et al.*, 2011), a tansagem e a negramina (THOMÉ *et al.* 2012). É importante considerar também algumas espécies brasileiras como: pariri (ARO *et al.*, 2013), a aroeira-da-praia (ESTEVÃO *et al.*, 2013), andiroba (NAYAK *et al.*, 2011) e urucum (SANTOS *et al.*, 2014).

Grande parte dos trabalhos revisados na literatura aponta os extratos vegetais como alternativas promissoras, visto que reduzem o número de células inflamatórias, aumentam a taxa de contração da ferida, o número de fibroblastos e a disposição das fibras de colágeno (NAYAK *et al.*, 2013; DOGOURY *et al.*, 2015). Além disso, os extratos influenciam no nível de citocinas e teores de hidroxiprolina e hexosamina (ROY *et al.*, 2012) bem como na angiogênese (PARENTE *et al.*, 2012).

A coadministração de extratos pode também provocar efeitos benéficos em relação à epitelização completa, a distribuição vascular e a disposição de fibras colágenas. A combinação dos extratos hidroalcoólicos de *Chamomilla recutita* com óleo de linhaça em

coelhos, por exemplo, provocou redução no número de células inflamatórias e aumento no número de fibroblastos (DOGOURY *et al.*, 2015).

O extrato de *Aloe Vera* pode provocar redução no influxo de células inflamatórias, entretanto não é capaz de induzir a proliferação fibroblástica (ORYAN *et al.*, 2010). Quando este mesmo extrato foi aplicado clinicamente e comparado a sulfadiazina de prata, apresentou uma maior taxa de epitelização devido à presença de manose-6 fosfato (MOGHBEL *et al.*, 2007).

Assim como a babosa, a calêndula é uma espécie que apresenta elevado potencial cicatrizante, pois seu extrato etanólico interfere na angiogênese, aumenta o teor de colágeno e por consequência a fibroplasia (PARENTE *et al.*, 2012). O extrato de camomila também acelera o processo cicatricial em lesões orais tanto em animais como humanos (RAMOS *et al.*, 2005).

O Hiperpicão ou simplesmente erva de São João também merece destaque, pois exibe propriedades antiinflamatórias, aumenta a contração da ferida, a resistência à tração e a formação do tecido de granulação (SUNTAR *et al.*, 2010 a). O seu potencial cicatrizante pode ser comprovada também pelo aumento no percentual de fibroblastos poligonais, visto que esses são mais ativos no fechamento da ferida (OZTURK *et al.*, 2007).

Já a atividade cicatrizante da romã está ligada ao aumento de TNF $\alpha$  e IL- 6 na fase inicial da inflamação (SCHMIDT *et al.*, 2009). A pomada contendo 2% de extratos metanólicos da romã apresentou maior eficácia cicatrizante e o fechamento da ferida ocorreu em menor tempo quando comparada a tetraciclina, um antimicrobiano (ALI *et al.*, 2014).

### **2.5.3. Fitocompostos presentes nos vegetais**

Os compostos naturais obtidos a partir de flores, folhas, raízes e sementes de plantas medicinais são aplicados especialmente em indústrias cosméticas, têxteis, alimentícias e em diversas áreas associadas à biomedicina, possibilitando diversos benefícios à saúde humana (ROSTAGNO e PRADO, 2013).

As substâncias bioativas derivados principalmente dos metabólitos secundários dos vegetais tais como: polifenóis (flavonoides, ligninas, estilbenos, taninos, ácidos fenólicos) saponinas, alcaloides resinas, peptídeos, poliesteróis, carotenoides e diferentes açúcares apresentam inúmeras atividades terapêuticas (ROSTAGNO e PRADO, 2013), inclusive no processo cicatricial (TSALA *et al.*, 2013; BUDOVSKY *et al.*, 2015).

Os fitoquímicos como polifenóis, terpenoides e alcaloides apresentam efeitos cicatrizantes tanto *in vitro* como *in vivo*, modulando a função de queratinócitos, células

imunes, fatores de crescimento, angiogênese e a proliferação de colágeno (TSALA *et al.*, 2013). Os compostos bioativos são capazes de melhorar a angiogênese, reduzindo os níveis de NO e ROS, aumentando a atividade antioxidante dos tecidos, além de elevar os níveis de VEGF e TGF (BAHRAMSOLTANI *et al.*, 2014).

As propriedades antimicrobianas, antioxidantes e mitogênicas dos fitoquímicos presentes em vegetais também são investigadas, visto que eles são essenciais na cicatrização, podendo favorecer positivamente uma ou mais fases do processo de reestruturação tissular (GHOSH e GABA, 2013).

### **2.5.3.a) Flavonoides, taninos e outros compostos fenólicos**

Os flavonoides (figura 3) são considerados os metabólitos secundários mais diversificados nos vegetais. Quimicamente, eles apresentam estrutura polifenólica variável, sendo suas maiores classes as antocianinas, chaconas, flavanonas, flavonas, flavonóis (RODRIGUES *et al.*, 2015). A grande diversidade estrutural entre essas classes deve-se a diferentes modificações químicas como glicosilações, metilações e sulfatações (MACHADO *et al.*, 2008).

Vários flavonoides possuem propriedades antipirética, antialérgica e antidiabética (MANTENA *et al.*, 2005). Eles podem influenciar também na funcionalidade e proliferação de células (MUSONDA e CHIPMAN, 1998), inclusive inibindo a multiplicação de células neoplásicas (MACHADO *et al.*, 2008).

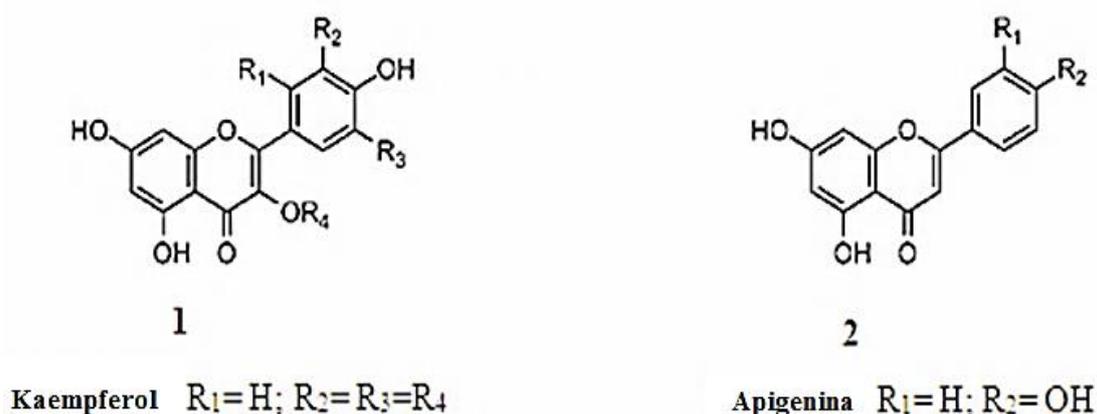
*Allamanda cathartica*, *Coronopus didymus*, *Rosmarinus officinalis*, *Moringa olifera* e *Heliotropium indicum* são exemplos de plantas ricas em flavonoides e extensamente utilizadas no tratamento de feridas (GHOSH e GABA, 2013). A atividade biológica e a eficácia cicatrizante do chá verde e própolis são devido à presença e ação de alguns flavonoides como as catequinas: epicatequina e galato-3-epigallocatequina (VIEIRA *et al.*, 2008). Ademais, as catequinas presentes nos extratos etanólicos de *Parapiptadenia rigida* aumentam a proliferação de fibroblastos (SCHMIDT *et al.*, 2010).

As antocianinas, um grupo diversificado de estruturas fenólicas (PEREIRA e CARDOSO, 2012) aumentam também a migração de fibroblastos e queratinócitos e previnem a inflamação (NIZAMUTDINOVA *et al.*, 2009). As antocianinas presentes em *Anadenanthera colubrina*, por exemplo, são eficazes na cicatrização cutânea em ratos, uma vez que possuem tanto propriedades antioxidantes como antibacterianas (GHOSH e GABA, 2013).

Os taninos são também compostos polifenólicos com massas moleculares entre 500 a 3000 Daltons e de caráter adstringente (SERRANO *et al.*, 2009). Estes fitocompostos apresentam ações antioxidantes e antimicrobianas em *Phyllanthus muellerianus*, *Terminalia arjuna*, *Terminalia chebula* e *Terminalia coriacea* (GHOSH e GABA, 2013). Os taninos extraídos dos frutos de *T. chebula* demonstram ação antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumonia*. Estes taninos aumentam o percentual de contração da ferida em ratos, devido à regulação do VEGF na fase inflamatória e modulam a organização do colágeno (LI *et al.*, 2011).

As cumarinas são compostos fenólicos sintetizados a partir dos anéis benzênicos fundidos ou alfa pironas (HOULT e PAYA, 1996; RIVEIRO *et al.*, 2010). Várias propriedades farmacológicas são atribuídas a essa classe tais como: antileishmania (FERREIRA *et al.*, 2010); anticoagulante, antiplaquetária, antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana (WU *et al.*, 2009) e antitumoral (RIVEIRO *et al.*, 2010). Além disto, outros compostos fenólicos como os ácidos cafeico e clorogênico atuam no processo cicatricial em camundongos e ratos, respectivamente (SONG *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2013).

**Figura 3.** Exemplos de dois flavonoides: kaempferol (1) e Apigenina (2). Fonte: (Modificada de COUTINHO *et al.*, 2009).



### 2.5.3.b) Alcaloides

Os alcaloides são compostos orgânicos heterocíclicos, contendo um ou mais nitrogênios em sua estrutura química, que é bastante variável, o que lhes confere um caráter básico. Sua síntese é estabelecida a partir dos aminoácidos triptofano, lisina, fenilalanina e

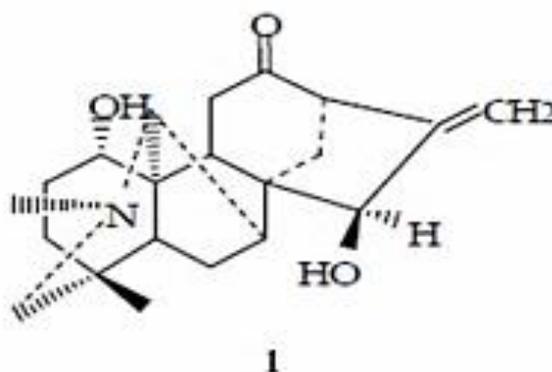
tirosina (DEWICK, 2002). Eles representam uma classe de metabólitos secundários com diversas propriedades biológicas tais como: antiviral, anticolinérgico, antidepressivo, estimulante antidiurética, antitumoral e antiinflamatória (HENRIQUES *et al.*, 2004; SOUTO *et al.*, 2011), além de serem absorvedores da radiação ultravioleta (VIOLANTE *et al.*, 2009).

As espécies *Catharanthus roseus*, *Adhatoda vasica*, *Adhatoda zeylanica* e *Berberis Lycium* são ricas em alcaloides, possuem ações antimicrobianas e são tradicionalmente usadas na cicatrização de feridas. Isoquinazolininas e quinazolininas são tipos de alcaloides solúveis e possuem também propriedades antioxidantes (GHOSH E GABA, 2013).

Vários alcaloides pirrolizidínicos são considerados tóxicos, pois apresentam efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos como é o caso da espécie *Symphytum officinale* L, popularmente conhecida como confrei (JUNIOR *et al.*, 2005). Por outro lado, a nicotina mesmo sendo um alcalóide tóxico, em baixas concentrações acelera a angiogênese através da estimulação de processos intracelulares (MORIMOTO *et al.*, 2008). Songorina (figura 4) napelina, hipaconitina e mesocitina promovem a estimulação de precursores de fibroblastos e maior síntese de fatores de crescimento (NESTEROVA *et al.*, 2012). A taspina é outro alcalóide responsável por aumentar a atividade do TGF $\beta$  e reforçar o processo cicatricial através de modificações em substâncias presentes na MEC (DONG *et al.*, 2005).

Em processos inflamatórios, a berbamina inibiu a geração de prostaglandinas em monócitos e neutrófilos humanos (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006). Outros compostos como berberina e palmatina demonstraram atividades inibitórias em edemas (SOUTO *et al.*, 2011). Além disso, stilopina, dihidroberina e canadina são considerados agentes citoprotetores pois inibem a produção de colágeno em modelos *in vitro* de fibrose (PIETRA *et al.*, 2015).

**Figura 4.** Exemplo de alcaloide: Songorina (1). Fonte: (Modificada de TSALA *et al.*, 2013)



### 2.5.3.c) Terpenoides e saponinas

Os terpenoides (figura 5A) representam uma larga família de compostos orgânicos, derivados de unidades de isopropeno, possuem esqueletos carbônicos representados por (C<sub>5</sub>)<sub>n</sub>. (DEWICK, 2002). Estas moléculas apresentam atividades antitumoral, antifúngico, antiviral, antiparasitária, anti-hiperglicêmico e antiinflamatória (PADUCH *et al.*, 2007). Vários monoterpenos têm ações sobre o sistema nervoso com propriedades sedativas, antinocepetivas, antidepressivas e ansiolíticas (PASSOS *et al.*, 2009; PERAZZO *et al.*, 2008).

Em plantas, estes compostos secundários são especialmente encontrados na forma de óleos essenciais (BUDOVSKY *et al.*, 2015) e alguns atuam na defesa das plantas frente à toxicidade de insetos (JUNIOR, 2003). As atividades cicatrizantes de *Achyranthes áspera*, *Arnebia densiflora*, *Centella asiática* e *Achillea biebersteinii* são justificadas pela presença de terpenóides em seus extratos (GHOSH E GABA, 2013).

Isolados por CLAE, os compostos gentiopicrosida e swerosida presentes na espécie *Gentiana lutea* estimularam a atividade dos fibroblastos embrionários e a síntese de colágeno (OZTÜRK *et al.*, 2006). Alguns triterpenóides de *Paullinia pinnata* também participam da estimulação fibroblástica (ANNAN e HOUGHTON, 2010), outros presentes em *Centella asiática* induzem a expressão de genes envolvidos ao remodelamento da MEC e a angiogênese (COLDREN *et al.*, 2003).

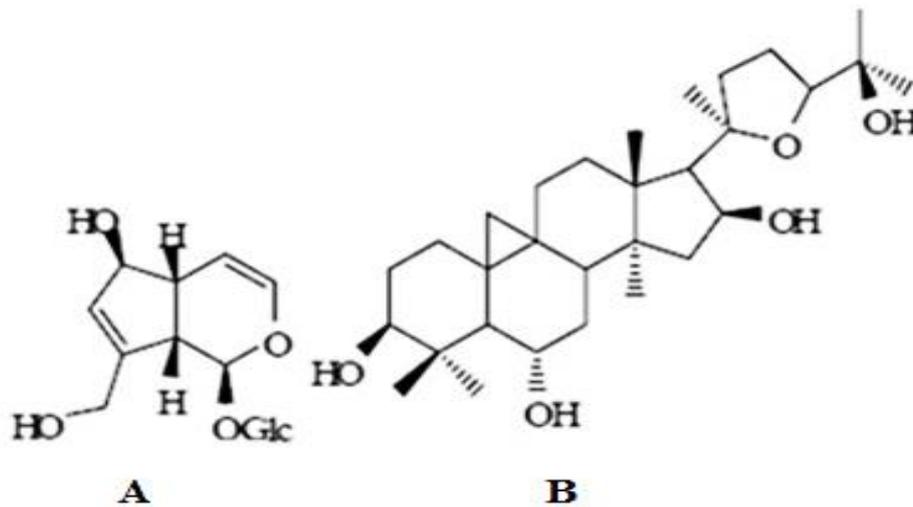
Os canabinoides (derivados de monoterpenos) presentes em *Cannabis sativa* possuem efeitos benéficos em cicatrização. O canabidiol, por exemplo, reduz a liberação de citocinas em inflamações intestinais (DROZGYIK *et al.*, 2011). Além disto, os terpenos isolados de *Peperomia galioides* exibem ações cicatrizantes *in vivo*, no entanto, não influenciam na migração celular (VILLEGAS *et al.*, 2001). Um sesquiterpeno extraído de um extrato aquoso de *Elephantopus scaber* aumenta a taxa de contração da ferida e a formação do tecido de granulação (SINGH *et al.*, 2005).

Já as saponinas (figura 5B) são compostos derivados do 2, 3 oxidoescaleno e geralmente encontradas em dicotiledôneas. De acordo com a presença do núcleo apolar, elas são basicamente classificadas em saponinas triterpênicas ou esteroides (VINCKEN *et al.*, 2007). Elas apresentam características surfactantes e podem estar associadas à defesa contra insetos (PEREIRA e CARDOSO, 2012). Essa classe apresenta também ações antimicrobiana, moluscicida, hemolítica, antiinflamatória (SPARG *et al.*, 2004), antiviral, antitumoral, antiplaquetária e leshimanicida (YENDO *et al.*, 2010).

O cicloastragenol, astrogalosida e ciclocefalosida presentes em algumas espécies do gênero *Astragalus* exibiram propriedades cicatrizantes, pois aumentaram tanto a proliferação

como a migração fibroblástica *in vitro*. O composto cicloastragenol, por exemplo, mostrou ser eficiente na cicatrização em ratos, uma vez que possibilitou maior formação de vasos e uma melhor organização dérmica (SEVIMLI- GUR *et al.*, 2011).

**Figura 5.** Terpenóide Aucubina (A) e saponina cicloastragenol (B). Fonte: (Adaptado de TSALA *et al.*, 2013).



## 2.6. A família Asteraceae

Dotada de elevada diversidade química e biológica, a família Asteraceae, uma das maiores famílias do reino vegetal, compreende cerca de 25.000 espécies distribuídos em 1100 gêneros, os quais 180 ocorrem em território brasileiro. A Asteraceae apresenta na sua quase totalidade, plantas subarbustivas, trepadeiras e raramente espécies arbóreas (CASTRO, 2012).

Algumas espécies desta família como *Achyrocline satureioides*, *Matricaria recutita* e *Calendula officinalis* destacam-se devido a suas propriedades terapêuticas e substâncias farmacologicamente ativas usadas no tratamento de diversas patologias (VAZ, 2014).

### 2.6.1. Gênero *Achyrocline*

O gênero *Achyrocline* possui aproximadamente 32 espécies e é principalmente encontrada em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul e América Central, difundido em vários países latino-americanos. No Brasil são encontradas dezessete espécies do gênero *Achyrocline*, entre essas a *Achyrocline satureioides* e a *Achyrocline alata* são comumente usadas na medicina popular (LOEUILLE, 2013).

#### 2.6.1. a) *Achyrocline alata* (Kunth) DC

A *Achyrocline alata* tem ampla distribuição na Cordilheira dos Andes, Brasil, Paraguai, Colômbia e Argentina. No Brasil, essa espécie é encontrada desde a Bahia até o Rio Grande do Sul em diferentes domínios fitogeográficos tais como: Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampas (LOEUILLE, 2013) (figura 6).

**Figura 6.** Distribuição geográfica de *A. alata* no Brasil. Fonte: (*Achyrocline* em Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro). Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>. Acesso em 26 de out/2015.



Os representantes de *A. alata* são subarbutos e arbustos, os quais possuem folhas simples, sésseis e o caule cilíndrico apresenta cinco expansões aladas, o que difere dos demais grupos da família Asteracea. Tanto o caule quando as folhas da *A. alata* apresentam tricomas tectores e glandulares, sendo a epiderme é unisseriada, revestida por uma cutícula (MUSSURY *et al.*, 2007).

Esta espécie possui propriedades e características semelhantes à *Achyrocline satureioides*. Desse modo, *A. alata* é considerada como sucedânea de *A. satureioides*, no entanto, a *A. alata* é menos comum e encontrada preferencialmente em ambientes mais úmidos. A *A. alata* é conhecida popularmente por macela, macela amarela, camomila nacional, losna do mato, paina e carrapicho de agulha (LORENZI e MATTOS, 2008) ou simplesmente jateikáa (NUNES *et al.*, 2003) (figura 7).

**Figura 7.** (A) Exemplar de *Achyrocline alata* (B) Inflorescências de *A. alata*. Fonte: (Adaptado da flora do Cerrado e autorizado por Maurício Mercadante<sup>1</sup>). Disponível em: <https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/collections>.



---

<sup>1</sup> Engenheiro Florestal e Ecólogo.

As flores estão reunidas em capítulos e cada capítulo envolto por brácteas de coloração amarela. Além disso, as flores apresentam ovário revestido por hipanto, corola gamopétala e estilete aparentemente sólido (VOLPE *et al.*, 2006).

De acordo com NUNES *et al.*, (2003) a *Achyrocline alata* foi considerada a terceira planta mais indicada pela população de Campo Grande para uso em infecções no útero e próstata, labirintite, apendicite, hérnia e dores estomacais. Uma comunidade na Argentina utiliza essa planta para problemas respiratórios (HILGERT, 2001).

Quanto às suas propriedades farmacológicas de *A. alata*, apresenta propriedades antiinflamatórias tanto *in vivo* como *in vitro*. Contudo, mais estudos são necessários para compreender melhor o mecanismo de ação desta espécie (TOFFOLI-KADRI *et al.*, 2014).

Do ponto de vista químico, as partes aéreas tanto da *A. alata*, quanto da *A. satureioides* apresentam flavonoides (BROUSSALIS *et al.*, 1988) e óleos essenciais (LABUCKAS *et al.*, 1999; LAMATY *et al.*, 1999). Conforme SOUZA *et al.*, (2007), os flavonoides de *A. satureioides*, como luteolina e quercetina, são fundamentais no processo inflamatório e podem agir também como citoprotetores (ARRENDONDO *et al.*, 2004).

Nos óleos essenciais obtidos das inflorescências de *A. alata*, *A. satureioides* e *A. tomentosa* foram identificados mais de 52 compostos, sendo cariofileno o composto mais abundante (LABUCKAS *et al.*, 1999). Além disso, há uma similaridade entre mais de 30 compostos presentes nos óleos de *A. alata* e *A. satureioides*, com maior prevalência do pineno (LAMATY *et al.*, 1999). Por análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, o alfa humuleno e o beta cariofileno foram identificados também como os principais componentes dos óleos presentes em folhas e flores de *A. alata* (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Alguns terpenos e policetídeos foram encontrados em *A. alata* (BOHLMANN *et al.*, 1980) e suas inflorescências possuem também os glicosídeos: quercetina-3-metiléter-4'-O-glicosídeo, gnafalina e quercetina-3-metiléter-7-O-glicosídeo (BAUER *et al.*, 1987). A apigenina, ácido clorogênico e ácido cafeico são outros compostos fenólicos presentes em *A. alata* (BROUSSALIS *et al.*, 1993).

Compostos de *A. alata* e de *A. satureioides* como o ácido clorogênico, isoquercetina, derivados de cafeoil, gnafalina e 4,2,4'-trihidroxi- 6'-metoxichalcona, foram identificados por meio da cromatografia de alta eficiência (CLAE). O fato de existir essa similaridade de metabólitos secundários nos extratos entre essas espécies justifica elas serem usadas para as mesmas indicações terapêuticas (GRASSI-ZAMPIERON *et al.*, 2010). De acordo com LOPES *et al.*, (2006) devido a presença de derivados de cafeoil a *A. mentosa* e *A. flaccida* são também utilizadas na medicina popular.

Ademais, através de ensaios envolvendo  $\beta$ -caroteno e O radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (radical-DPPH) comprovaram que *A. saturoioides* e *A. alata* apresentam propriedades antioxidantes, no entanto, a *A. saturoioides* é ligeiramente mais ativa na captura de radicais livres (GRASSI-ZAMPIERON *et al.*, 2009).

A *A. alata* exibiu atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e pode ser utilizada no desenvolvimento de produtos de higiene bucal. A ação bacteriostática do extrato estimulou espécies reativas de oxigênio e modulou respostas imunológicas (DEMARQUE *et al.*, 2015). Além disto, a sua ação antifúngica foi comprovada na inibição de biofilmes produzidos por *Aspergillus fumigatus* (ZAPATA *et al.*, 2010).

### **3.0. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Avaliar os efeitos das partições de *Achyrocline alata* no processo de reparo tecidual em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

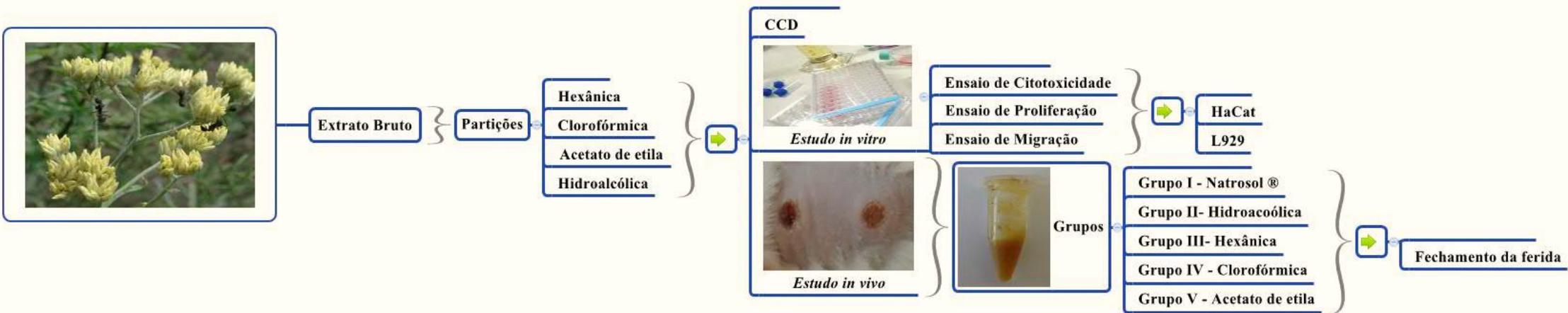
- Verificar através da cromatografia por camada delgada as possíveis classes de compostos químicos presentes nas partições desta planta.

- Investigar a citotoxicidade das partições de *A. alata* em duas linhagens celulares e analisar as ações destas partições na proliferação e migração nas mesmas linhagens.

- Analisar a atividade das partições de *A. alata* na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos Swiss, a fim de determinar tempo de cicatrização nestes animais e avaliar a funcionalidade do extrato em processos lesivos.

## 4.0. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

**Figura 8.** Fluxograma geral da metodologia experimental. Fonte: (TARÔCO, 2016).

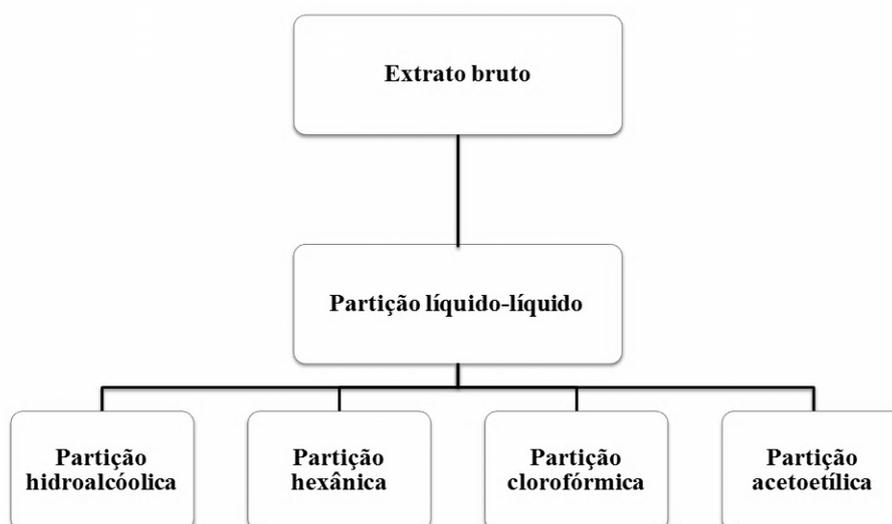


## 4.1. Avaliação fitoquímica de *Achyrocline alata* (Kunth) DC

### 4.1.1. Extrato bruto

As amostras de *Achyrocline alata* (Kunth) DC foram identificadas pela Dra. Lílian Auler Mentz e estão depositadas no herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, localizado no campus de Campo Grande (CG/MS) registradas sob o número 11486. As amostras das inflorescências foram enviadas para o Laboratório de Patologia Experimental (LAPATEX) da Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ), Campus Centro-Oeste D. Lindu (CCO), Divinópolis (MG). O extrato bruto da espécie *Achyrocline alata* (Kunth) DC foi produzido, liofilizado e armazenado no LAPATEX.

**Figura 9.** Representação esquemática da partição líquido-líquido. Fonte: (TARÔCO, 2016).



### 4.1.2. Obtenção das partições de *Achyrocline alata*

O extrato bruto de *Achyrocline alata* foi pesado (3 g) e solubilizado em 135 mL de etanol (70%), metodologia de CECHINEL FILHO (2009). O extrato bruto foi submetido à partição líquido-líquido com solventes orgânicos (hexano, clorofórmio, acetato de etila, hidroetanólica) em grau crescente de polaridade.

Para a obtenção de cada partição, o extrato bruto (3 g) foi colocado em um funil de decantação com intuito de separar cada uma das partições. Adicionou-se 135 mL de hexano, agitou-se o funil por aproximadamente um minuto. Em seguida, a amostra permaneceu em repouso a fim de separar as fases imiscíveis da mistura heterogênea. Por princípio de

densidade, a partição hexânica foi recolhida na porção superior do funil. Esse processo foi repetido por três vezes, a fim de garantir maior separação. As partições de clorofórmio e de acetato de etila seguiram o mesmo procedimento. Ao final do experimento, a partição residual e de menor volume, denominada hidroetanólica, também foi coletado. Logo após, todas as partições obtidas foram congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e liofilizadas (Liofilizador modelo K 105, Liobras) (figura 9).

#### **4.1.3. Cromatografia por camada delgada.**

A técnica de cromatografia por camada delgada (CDD) adaptada de WAGNER e BLADT (1996) baseou-se na colocação de sílica gel 60G (adsorvente) em cromatoplasas (20x20). O extrato bruto e as quatro partições de *A. alata* foram aplicadas com auxílio de tubos capilares nas placas de vidro. Em seguida, as placas foram submetidas à eluição em uma cuba cromatográfica previamente saturada.

Os eluentes metanol/clorofórmio foram utilizados na proporção 10:40 (v/v). Após a separação cromatográfica, as placas foram reveladas com NP-PEG (difetilboriloxietilamina-poli-etilenoglicol), revelador específico para flavonóides, e sob a luz ultravioleta (365nm).

Além disso, outras placas de CCD foram preparadas a partir do extrato bruto, das partições e compostos-padrão tais como: ácido clorogênico, quercetina, chalcona, rutina e gnafalina. Os compostos- padrão serviram como referência de coloração. O eluente utilizado foi uma mistura de acetato de etila, ácido acético e água (AchOEt:AcOH:H<sub>2</sub>O) nas proporções de 100:14,4:10 e 100:10:10 (v/v/v). Os resultados obtidos foram fotografados usando uma câmera digital Sony Cyber-Shot (modelo DSC-H200).

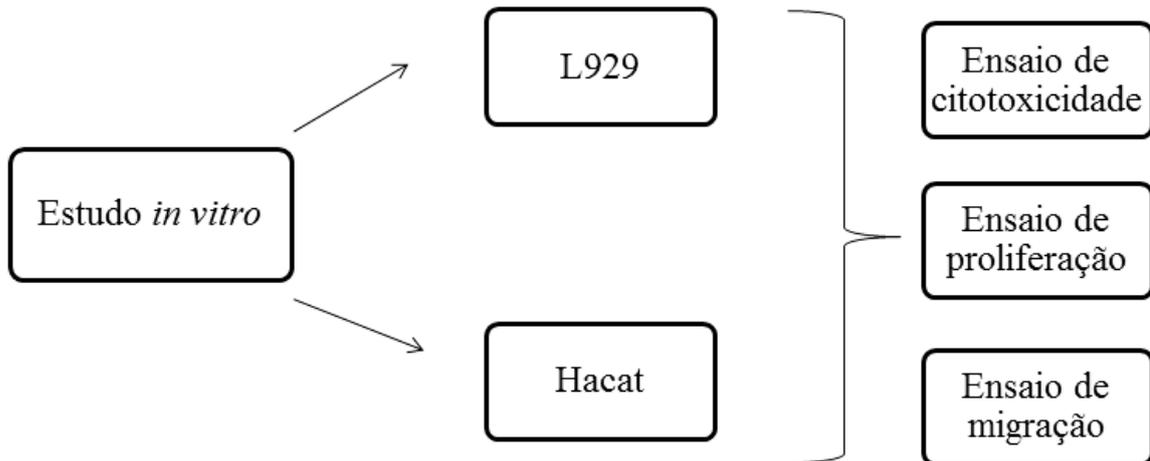
## 4.2. Avaliação *in vitro* das partições de *A. alata*

### 4.2.1. Linhagens celulares

A linhagem de fibroblastos de camundongos (L929) foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Hugo Armelin, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo (USP). E a linhagem de queratinócitos humanos (Hacat) foi gentilmente cedida pelo professor Dr. André Luis Vettore de Oliveira, do Laboratório de Biologia Molecular do Câncer, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As células L929 e Hacat foram cultivadas em RPMI e DMEM/F12 Ham, respectivamente, contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS).

As linhagens foram mantidas em garrafas estéreis a 37 °C em uma estufa umedecida contendo 5% (v/v) de dióxido de carbônico (CO<sub>2</sub>). Para evitar a contaminação nos ensaios biológicos, as amostras foram esterilizadas a partir de membranas de nitrato de celulose 0,22 µm em ambiente estéril. Todos os ensaios foram realizados no Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), sob colaboração da professora Dr<sup>a</sup> Miriam Tereza de Paz Lopes. Foram realizados três diferentes ensaios (figura 10).

**Figura 10.** Representação geral do estudo *in vitro*. Fonte: (TARÔCO, 2016).



#### 4.2.1.1. Análise da citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade permitiu avaliar os efeitos das quatro partições de *A. alata*, em duas linhagens morfofisiologicamente distintas, a L929 e a Hecat. As linhagens inicialmente foram descongeladas e submetidas ao banho maria por aproximadamente quinze minutos.

Posteriormente, as linhagens foram transferidas para garrafas de cultivo e tratadas com seus respectivos meios de cultura. O meio de cultura utilizado para L929 foi o RPMI e a troca deste ocorreu a cada dois dias. O meio de cultura para Hecat foi uma mistura de 50% de F12 e 50% DEMEM, não houve a troca do meio para esta linhagem, uma vez que ela é mais sensível às variações ambientais.

A tripsinização procedeu-se até a obtenção de um número adequado de células (confluência de aproximadamente 95%). Após isso, uma alíquota de suspensão celular foi retirada para contagem em uma câmara de Neubauer (Brand), pelo método de exclusão por azul de tripan. Após isso, foram semeadas  $2 \times 10^3$  células L929 /poço em placas de 96 poços. O mesmo procedimento foi realizado para a linhagem Hecat. Em seguida, as placas foram incubadas até a formação de monocamada homogênea de células. Após 24 horas do plaqueamento, as amostras com partições A, B, C e D (hidroalcoólica, hexânica, clorofórmica e acetato de etila) nas concentrações: 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foram adicionadas nas duas linhagens. Ademais, foi estabelecido um grupo controle, mantido a 10% de FBS.

Após 72 horas, aplicou-se 10  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (5 mg/mL) por poço em cada uma das placas. As placas foram cobertas com papel alumínio e mantidas dentro da estufa por 4 horas. Após isso, o meio de cultura foi aspirado e os cristais de formazan foram solubilizados com 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, realizou-se a leitura espectrofotométrica (espectrofotômetro Thermo Multiskango) no comprimento de onda de 570 nm. Os testes de citotoxicidade foram realizados em hexaplicatas.

#### 4.2.1.2. Análise da proliferação celular

No ensaio de proliferação celular, tanto para L929 quanto para a Hecat, as células foram plaqueadas com densidade de  $5 \times 10^3$  células/poço e incubadas em estufa em condições similares ao teste descrito anteriormente.

Inicialmente, ao atingir confluência superior ou igual a 50%, procedeu-se o carenciamento. As placas foram lavadas e incubadas com meio de cultura (específico para linhagem) e 0,1% de FBS.

Após 24 horas de carenciamento, foram adicionadas as partições hidroalcóolica, hexânica, clorofórmica e acetato de etila nas concentrações de 5, 0,5, 0,05, 0,005, 0,0005 µg/mL acrescido de 0,1% de FBS. Além disso, foram estabelecidos dois grupos controle, um mantido a 10% de FBS (controle positivo) e o outro a 0,1% de FBS, ambos diluídos em meio. A viabilidade celular torna-se mais expressiva em baixas doses de extrato vegetal (PHAN *et al.*, 2001; TEWTRAKUL *et al.*, 2015)

Logo após 48 horas, adicionou-se 10µL da solução de MTT (5 mg/mL) em cada poço. As placas foram cobertas com papel alumínio e mantidas dentro da estufa por 4 horas. Após 4 horas, o meio de cultura foi aspirado e os cristais de formazan foram solubilizados com 100 µL de DMSO. Em seguida, houve leitura espectrofotométrica sob o comprimento de onda de 570 nm. Os testes foram feitos em quintuplicadas.

#### **4.2.1.3. Análise de migração celular**

O ensaio de migração possibilitou avaliar o efeito migratório das partições sobre as linhagens: L929 e HacaT. As células L929 foram semeadas em placas de 24 poços ( $1,5 \times 10^5$  células/poço) e cultivadas até alcançarem a confluência adequada (aproximadamente 95%).

Após isso, com auxílio de uma ponteira P20 (20 microlitros) foi realizada uma microlesão em linha reta na monocamada celular. Em seguida, as células foram lavadas com meio de cultura e tratadas com as partições na concentração de 0,05µg/mL. Todas as partições são colocadas com 0,1% de FBS e a hidroxauréia. Com intuito de excluir a ação proliferativa, a hidroxauréia (inibidor de proliferação celular) foi utilizada nas concentrações de 100 mM para HacaT e 1 mM para L929.

Para acompanhar o fechamento da lesão imagens foram obtidas através de câmera (Moticam 2500 – Motic<sup>®</sup>, China) acoplada a um microscópio invertido (A30 – Motic<sup>®</sup>, China) nos tempos de 0, 6 e 24 e 30 h após os tratamentos com as partições. A análise das imagens foi realizado no programa TScratch, considerando os resultados como porcentagem de fechamento da lesão em relação a área inicial.

Os procedimentos utilizados para linhagem HacaT foram similares, mudando a densidade celular ( $2,5 \times 10^5$  células/poço), metodologia baseada em LIANG *et al.*, (2007). Os testes foram realizados em triplicatas.

### 4.3. Avaliação da ação cicatrizante das partições de *A. alata in vivo*

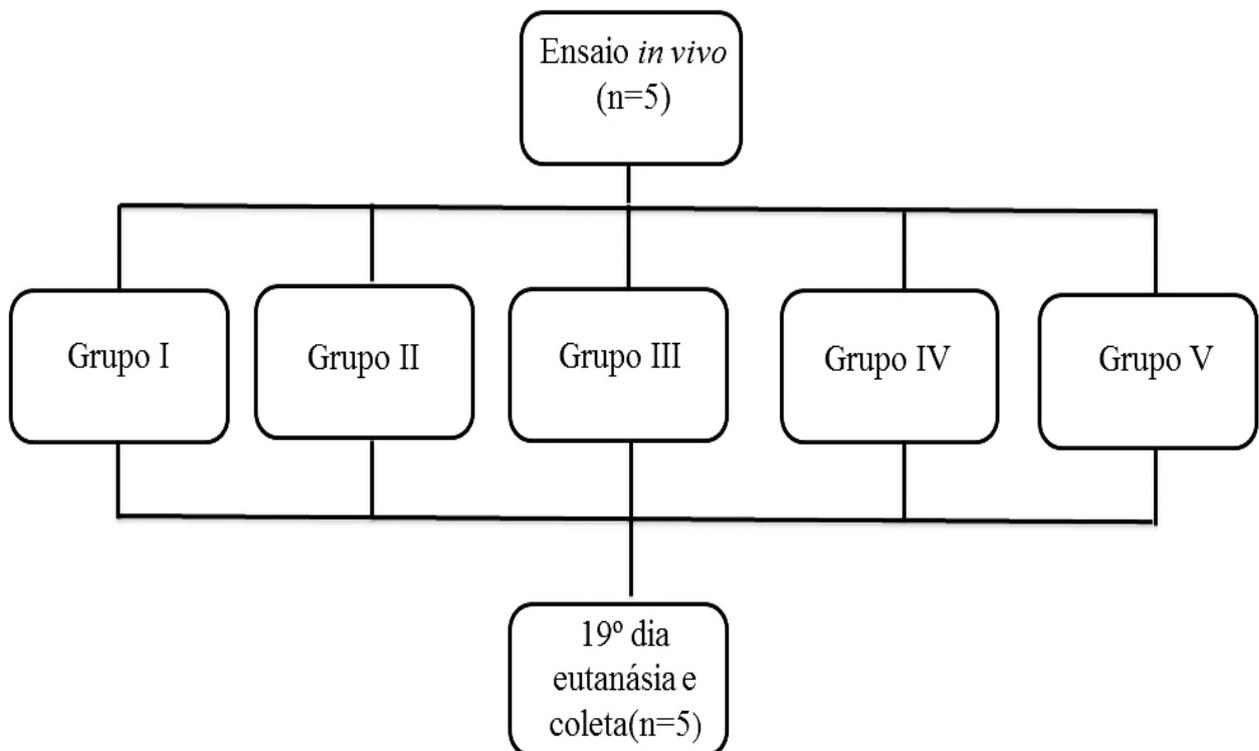
#### 4.3.1. Animais

Os camundongos machos de linhagem Swiss, de 8 a 10 semanas e massa corporal entre 25 a 30 g, foram adquiridos do Biotério Central (BIOCE) da Universidade Federal de São João del-Rei. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ciclos circadianos e alimentados com ração comercial Purina<sup>®</sup> Labina e água *ad libitum*.

O protocolo experimental está de acordo com princípios do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (COCEA) e foi devidamente aprovado (número 023/2014- Anexo A) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal de São João del-Rei.

Para realização do ensaio *in vivo*, os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos com cinco animais cada. Foram induzidas duas lesões excisionais em cada animal (figura 11).

**Figura 11.** Organograma geral do estudo *in vivo*. Fonte: (TARÔCO, 2016).



### 4.3.2. Indução das lesões excisionais

Os camundongos Swiss foram anestesiados por via intraperitoneal com quetamina (50 mg/kg do animal) e xilazina (20 mg/kg do animal). Após a aplicação anestésica, cada animal foi submetido à tricotomia na região dorsal e à indução das lesões (região crânio-caudal) expondo a fáscia muscular (THOMÉ *et al.*, 2012).

### 4.3.3. Tratamento das lesões

Os camundongos permaneceram em gaiolas individuais e foram submetidos à tratamento após a lesão. O tratamento baseou-se na solubilização das partições de *A. alata* (hidroalcoólica, hexânica, clorofórmica e de acetato de etila) em um gel Natrosol®, gel a base de água, considerando 0,22g de cada partição e 6g do gel (0,03 massa/massa). As cobaias foram tratadas uma vez ao dia, por 12 vezes. Os grupos foram distribuídos conforme os tratamentos:

- Grupo I - Controle com Natrosol®.
- Grupo II - Extrato hidroalcoólico solubilizado em Natrosol®
- Grupo III - Extrato hexânico solubilizado em Natrosol®
- Grupo IV - Extrato clorofórmico solubilizado em Natrosol®
- Grupo V - Extrato de acetato de etila solubilizado em Natrosol®

### 4.3.4. Análise macroscópica da lesão excisional

O fechamento da ferida foi analisado através da mensuração da área da lesão. As medidas foram realizadas a cada dois dias, com auxílio de um paquímetro manual (Digemess). Em cada lesão foram feitas duas medições (diâmetro menor e maior). A área da ferida foi calculada mediante a expressão matemática descrita abaixo, de acordo com o estabelecido em BERNADI *et al.*, (2015).

#### Área da ferida:

$$A_f = \pi * R * r \quad (4.3.4.1)$$

Onde: R é o raio maior, r é o raio menor e  $\pi$  (Pi) corresponde a 3,14.

## 4.4. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni através do software Graph Prism 5. Os valores foram expressos como médias +/- desvios padrão, com intervalo de confiança de 95% (valores de  $p < 0.05$  considerados significativos).

## 5.0. RESULTADOS

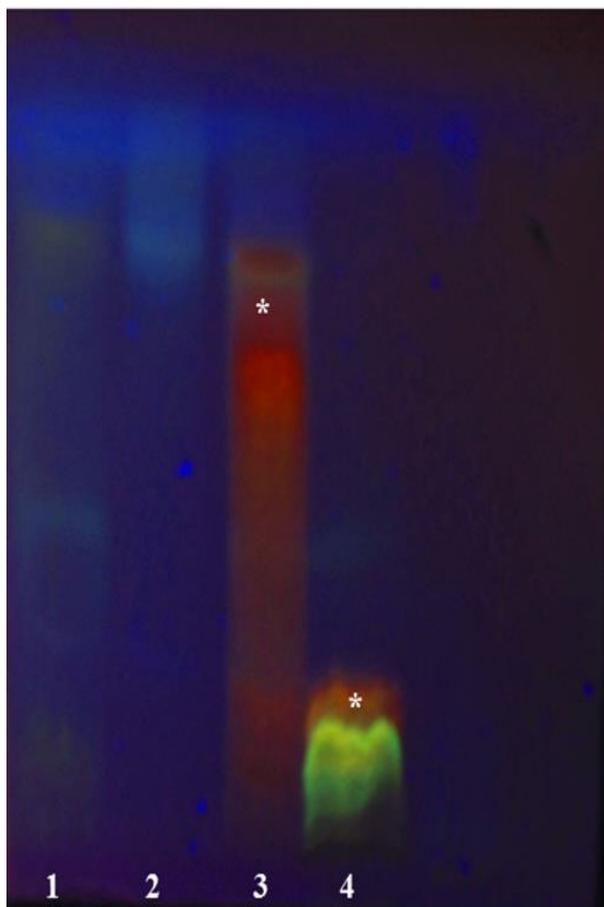
### 5.1. Obtenção das partições de *Achyrocline alata*

As partições hidroalcoólica, hexânica, clorofórmica e de acetato de etila em relação a massa apresentaram um rendimento (%) de: 28. 12; 12. 29; 44. 49; 15.10 respectivamente.

### 5.2. Cromatografia por camada delgada

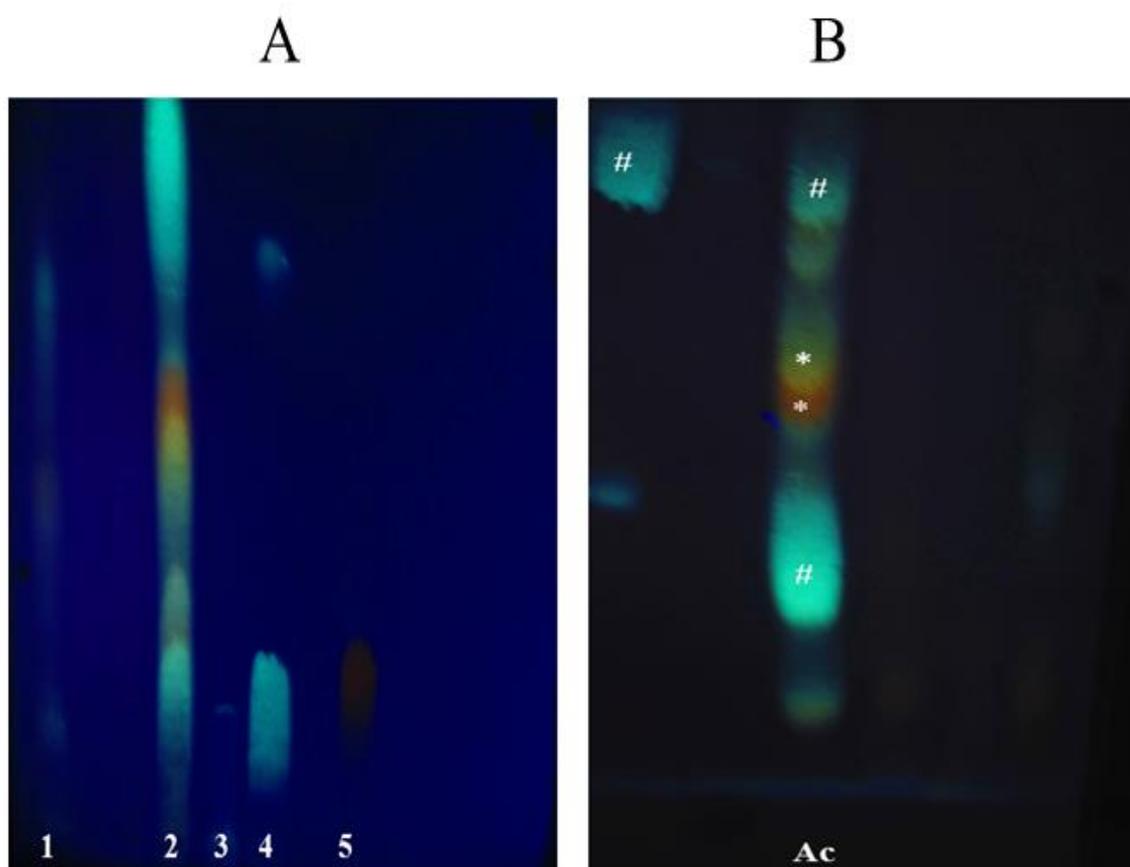
A triagem das classes dos metabólitos secundários foi realizada a partir da análise e interpretação das cromatoplasmas (CCD). As partições de acetato de etila (3) e hidroalcoólica (4) estão em evidência e sugerem apresentar derivados fenólicos, possivelmente flavonoides, pois há a presença de manchas com fluorescência em laranja, típica de flavonoides (figura 12).

**Figura 12.** Perfil cromatográfico com as partições hexânica (1), clorofórmica (2), de acetato de etila (3) e hidroalcoólica (4) de *A. alata*. Em evidência, as partições hidroalcoólica (3) e acetatoetílica (4).\*Derivados fenólicos. Eluentes: metanol/ clorofórmio 10:40 Revelador: NP-PEG. Fonte: (TARÔCO, 2016).



Além disso, o extrato bruto e todas as partições de *A. alata* foram comparados com alguns compostos-padrão tais como: ácido clorogênico, quercetina, rutina, chalcona, antes da revelação (Anexo B). No entanto, apenas o extrato bruto, as partições (acetato de etila e hidroalcoólica), ácido clorogênico e rutina tornaram-se evidentes após a revelação (figura 13 A). A partição de acetato de etila apresentou uma maior diversidade de compostos químicos quando comparada as demais partições, pois sugerem tanto derivados fenólicos (manchas de tonalidade laranja) como derivados de ácidos fenólicos (manchas de tonalidade esverdeada). (figura 13 B).

**Figura 13.** (A) Perfil cromatográfico após a revelação com o extrato bruto, partições de *A. alata* e alguns compostos-padrão. Extrato bruto de *A. alata* (1) acetato de etila (2) partição hidroalcoólica (3), ácido clorogênico (4), rutina (5). (B) Em evidência mostra-se o acetato de etila (Ac) \*Derivados fenólicos # derivados de ácidos fenólicos. Eluentes: AchOEt: AcOH: H<sub>2</sub>O (100:14, 4:10). Revelador: NP-PEG. Fonte: (TARÔCO, 2016).



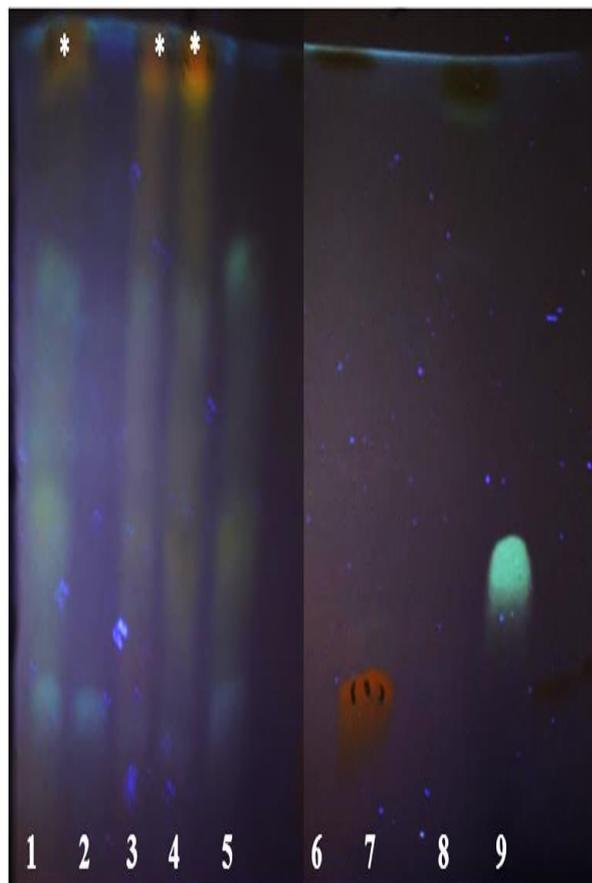
O extrato bruto e todas as partições de *A. alata* também foram comparados com a gnafalina, chalcona e rutina (compostos-padrão) antes da revelação (ANEXO C) e após revelação (figura 14). O perfil cromatográfico sugere que o extrato bruto e as partições analisadas não possuem rutina, pois não foram detectadas manchas semelhantes ao padrão rutina. Além disso, o extrato bruto e as partições hexânica e clorofórmica apresentam derivados fenólicos, possivelmente gnafalina e chalcona devido à predominância de manchas com fluorescência em laranja. É possível sugerir ainda, assim como extrato bruto, as partições clorofórmica e de acetato de etila possuem derivados de ácidos fenólicos (figura 14).

**Figura 14.** Perfil cromatográfico após a revelação do extrato bruto, partições de *A. alata* e alguns compostos-padrão. Extrato bruto (1), partição hidroalcoólica (2), partição hexânica (3), partição clorofórmica (4), de acetato de etila (5), gnafalina (6), chalcona (7), rutina (8). Eluentes: AcOEt:ACOH.H<sub>2</sub>O (100:10:10). Revelador: NP/PEG.\* Derivados fenólicos # derivados de ácidos fenólicos. Fonte: (TARÔCO, 2016).



Outra cromatoplaça foi contruída utilizando o extrato bruto, partições de *A. alata*, gnafalina, chalcona, rutina e ácido clorogênico. Neste perfil cromatográfico também é possível sugerir a presença de derivados fenólicos, possivelmente gnafalina e chalcona (manchas em laranja) tanto no extrato bruto como nas partições clorofórmica e hexânica, contudo são necessários estudos cromatográficos mais precisos e melhor caracterização das partições da planta para confirmação destes achados em CCD (figura 15).

**Figura 15.** Perfil cromatográfico após a revelação do extrato bruto, partições de *A. alata* e alguns compostos-padrão. Extrato bruto (1), partição hidroalcoólica (2), partição hexânica (3), partição clorofórmica (4), de acetato de etila (5), gnafalina (6) rutina (7), chalcona (8), ácido clorogênico (9). Eluentes: AcOEt:ACOH.H<sub>2</sub>O (100:10:10). Revelador: NP/PEG. \*Flavonoides. Fonte: (TARÔCO, 2016).

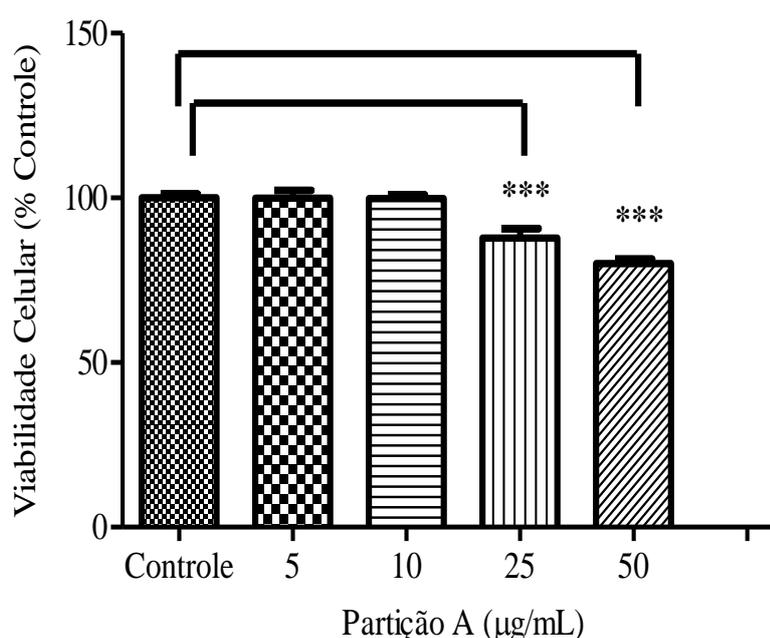


### 5.3. Análise de citotoxicidade

#### 5.3.1. Ensaio de citotoxicidade em L929

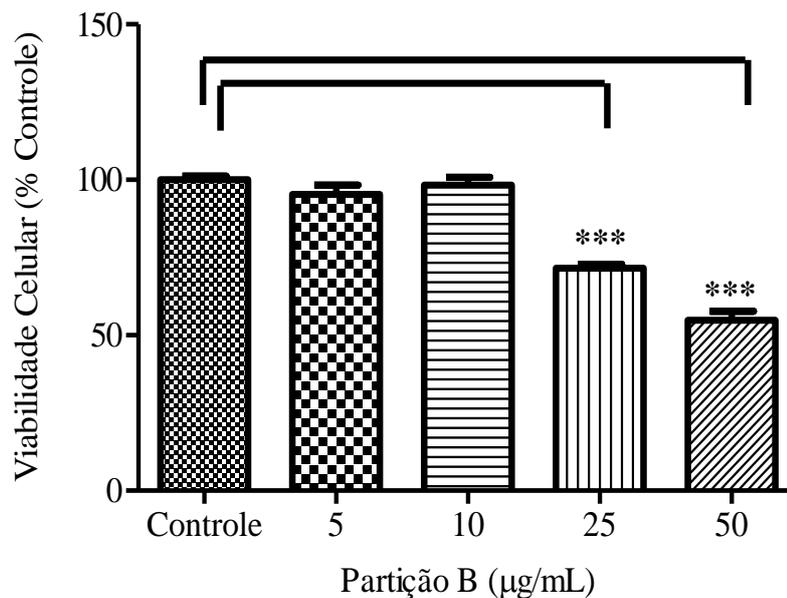
A citotoxicidade das quatro partições de *A. alata* foi avaliada em células L929 e Hacat, pelo método calorimétrico do MTT. Este método baseou na redução do MTT em cristais de formazan, de coloração púrpura, parâmetro que mensura a atividade da enzima mitocondrial. Dessa maneira, a viabilidade celular foi determinada pela intensidade de coloração purpura, que é proporcional a quantidade de cristais de formazan formados. A coloração púrpura foi estimada por espectrofotometria e a absorbância da cultura controle relacionado a 100% de células viáveis. As culturas celulares quando submetidas a tratamento com partição hidroalcoólica apresentaram diferenças significativas nas concentrações de 25 e 50 µg/mL comparadas ao grupo controle. Observou-se uma viabilidade similar a cultura controle, próximo a 100% de células viáveis, nas concentrações 5 e 10 µg/mL. Com relação a concentração de 50 µg/mL, houve menor viabilidade celular, em torno de 85%, assim, a partição hidroalcoólica exibiu baixa citotoxicidade à linhagem fibroblástica, no entanto não foi possível encontrar o valor de IC50 (figura 16).

**Figura 16.** Células viáveis de L929 (%) submetidas a tratamento com a partição hidroalcoólica (A) de *A. alata* nas concentrações de 5, 10, 25, 50 µg/mL; cultura controle: 10% de FBS. Os resultados representam as médias + /-desvios padrão. \*\*\* Diferença estatisticamente significativa,  $p < 0.001$  (72h). Fonte: (TARÔCO, 2016).



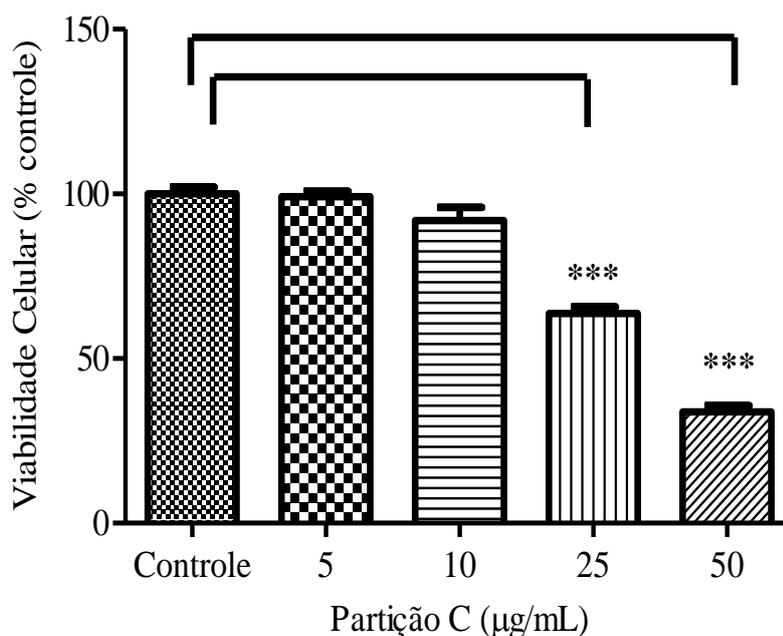
A linhagem L929 quando tratada com a partição hexânica apresentou redução na viabilidade celular em maiores concentrações. Houve diferenças significativas nas concentrações 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  em relação ao controle. Observou-se que nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  a viabilidade celular permaneceu em torno de 100%, similar ao controle. Além disso, na concentração 50  $\mu\text{g/mL}$  a viabilidade foi de aproximadamente 55%, contrastante a concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , a qual atingiu aproximadamente 70% de células viáveis. Dessa forma, inferiu-se que a partição hexânica foi citotóxica a L929, no entanto não foi encontrado o valor de IC50 (figura 17).

**Figura 17.** Células viáveis de L929 (%) submetidas a tratamento com a partição hexânica (B) de *A. alata* nas concentrações de 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ ; cultura controle: 10% de FBS. Os resultados representam as médias + desvios-padrão. \*\*\*Diferença estatisticamente significativa,  $p < 0.001$  (72h). Fonte: (TARÔCO, 2016).



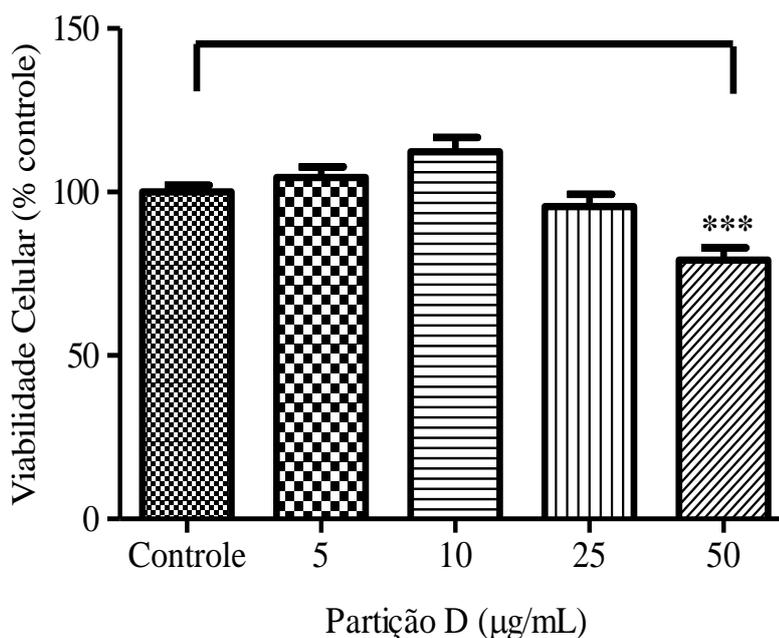
Quando as células L929 foram submetidas a tratamento com a partição clorofórmica notou-se uma proporcionalidade inversa entre as diferentes concentrações utilizadas e a viabilidade, ou seja, quanto maior a concentração, menor a viabilidade celular. As concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao controle. Em 25  $\mu\text{g/mL}$ , essa viabilidade diminuiu aproximadamente 45%. Para a partição clorofórmica foi encontrado o  $\text{IC}_{50} = 30,98$ , portanto, concentrações com valores iguais ou maiores ao  $\text{IC}_{50}$  foram consideradas citotóxicas (50  $\mu\text{g/mL}$ ) (figura 18).

**Figura 18.** Células viáveis de L929 (%) submetidas a tratamento com a partição clorofórmica (C) de *A. alata* nas concentrações de 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ ; cultura controle: 10% de FBS. Os resultados representam as médias + /- desvios- padrão. \*\*\*Diferença estatisticamente significativa,  $p < 0.001$  (72h). Fonte: (TARÔCO, 2016).



A linhagem celular L929 quando submetida a tratamento com a partição de acetato de etila não apresentou alteração na viabilidade na concentração 5  $\mu\text{g/mL}$ . Observou-se uma viabilidade acima de 90% nas concentrações 10 e 25  $\mu\text{g/mL}$ . Houve diferença estatisticamente significativa apenas na concentração 50  $\mu\text{g/mL}$  comparada a cultura controle. Em 50  $\mu\text{g/mL}$ , houve queda na viabilidade celular, assim a partição de acetato de etila foi levemente citotóxica a linhagem L929. Contudo, não foi possível encontrar o IC50 (figura 19).

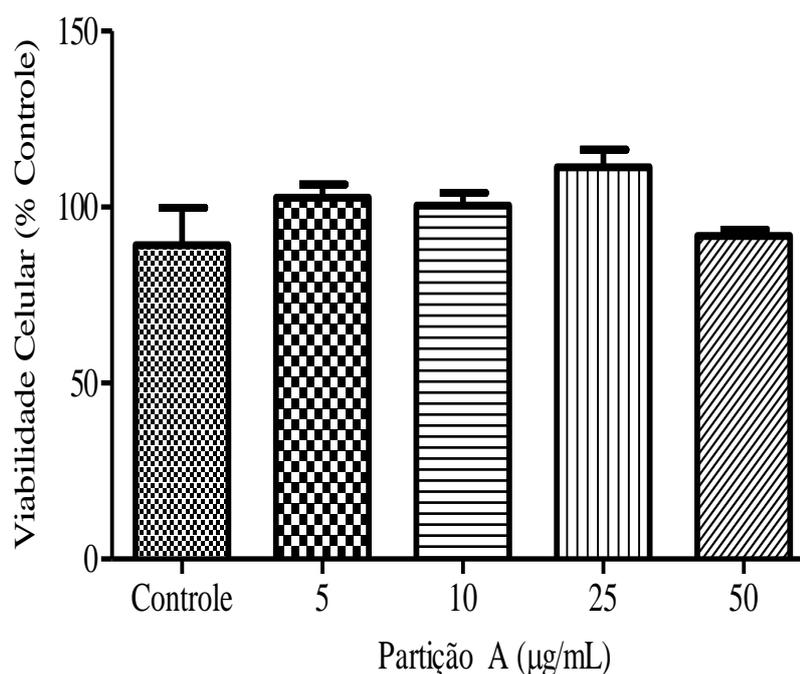
**Figura 19.** Células viáveis de L929 (%) submetidas a tratamento partição de acetato de etila de *A. alata* nas concentrações 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ ; cultura controle: 10% de FBS. Os resultados representam as médias  $\pm$  desvios- padrão. \*\*\* Diferença estatisticamente significativa,  $p < 0.001$  (72h). Fonte: (TARÔCO, 2016).



### 5.3.2. Ensaio de citotoxicidade em Hacat

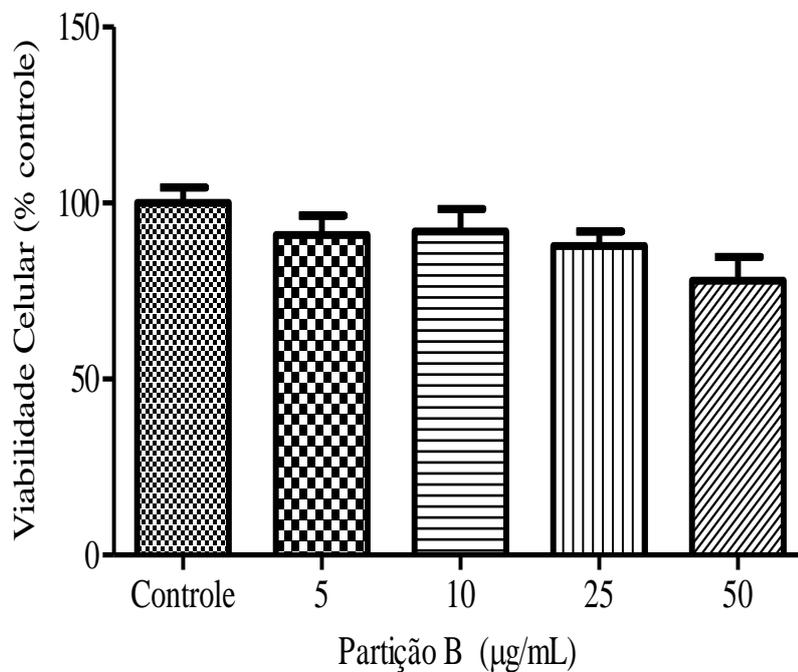
Assim como em L929, as quatro partições de *A. alata* foram testadas em Hacat a fim de analisar a citotoxicidade através do percentual de células viáveis. De acordo com figura 20, não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos da partição hidroalcoólica e o grupo controle. A concentração 25 µg/mL apresentou aumento na viabilidade celular, no entanto, em 50 µg/mL essa viabilidade manteve-se próximo a cultura controle. Observou-se mais de 90% de células Hacat viáveis em todos os tratamentos, logo essa partição não foi citotóxica à linhagem Hacat.

**Figura 20.** Células viáveis (%) da Hacat submetidas a tratamento com a partição hidroalcoólica (A) de *A. alata* nas concentrações de 5, 10, 25, 50 µg/mL; cultura controle: 10% de FBS. Os resultados representam as médias +/- desvios- padrão,  $p < 0.05$  (72h). Fonte: (TARÔCO, 2016).



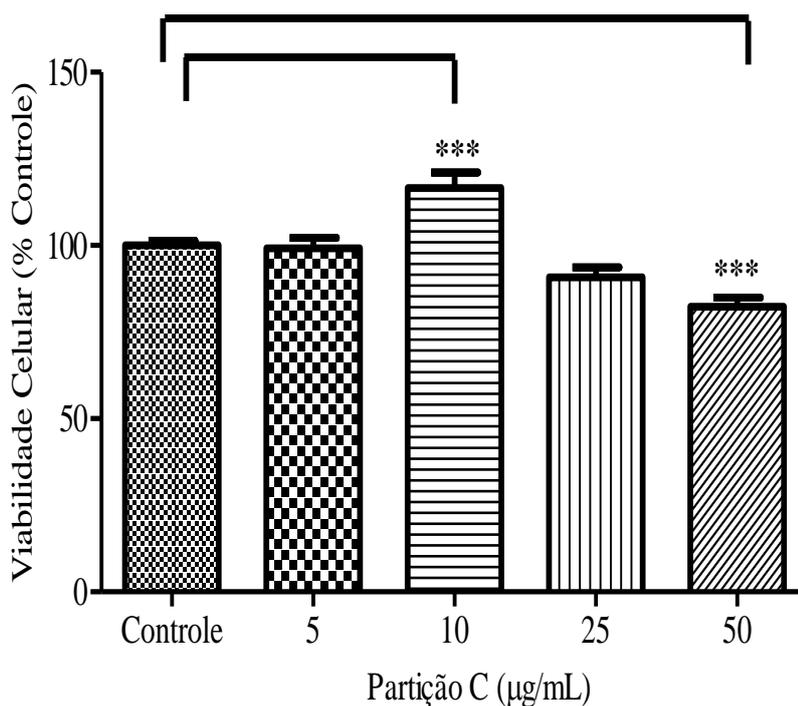
Quando as células HacaT foram submetidas a tratamento com a partição hexânica, a viabilidade celular mostrou-se considerável, acima de 60%, próxima a cultura controle em todos os tratamentos. No entanto, não houve nenhuma diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos da partição hexânica e o grupo controle. Desse modo, a partição hexânica não apresentou citotoxicidade a essa linhagem (figura 21).

**Figura 21.** Células viáveis (%) da HacaT submetidas a tratamento com a partição hexânica (B) de *A. alata* nas concentrações de 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ ; cultura controle: 10% de FBS. Os resultados representam as médias  $\pm$  desvios-padrão;  $p < 0.05$  (72h). Fonte: (TARÓCO, 2016).



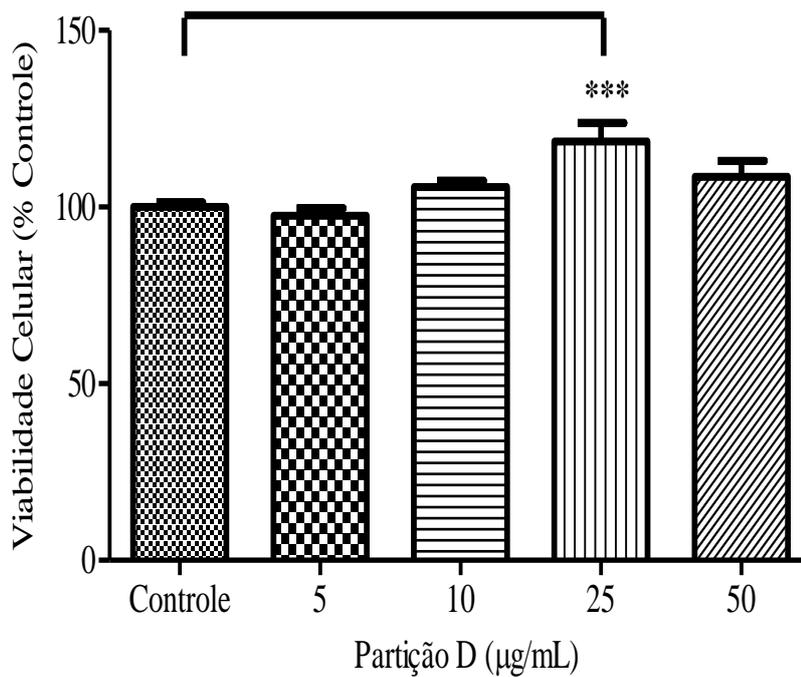
Quanto à partição clorofórmica, notou-se uma viabilidade celular acima de 70% em todos os tratamentos, no entanto, houve diferenças estatisticamente significativa nas concentrações 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . Houve aumento de viabilidade na concentração 10  $\mu\text{g/mL}$ , contudo, essa viabilidade permaneceu próxima a cultura controle em 5  $\mu\text{g/mL}$  (não teve alteração). Além disso, houve redução no número de células viáveis em 50  $\mu\text{g/mL}$ , portanto, a partição clorofórmica apresentou baixa citotoxicidade à linhagem HacaT. Contudo, não foi possível encontrar o valor de IC50 (figura 22).

**Figura 22.** Células viáveis (%) da HacaT submetidas a tratamento com a partição clorofórmica (C) de *A. alata* nas concentrações de 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ ; cultura controle: 10% de FBS. Os resultados representam as médias + /-desvios- padrão. \*\*\*Diferença estatisticamente significativa,  $p < 0.001$  (72 h). Fonte: (TARÔCO, 2016).



Quando as células Hacaat foram submetidas a tratamento com a partição de acetato de etila notou-se um aumento da viabilidade celular (acima da cultura controle) nas concentrações 10, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . Quando comparada ao controle, somente a concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  apresentou diferença estatística significativa, contrastante as demais concentrações. Em 5  $\mu\text{g/mL}$  a viabilidade celular permaneceu próxima ao grupo controle. Desse modo, a partição de acetato de etila não exibiu citotoxicidade à Hacaat, pois viabilidade mostrou-se acima de 90% em seus diferentes tratamentos (figura 23).

**Figura 23.** Células viáveis (%) da Hacaat submetidas a tratamento com a partição de acetato de etila (D) de *A. alata* nas concentrações de 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados representam as médias +/- desvios- padrão. \*\*\*Diferença estatisticamente significativa,  $p < 0.001$ (72 h).  
Fonte: (TARÔCO, 2016).



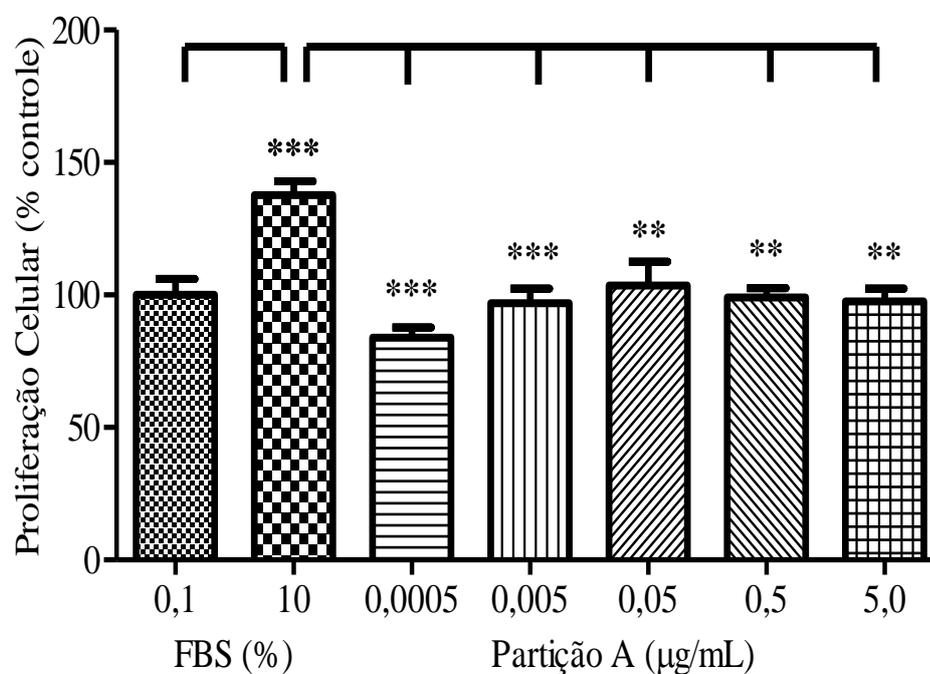
## 5.4. Análise da proliferação celular

### 5.4.1. Ensaio de proliferação em L929

A proliferação celular assim como teste de citotoxicidade foi analisada a partir do método calorimétrico de MTT, a fim de verificar a influência das partições de *A. alata* na atividade mitogênica em L929 e HacaT.

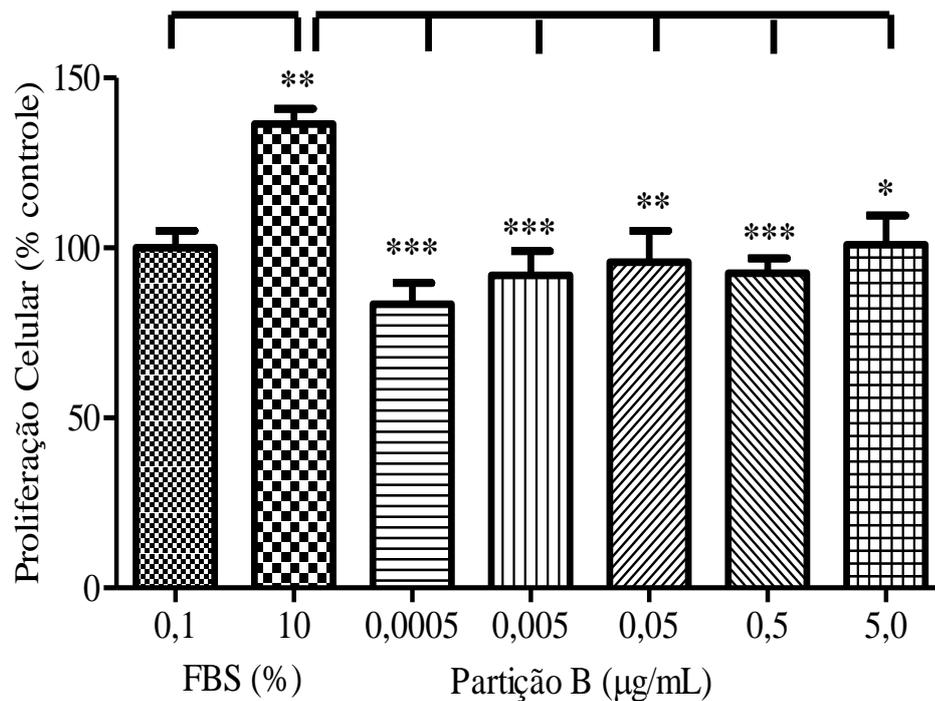
Conforme a figura 24, nenhum dos tratamentos com a partição hidroalcoólica apresentou diferenças significativas quando comparados à cultura controle 0,1%. As células L929 mantiveram proliferação próxima a cultura controle 0,1%, exceto na concentração 0,0005 µg/mL. Além disso, todos os tratamentos exibiram diferenças estatisticamente significativas, quando comparados ao grupo controle 10 % ( $p < 0.001$ ). Ademais, os grupos controle (0,1% e 10 %) também exibiram diferenças significativas entre si ( $p < 0.001$ ).

**Figura 24.** Células viáveis L929 (%) submetidas a tratamento com a partição hidroalcoólica (A) de *A. alata* nas concentrações de 0.0005, 0.005, 0.05, 0,5, 5 µg/mL; cultura controle: 0,1 e 10 % de FBS. Os resultados representam as médias +/- desvios-padrão. \*\*e \*\*\*Diferenças estatisticamente significativas, com valores de  $p < 0.01$  e  $p < 0.001$  nessa ordem (48 h). Fonte: (TARÔCO, 2016).



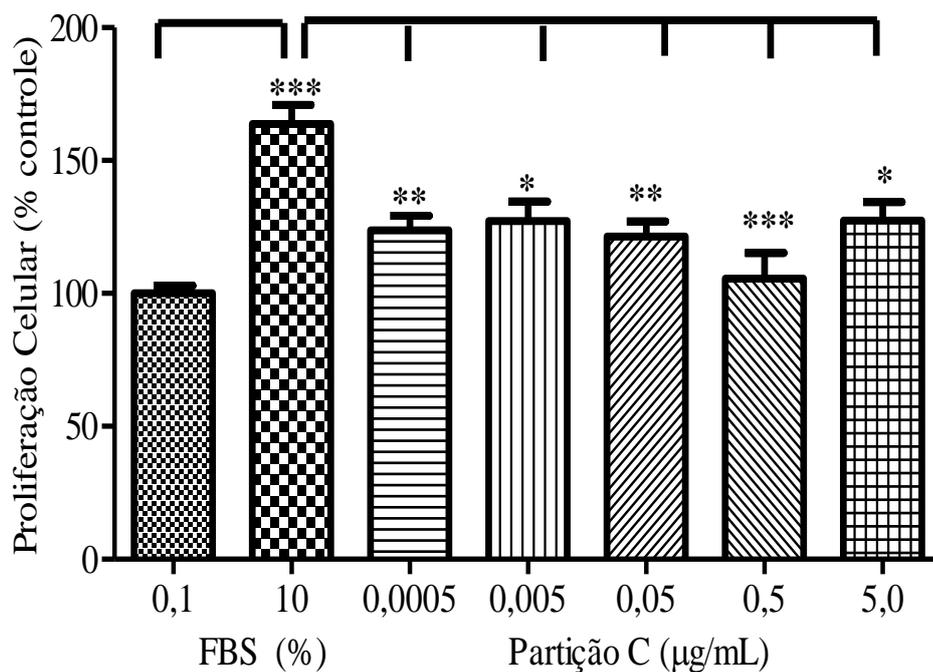
As células L929 quando submetidas a tratamento com a partição hexânica não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos tratamentos quando comparada à cultura controle 0,1%, pois a proliferação destas permaneceu próxima a esta mesma cultura controle. Em contrapartida, houve diferenças significativas entre os tratamentos e a cultura controle 10% ( $p < 0.001$ ). Observou-se ainda, diferenças significativas entre as culturas controle 10% e 0,1%, com valor de  $p < 0.01$  (figura 25).

**Figura 25.** Células viáveis L929 (%) submetidas a tratamento com a partição hexânica (B) de *A. alata* nas concentrações de 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5  $\mu\text{g/mL}$ ; cultura controle: 0,1 e 10% de FBS. Os resultados representam as médias  $\pm$  desvios-padrão. \*, \*\* e \*\*\* Diferença estatisticamente significativa, com valores de  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  e  $p < 0.001$  respectivamente (48 h). Fonte: (TARÔCO, 2016).



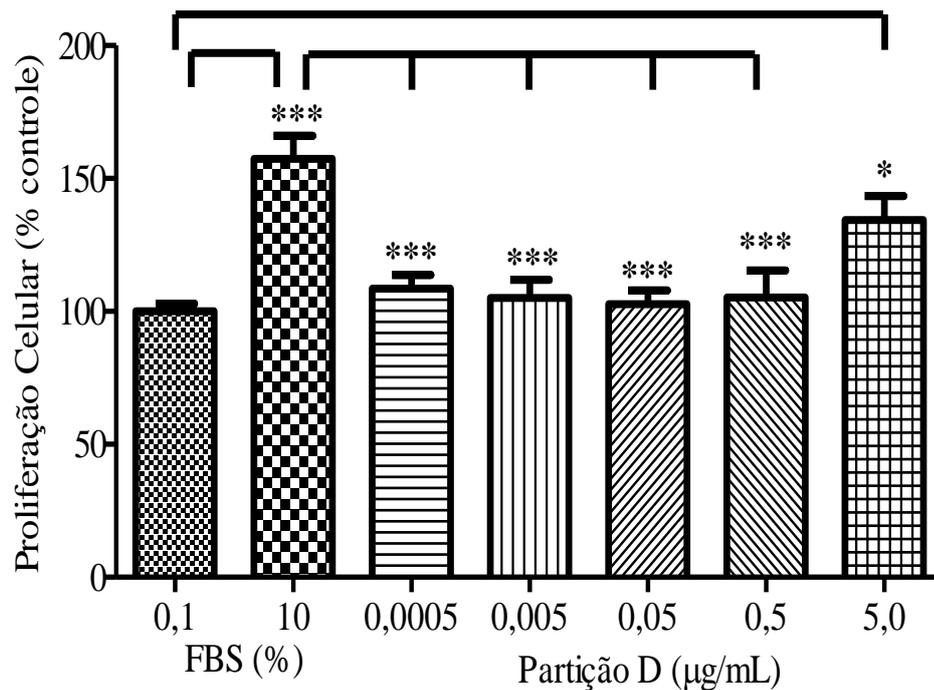
A linhagem L929 quando tratada com partição clorofórmica não exibiu redução em sua capacidade proliferativa, uma vez que os diferentes tratamentos mantiveram seus percentuais proliferativos próximos a cultura controle 0,1%. Além disso, não houve diferenças significativas em nenhum dos tratamentos em relação ao grupo controle de 0,1%. Em contrapartida, todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle 10% e as culturas controle (0,1% 10%) mostraram essas diferenças entre si (figura 26).

**Figura 26.** Células viáveis L929 (%) submetidas a tratamento com a partição clorofórmica (C) de *A. alata* nas concentrações de 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5  $\mu\text{g/mL}$ ; cultura controle: 0,1 e 10 % de FBS. Os resultados representam as médias +/- desvios-padrão. \*, \*\* e \*\*\*Diferença estatisticamente significativa, com valores de  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  e  $p < 0.001$  nessa ordem (48 horas). Fonte: (TARÔCO, 2016).



As culturas L929 quando submetidas a tratamento com a partição de acetato de etila apresentaram proliferação próximo de 20% e acima da cultura controle 0,1% (em todos os tratamentos). Houve diferenças significativas na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  comparada cultura de 0,1% (aumento proliferativo em torno de 40%). Por outro lado, os tratamentos 0.0005, 0.0005, 0.005, 0.05 e 0,5 exibiram diferenças significativas apenas quando comparado a cultura controle 10%. Observou-se também diferenças significativas entre as culturas controle 10% e 0,1% ( $p < 0.001$ ) (figura 27).

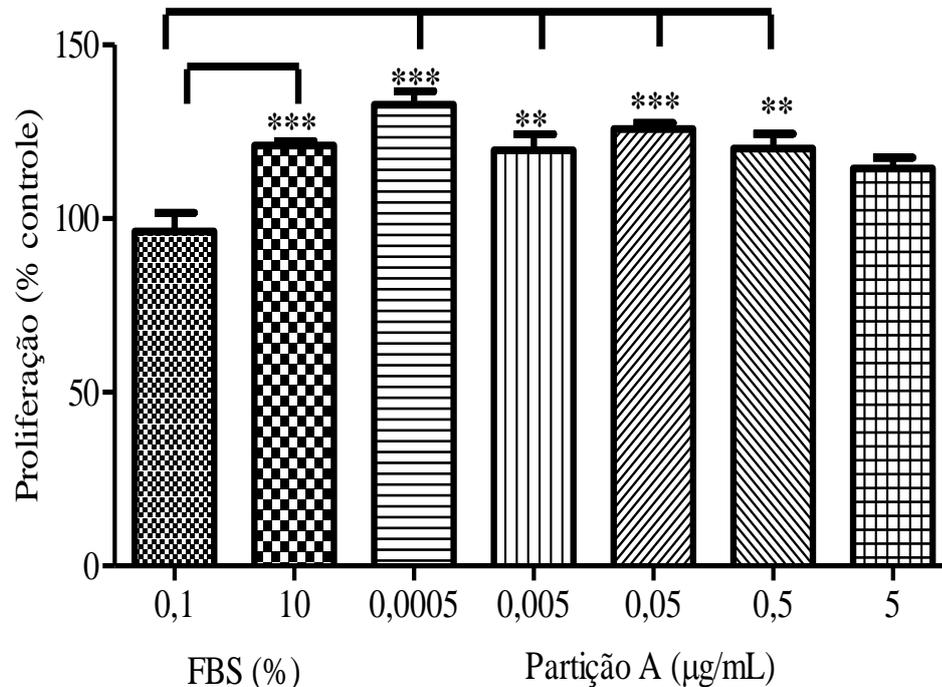
**Figura 27.** Células viáveis L929 (%) submetidas a tratamento com a acetato de etila (D) de *A. alata* nas concentrações de 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5  $\mu\text{g/mL}$ ; cultura controle: 0,1 e 10 % de FBS. Os resultados representam as médias + /- desvios-padrão. \*, \*\* e \*\*\*Diferenças estatisticamente significativas, com valores de  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  e  $p < 0.001$  respectivamente (48 h). Fonte: (TARÔCO, 2016).



#### 5.4.2. Ensaio de proliferação em Haca

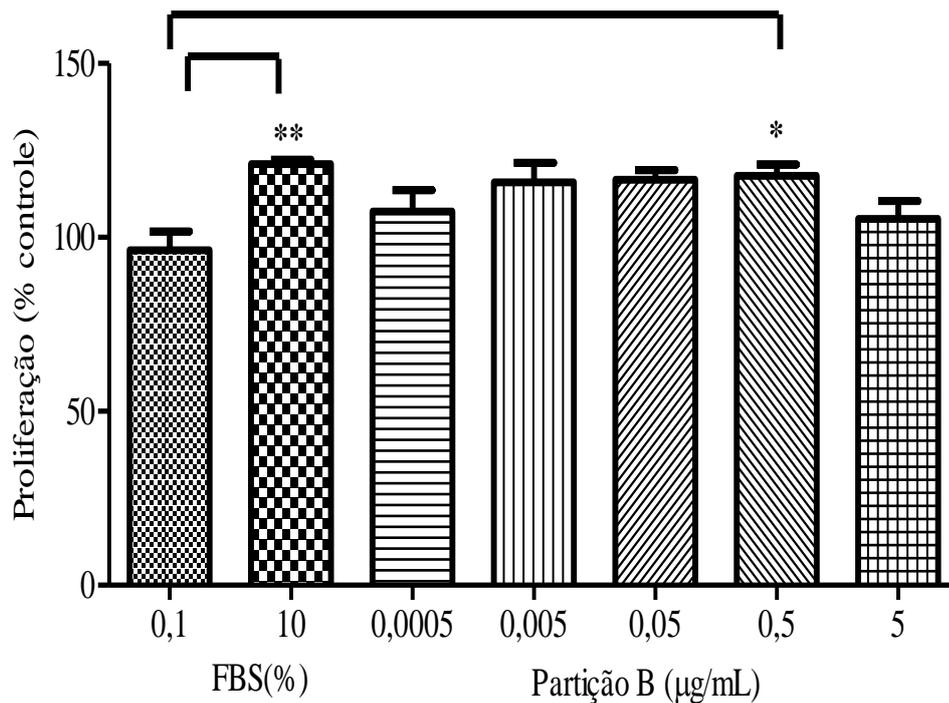
A linhagem Haca exibiu maior proliferação quando comparada a L299, visto que as partições hidroalcoólica, clorofórmica e de acetato de etila mostram resultados mais expressivos (estatisticamente mais significativos). As células Haca quando submetidas a tratamento com a partição hidroalcoólica de *A. alata* apresentaram proliferação acima da cultura controle 0,1%. Nenhum tratamento apresentou diferenças significativas quando comparadas ao grupo controle 10%. Contudo, houve diferenças significativas entre as culturas controle 0,1 e 10%. Além disso, os diferentes tratamentos (0,0005, 0,005, 0,05, 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) exibiram diferenças significativas em relação à cultura controle 0,1% (aumento na capacidade proliferativa). Inclusive, na menor concentração, 0,0005  $\mu\text{g/mL}$ , a proliferação mostrou-se mais acentuada cerca de 40%. Assim, o efeito proliferativo em Haca foi potencializado quando submetido a tratamento com partição hidroalcoólica (figura 28).

**Figura 28.** Células viáveis Haca (%) submetidas a tratamento com a partição hidroalcoólica (A) de *A. alata* nas concentrações de 0,0005, 0,005, 0,05, 0,5, 5  $\mu\text{g/mL}$ ; cultura controle: 0,1 e 10 % de FBS. Os resultados representam as médias  $\pm$  desvios-padrão. \*\* e \*\*\*Diferença estatisticamente significativa, com valor de  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente (48 h). Fonte: (TARÓCO, 2016).



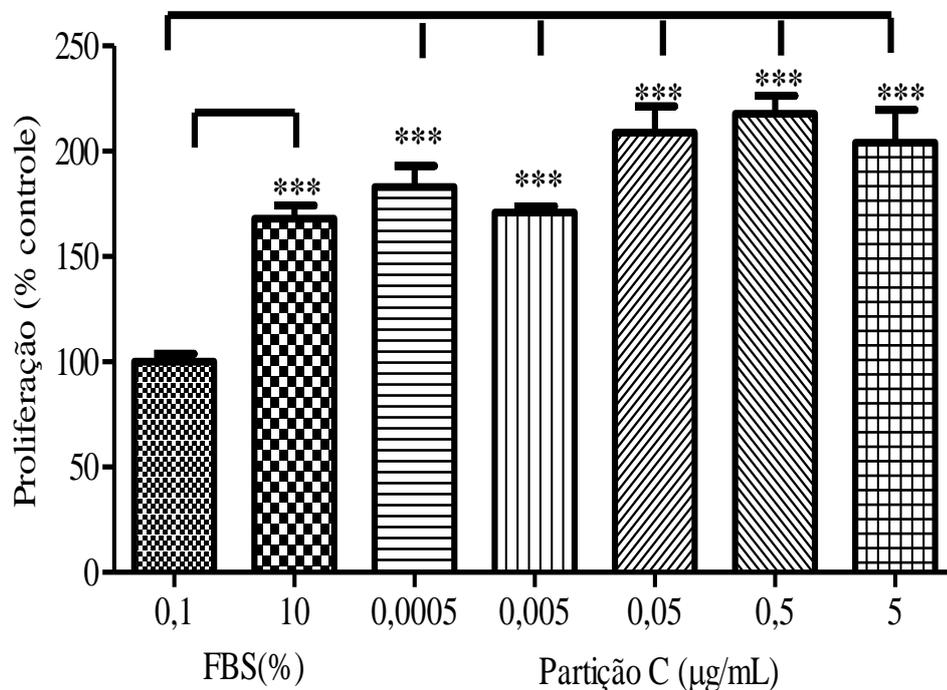
Quanto à partição hexânica, nenhum dos seus tratamentos apresentou decréscimo na proliferação em células Hacat, uma vez que houve aumentos nos percentuais proliferativos. Comparada à cultura 0,1%, houve diferenças significativas apenas na concentração 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Esta, por sua vez, apresentou proliferação de aproximadamente 30%. Além disso, os diferentes tratamentos não exibiram diferenças significativas em relação ao controle positivo 10%. No entanto, entre as culturas controle 0,1 e 10% essas diferenças significativas foram observadas ( $p < 0.01$ ) (figura 29).

**Figura 29.** Células viáveis Hacat (%) submetidas a tratamento com a partição hexânica (B) de *A. alata* nas concentrações de 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5  $\mu\text{g/mL}$ ; cultura controle: 0,1 e 10 % de FBS. Os resultados representam as médias + /- desvios-padrão. \* e \*\* Diferença estatisticamente significativa, com valor de  $p < 0.05$  e  $p < 0.01$  nessa ordem (48 h). Fonte: (TARÔCO, 2016).



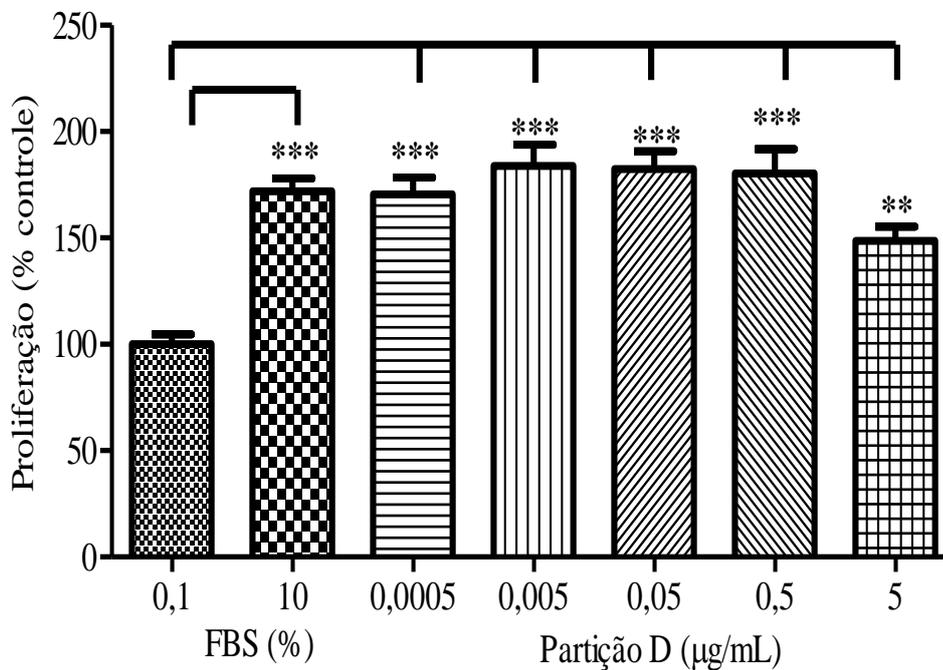
As culturas Hacaat quando submetidas ao tratamento com partição clorofórmica exibiram grande aumento na capacidade proliferativa, uma vez que houve diferenças estatisticamente significativas entre a cultura controle 0,1% e todos os tratamentos. Além disso, houve diferença significativa entre o tratamento 0,5  $\mu\text{g/mL}$  e a cultura controle 10% com valor  $p < 0.01$  (dado não mostrado). As culturas controle 0,1 e 10% também diferenciam-se significativamente entre si ( $p < 0.001$ ). As concentrações 0,05 e 0,05  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram proliferação celular bem acima da cultura controle 0,1%, próximo dos 100%, ao passo que a concentração 5  $\mu\text{g/mL}$  exibiu proliferação em torno de 90%. Com relação as concentrações 0,0005 e 0,005  $\mu\text{g/mL}$  apontam percentuais proliferativos em torno de 80% e 70%, respectivamente. Desse modo, observa-se que mesmo em baixas concentrações a partição clorofórmica potencializou o efeito proliferativo em Hacaat (figura 30).

**Figura 30.** Células viáveis Hacaat (%) submetidas a tratamento com a partição clorofórmica (C) de *A. alata* nas concentrações de 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5  $\mu\text{g/mL}$ ; cultura controle: 0,1 e 10 % de FBS. Os resultados representam as médias  $\pm$  desvios-padrão. e \*\*\* Diferença estatisticamente significativa, com valor de  $p < 0.001$  (48 h). Fonte: (TARÔCO, 2016).



De acordo com figura 31, a linhagem Hacat quando submetida a tratamento com a partição de acetato de etila apresentou aumentos na proliferação, considerando acima da cultura controle 0,1% e próximo de 100 (0,005 – 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ). Houve diferenças significativas entre o controle 0,1% e todos os tratamentos e entre as culturas controles 0,1 e 10 %. Contudo, nenhum tratamento apresentou diferenças significativas em relação a cultura controle 10% (controle positivo). As concentrações 0.0005 e 5  $\mu\text{g/mL}$  promoveram proliferações de aproximadamente 85 e 50%, respectivamente. Desse modo, a partição acetoetífica estimulou a atividade proliferativa em Hacat, mesmo em doses mais baixas deste extrato particionado (potencialização da atividade mitogênica).

**Figura 31.** Células viáveis Hacat (%) submetidas a tratamento com a partição de acetato de etila (D) de *A. alata* nas concentrações de 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5  $\mu\text{g/mL}$ ; cultura controle: 0,1 e 10 % de FBS. Os resultados representam as médias +/- desvios-padrão. \*\* e \*\*\* Diferença estatisticamente significativa, com valor de  $p < 0.01$  e  $p < 0.001$  nessa ordem (48h). Fonte: (TARÔCO, 2016).

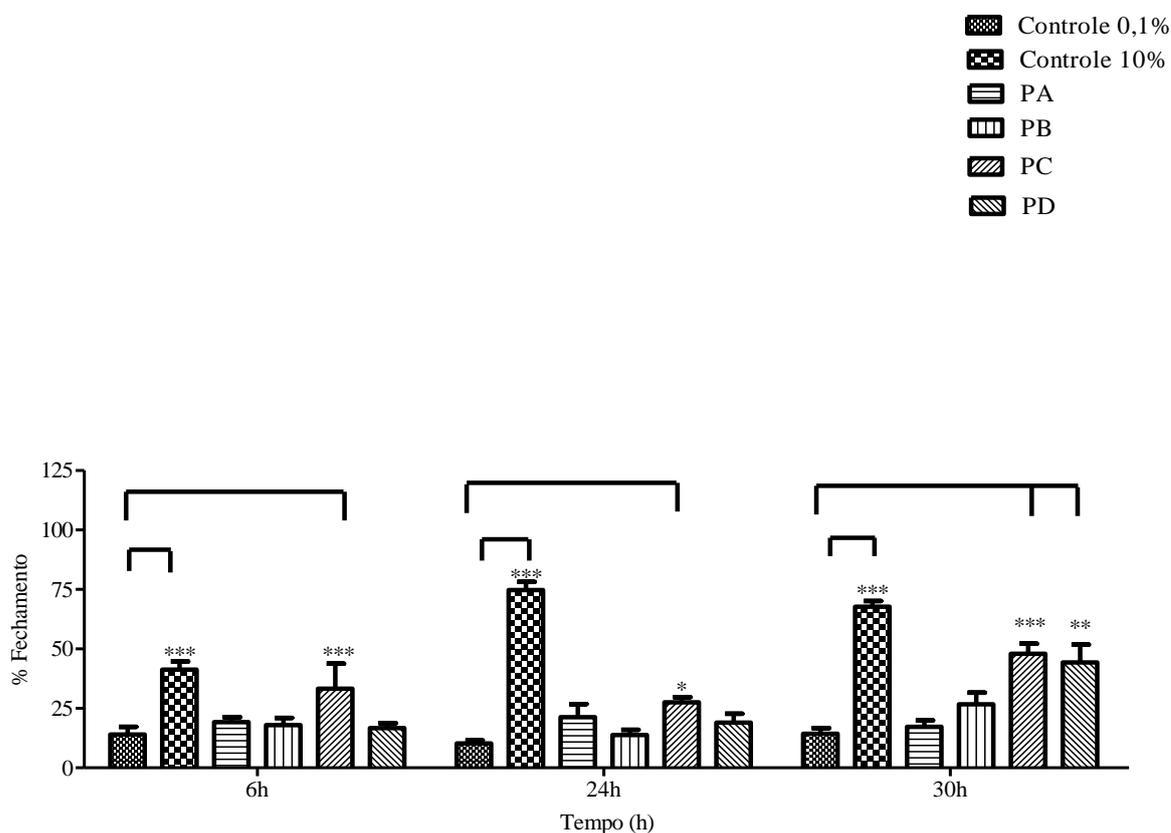


## 5.5. Análise de migração celular

### 5.5.1. Ensaio de migração em L929

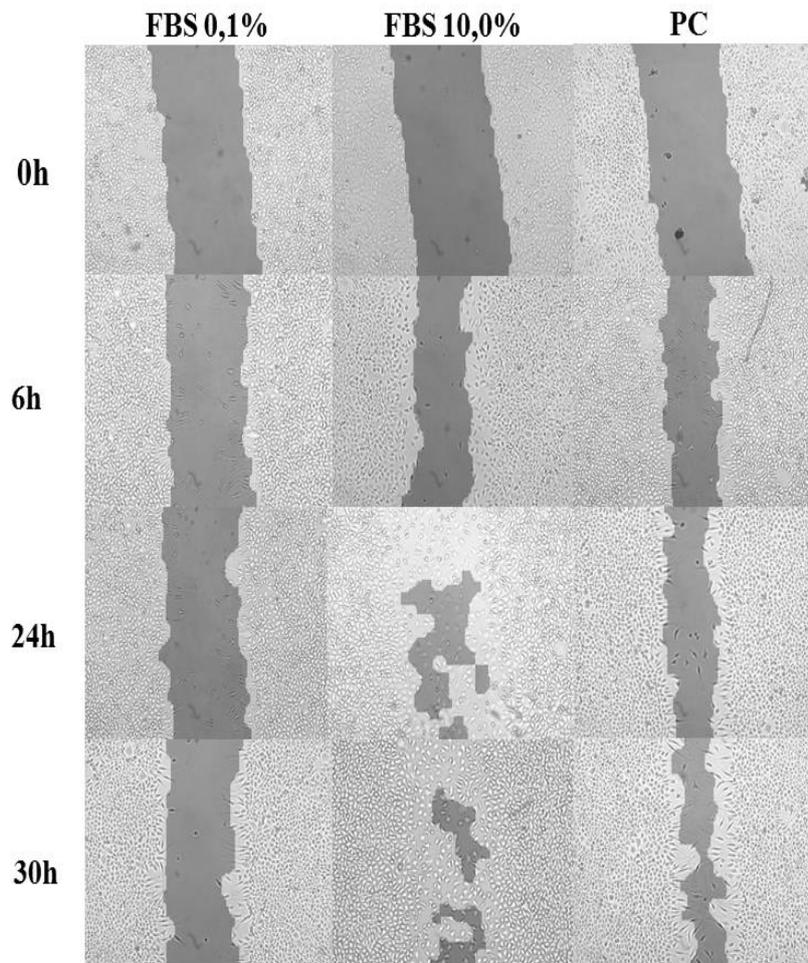
A migração celular foi avaliada através dos tratamentos com partições de *A. alata*. A análise das imagens foi realizada nos tempos 6, 24 e 30 horas. Em 6 horas, os tratamentos com as partições hidroalcoólica, hexânica e de acetato de etila não exibiram diferenças significativas em relação ao controle. Contudo, as células migraram mais com o tratamento da partição clorofórmica em relação ao controle 0,1% ( $p < 0.001$ ), com fechamento da migração em torno dos 35%. Em 24 horas, a cultura submetida ao tratamento com partição clorofórmica apresentou diferença significativa comparada ao controle 0,1%. Em 30 horas, as culturas tratadas com as partições clorofórmica e de acetato de etila mostraram diferenças significativas quando comparadas ao controle 0,1%. Além disso, as culturas controle (0,1 e 10%) também apresentaram diferenças significativas (figura 32).

**Figura 32.** Efeito migratório das partições hidroalcoólica (A), hexânica (B) clorofórmica (C) e acetoetflica (D) na concentração 0,05 $\mu$ g/mL sobre L929; cultura controle: 0,1 e 10 % de FBS. Os resultados são apresentados como fechamento (%) em 6, 24 e 30 h. Os asteriscos \*, \*\* e \*\*\* indicam  $p < 0.05$ ,  $p < 0,01$  e 0,001 respectivamente. Fonte: (TARÔCO, 2016).



De acordo com ensaio de migração, em todos os tempos apenas a partição clorofórmica apresentou diferenças significativas quando comparado ao grupo controle 0,1%, no entanto, migrou menos que a cultura controle 10%. Desse modo, quando comparada às demais partições e ao grupo controle 0,1 % a clorofórmica causou melhor migração em 0, 6, 24 e 30 horas após a lesão em L929. Contudo, em 6, 24, 30 horas a cultura controle 10% apresentou maior migração em relação a partição clorofórmica e ao outro controle 0,1% (figura 33).

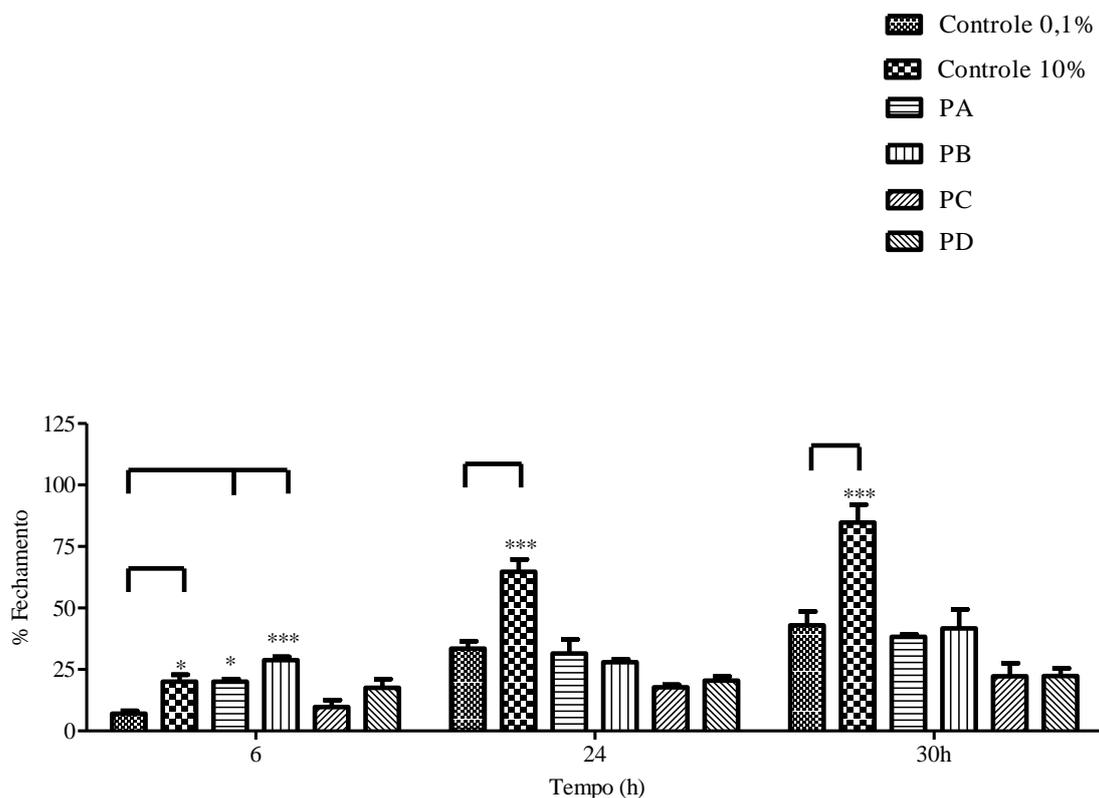
**Figura 33.** Imagem representativa do fechamento da microlesão (%) em células L929 submetidas a tratamento com a partição clorofórmica (0,05 $\mu$ g/mL) em 0, 6, 24 e 30 h em relação às culturas controle (0,1 e 10% de FBS). Aumento de 4x. Fonte: (TARÔCO, 2016).



### 5.5.2. Ensaio de migração em Haca

As células Haca submetidas aos tratamentos com partições de *A. alata* mostram resultados estatisticamente menos significativos no ensaio de migração. Em 6 horas, os tratamentos com as partições hidroalcoólica e hexânica apresentam diferenças significativas comparadas à cultura controle 0,1%, pois exibiram fechamentos de migração maiores, aproximadamente 20% e 35% respectivamente. Em 24 e 30 horas, apenas os controles 0,1 e 10% apresentaram diferenças entre si. Houve diferenças significativas entre as culturas controle, considerando que a cultura controle 10% migrou mais em 6, 24 e 30 horas. Em 30 horas, a cultura controle 10% apresentou um fechamento de migração acima de 75%. Assim, nenhuma das partições apresentou melhor efeito migratório em Haca quando comparada as culturas 0,1% e 10% em todos os tempos (figura 34).

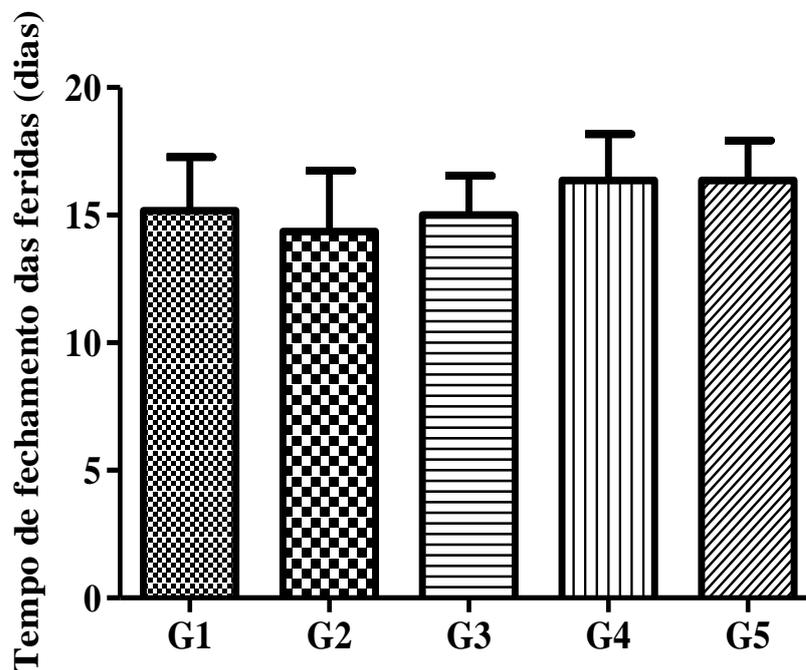
**Figura 34.** Efeito migratório das partições: hidroalcoólica (A), B (hexânica), C (clorofórmica) e D (acetato de etila) na concentração 0,05µg/mL sobre Haca; cultura controle: 0,1 e 10 % de FBS. Os resultados são apresentados como fechamento (%) em 6, 24 e 30 h. Os asteriscos \*, \*\*,\*\*\* indicam resultados com  $p < 0,05$   $p < 0,01$  e 0,001, respectivamente. Fonte: (TARÔCO, 2016).



### 5.6. Avaliação da ação cicatrizante das partições de *A. alata in vivo*

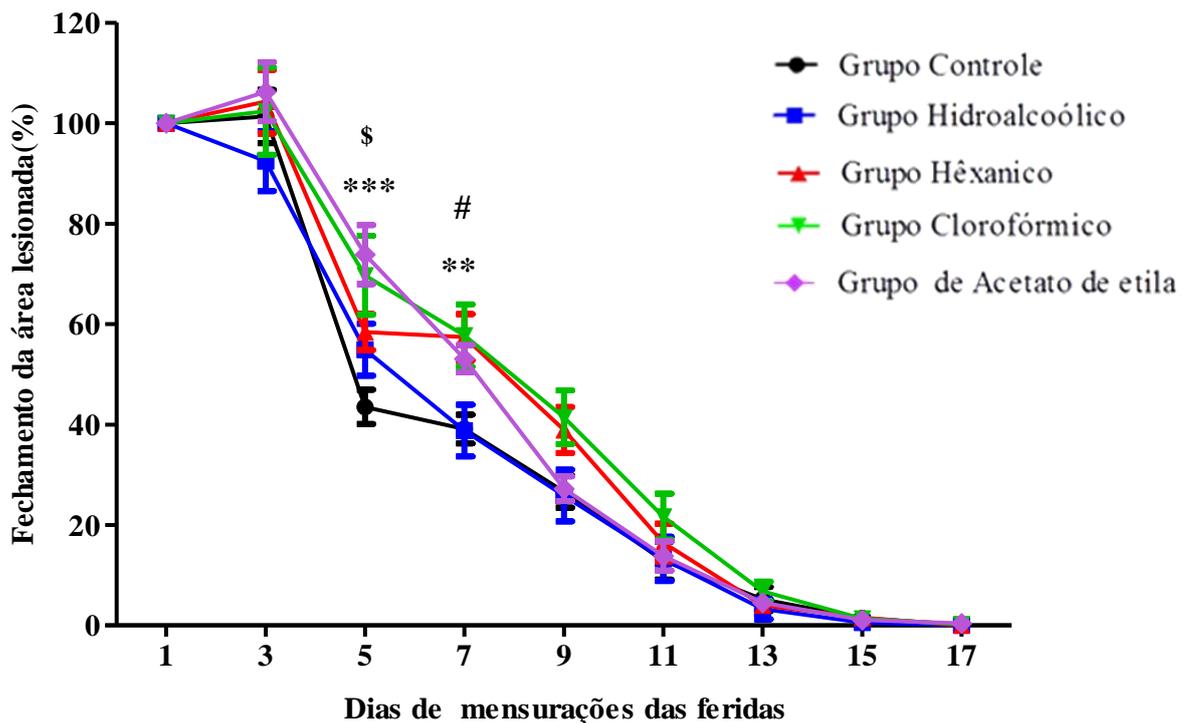
A atividade cicatrizante das partições de *A. alata* (hidroalcoólica, hexânica, clorofórmica e de acetato de etila) foi avaliada em modelo *in vivo* (camundongos Swiss) por morfometria da área lesionada. Os camundongos submetidos às lesões não apresentaram complicações durante o procedimento cirúrgico, nem tão pouco durante o período experimental (19 dias). Não houve diferenças significativas no tempo de fechamento das feridas entre os diferentes tratamentos, ou seja, entre os grupos tratados com partições e o controle (figura 35).

**Figura 35.** Tempo gasto no fechamento de feridas. Grupos de tratamento: G1: Tratamento apenas com gel a base de água (Natrosol ®); G2: tratamento com partição hidroalcoólica solubilizada no gel base; G3: tratamento com partição hexânica solubilizada no gel base; G4: tratamento com partição clorofórmica; G5: tratamento com partição de acetato de etila. Os resultados representam as médias +/- desvios- padrão. Fonte: (TARÔCO, 2016).



Com relação ao tamanho das lesões, não houve diferenças estatisticamente significativas entre diferentes grupos tratados (grupo controle e as quatro partições de *A. alata*), exceto no quinto e sétimo dias de tratamento. Os grupos controle e hexânico grupos mostraram diferenças significativas no sétimo dia, considerando os percentuais de fechamento em torno de 40 e 60%, respectivamente. No sétimo dia, os grupos controle e hidroalcoólico exibiram percentuais de fechamento similares. Também os grupos controle e de acetato de etila exibiram diferenças significativas no quinto dia, pois os seus percentuais de fechamento estavam próximos a 40% e 70%, respectivamente. Ademais, os grupos controle e de acetato de etila exibiram diferenças significativas tanto no quinto como no sétimo dias. Além disso, no quinto dia, o grupo controle exibiu melhor percentual de fechamento da área lesionada quando comparada aos demais grupos tratados, aproximadamente 40%. No nono dia, os grupos controle, hidroalcoólico e acetoetilico apresentaram percentuais de fechamento análogos. A partir do décimo terceiro dia, todos os grupos apresentaram praticamente o mesmo percentual de fechamento da ferida (figura 36).

**Figura 36.** Fechamento da área lesionada (%) em camundongos. Grupos de tratamento: G1: controle; G2: Hidroalcoólico; G3: Hexânico; G4: Clorofórmico; G5: Acetoetilico. # Diferença estatisticamente significativa,  $p < 0,01$  entre G1 e G3; \*\* e \*\*\* Diferença estatisticamente significativa,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  respectivamente, entre G1 e G4; \$ Diferença estatisticamente significativa,  $p < 0,001$  entre G1 e G5. Fonte: (TARÔCO, 2016).



## 6.0. DISCUSSÃO

O uso de plantas medicinais no tratamento de diversas enfermidades adquiriu maior respaldo científico principalmente devido à grande diversidade botânica brasileira (ROCHA *et al.*, 2015). Nessa perspectiva, estudos *in vitro*, *in vivo* e a intensa busca por espécies vegetais aumentam a eficácia no tratamento de feridas, pois os extratos e as frações vegetais estão sendo incorporados em cremes, pomadas e géis a fim de favorecer a cicatrização de feridas (THAKUR *et al.*, 2011; BUENO, 2014).

A cicatrização é envolvida por uma diversidade de fatores intrínsecos e extrínsecos, entretanto o ponto chave para o entendimento do processo cicatricial está associado à funcionalidade celular (THAKUR *et al.*, 2011). A maioria dos estudos *in vitro* sobre a cicatrização de feridas utilizam fibroblastos e/ou queratinócitos de mamíferos, pois permitem melhor visualização da interação celular (OBERRINGER *et al.*, 2007). Os queratinócitos HacaT, por exemplo, são fundamentais aos estudos de proliferação, pois apresentam reduzida capacidade de diferenciação (HOUGHTON *et al.*, 2005). Além disto, as interações célula-célula, célula-matriz estão interligadas a inflamação, angiogênese, contração da ferida e permitem a sobreposição das fases cicatriciais (ADETUTU *et al.*, 2011).

Em grande parte das pesquisas científicas, os ensaios *in vivo* são úteis no cálculo da força tênsil, da área lesionada e em análises histológicas do tecido (TSALA *et al.*, 2013). Os modelos excisionais e incisionais são os mais usados, uma vez que correspondem um percentual de 49% e 28%, respectivamente. Além disso, os ensaios *in vivo* utilizam-se pequenos mamíferos, pois eles são de baixo custo, fácil manuseio e podem ser geneticamente modificados (THAKUR *et al.*, 2011)

O trabalho avaliou a atividade cicatrizante das partições *A. alata* tanto em ensaios *in vivo* como *in vitro*. À princípio, a cromatografia por camada delgada sugeriu tanto no extrato bruto como em suas partições, a presença de alguns flavonoides e outros derivados de ácidos fenólicos. Em estudo *in vitro*, as linhagens L929 e HacaT foram analisadas quanto à citotoxicidade, à proliferação e migração celular. Também foram realizados estudos *in vivo*.

A cicatrização é influenciada pelo sinergismo existente entre fatores de crescimento, plaquetas, queratinócitos, citocinas e fibroblastos (HARPER *et al.*, 2014). No caso de tratamento de lesões com medicamentos originados de plantas, depende também dos compostos bioativos presentes nestes, pois eles interferem no crescimento e proliferação celulares (MUHAMMAD *et al.*, 2013). Em *Clausena excavata*, essa propriedade cicatrizante é atribuída à presença dos polifenóis (ALBAAYIT *et al.*, 2015). O extrato de *Chromolaena*

*odorata*, espécie também pertencente à família Asteraceae, e suas frações também mostraram eficácia no tratamento de feridas devido à diversidade de chalconas, flavononas e ácidos fenólicos (hidroxibenzóico, vanílico e ferúlico) (PHAN *et al.*, 2001). Assim, é possível sugerir atividade cicatrizante *in vitro* de *A. alata*, pois os extratos particionados são proliferativos.

Vários polifenóis reduzem os níveis de mediadores químicos em condições proinflamatórias da pele e neutralizam os radicais livres (RATZ-LYKO, 2015). Os extratos de *A. alata* possuem a apigenina e quercetina (BROUSSALIS *et al.*, 1993), as quais agem na inibição de citocinas proinflamatórias e na modulação de linfócitos e neutrófilos (COUTINHO *et al.*, 2009). Contudo, o extrato aquoso de *Mimosa tenuiflora* exibiu efeitos citotóxicos em fibroblastos dérmicos humanos devido à alta concentração de polifenóis (ZIPPEL *et al.*, 2009). De acordo com nosso trabalho, todas as partições de *A. alata* foram proliferativas em HacaT possivelmente devido à presença de polifenóis. Assim, é possível inferir que a atividade farmacológica dos polifenóis e/ou seus derivados varia de acordo com linhagem celular investigados, pois expõem comportamentos fisiológicos e citomorfológicos distintos.

Tendo em vista que a *A. alata* pode substituir à *A. saturoioides* na medicina popular (GRASSI-ZAMPIERON *et al.*, 2010; TOFFOLI-KADRI *et al.*, 2014) é importante investigar-las quanto às suas propriedades biológicas, farmacológicas e/ou fitoquímicas.

Os extratos hidroalcoólicos de *A. saturoioides* e *A. alata* apresentam uma similaridade de 11 compostos químicos (fenilpropanóides e flavonóides). Essas plantas possuem: o ácido clorogênico, isoquercetina, ácido 3,4-dicafeoil quiníco, ácido 3,5-dicafeoil quiníco, derivados de quercetina, 4,5 dicafeoil quiníco, derivados do kaempferol, quercetina, 3-O-metil-quercetina, gnafalina e 4, 2', 4'- triidroxil-6-metoxi chalcona (GRASSI-ZAMPIERON *et al.*, 2010). O 3-O-metil-quercetina também foi isolado no extrato metanólico de *Hellchrysum odoratissimum* (espécie pertencente a família Asteraceae) e mostrou atividade contra algumas bactérias gram-positivas (VAN PUYVELDE, *et al.*, 1989). De acordo com GHOSH e GABA, (2013) os fitocompostos devem apresentar pelo menos uma de três principais propriedades a fim de favorecer o processo cicatricial. A primeira delas é a antioxidante, responsável pela eliminação do excesso de radicais livres. Além disso, os fitoconstituintes devem estimular o aumento de colágeno e células (atividade mitogênica). E por último, os fitocompostos necessitam eliminar patógenos ou corpos estranhos (atividade antimicrobiana). Assim, como o composto 3-O-metil quercetina apresentou atividade antimicrobiana, logo é possível sugerir atividade cicatrizante do mesmo. Com relação aos demais compostos, a

aplicação tópica do ácido clorogênico (1%) promoveu aumento tanto na síntese de colágeno (através da regulação do TNF  $\alpha$ ) como na taxa de epitelização (CHEN *et al.*, 2013). Além disso, o ácido clorogênico, tipo de ácido fenólico, atua na diminuição do influxo leucocitário, modula angiogênese e a expressão de metaloproteinases. Assim, o ácido clorogênico acelera o processo de reparação tecidual (BAGDAS *et al.*, 2014). Em nossos resultados por CCD, é possível sugerir a presença de derivados de ácidos fenólicos nas partições clorofórmica e de acetato de etila, inclusive estas duas apresentaram maiores percentuais proliferativos em HacaT (0,5-0,0005 $\mu$ g/mL).

A quercetina-O- glicosídeo também favorece a reepitelização (SUNTAR *et al.*, 2010 b), o 3-O-metil- quercetina, 3,7-O-dimetilquercetina, 3,7-O-dimetilcampferol e luteolina possuem propriedades antiinflamatórias, em edemas de camundongos (KÜPELI e YESILADA, 2007; SOUZA *et al.*, 2007). O kaempferol atua na inibição de enzimas como ciclooxigenases e do óxido nítrico (COUTINHO *et al.*, 2009). Em especial, o kaempferol 3-O-(2-O- $\beta$ -D-glucopiranosil)- $\beta$ -glucopiranosídeo promove o aumento da proliferação e migração dos fibroblastos (PONNUSAMY *et al.*, 2015). A chalcona 3-(2-clorofenil)-1-fenilpropenona acelera a velocidade de cicatrização em ratos, pois o tecido de granulação do grupo tratado com este composto apresenta menor número de células inflamatórias e maior quantidade de colágeno (DHIYAALDEEN *et al.*, 2014). O 4',6,7-trimethoxiisoflavona aumenta a migração em HacaT em concentrações maiores que 20  $\mu$ M. Contudo, as células HacaT não proliferaram com a presença do mesmo composto (5- 50  $\mu$ M) (BUI *et al.*, 2014). Alguns compostos e/ou derivados descritos acima estão presentes em *A. alata* e podem modular a resposta anti-inflamatória (KORKINA *et al.*, 2012; TOFFOLI-KADRI *et al.*, 2014). A análise fitoquímica estabelece ligações fundamentais entre a composição do extrato e as possíveis atividades farmacológicas (DELVING *et al.*, 2015). Desse modo, a atividade cicatrizante de *A. alata* pode ser influenciada por seus compostos secundários, pois os nossos resultados em CCD sugeriram a presença de alguns flavonoides (gnafalina e chalcona) e derivados de ácidos fenólicos também nas partições do extrato bruto de *A. alata*.

Em outro estudo, o extrato metanólico *Moringa oleífera* e sua fração aquosa causaram aumentos na proliferação e migração em fibroblastos. A presença de flavonoides, na fração aquosa (vincentina 2) e no extrato metanólico de *M. olifera* (Quercetina-3-O-glucosídeo, kaempferol-3-O-glucosídeo), pode sugerir atividade cicatrizante de *Moringa oleífera* (MUHAMMAD *et al.*, 2013). Similares aos resultados de MUHAMMAD *et al.*, (2013) em nosso trabalho houve proliferação acima do controle em células HacaT quando submetidas a tratamentos com as partições de acetato de etila e clorofórmica. Este fato pode

ser atribuído à presença de derivados de ácidos fenólicos tanto nas partições clorofórmica como acetato de etila. Nessa perspectiva, o ácido cafeico, um derivado de ácido fenólico, também presente em *A. alata* (BROUSSALIS *et al.*, 1993) inibiu a produção de ROS, estimulou um polímero similar ao colágeno e apresentou atividade cicatrizante em lesões cutâneas *in vivo* (SONG *et al.*, 2008). Ademais o ácido clorogênico, o ácido cafeico, a proantocianidina, e outros derivados fenólicos também aceleram a resposta proliferativa em fibroblastos (TSURUYA *et al.*, 2014).

Em contrapartida, o extrato aquoso de *A. saturoioides* tem efeitos citotóxicos em células mononucleares humanas (PBMCs) devido à alta concentração de alguns flavonoides como luteolina, quercetina, e 3-O-metil quercetina (CARIDDI *et al.*, 2015). Nosso trabalho apresentou divergências quando comparado a esse estudo, visto que as partições foram citotóxicas em L929. Contudo, em Haca apenas a partição clorofórmica foi citotóxica.

Outro estudo comprova a citotoxicidade do extrato de *A. saturoioides* em células de Sertoli devido à alta concentração de flavonoides, principalmente a quercetina (POLYDORO *et al.*, 2004). Também em VARGAS (1991), o efeito genotóxico *in vitro* do extrato aquoso de *A. saturoioides* foi em razão da presença de quercetina, luteolina, e kaempferol. Por outro lado, o extrato aquoso desta mesma espécie (500-3600 µg/mL) exibiu baixa toxicidade (LD50 acima 1000 µg/mL) e nenhuma genotoxicidade em células Vero (SABINI *et al.*, 2013). Nessa mesma linhagem, mesmo em maiores concentrações, a *A. alata* também não apresentou citotoxicidade (ZAPATA *et al.*, 2010). O extrato bruto de *A. alata* possui alguns destes compostos citados como quercetina e derivados de kaempferol (GRASSI- ZAMPIERON *et al.*, 2010), no entanto, em nosso trabalho em concentrações mais baixas (5, 10 µg/ mL) nenhuma das partições foi citotóxica em Haca e L929.

Resultados similares aos nossos foram encontrados em ALERICO *et al.*, (2015). Os extratos hidroalcoólicos e etanólicos de *A. saturoioides* (1-50 µg/mL) foram avaliados por proliferação *in vitro* (linhagem Haca). Ambos os extratos promoveram a proliferação desta linhagem em todas as concentrações, entretanto o extrato etanólico exibiu maior proliferação quando comparado ao aquoso. Houve proliferação de queratinócitos mesmo na menor concentração (1 µg/mL), o que sugere a *A. saturoioides* como promissora no tratamento de feridas (ALERICO *et al.*, 2015).

A citotoxicidade do extrato metanólico de *Clausena excavata* também foi analisada em Haca e houve maior proliferação de células em doses baixas do extrato (ALBAAYIT *et al.*, 2015). Em outro trabalho, o extrato aquoso de *Chromolaena odorata* (0,1-5 µg/mL) também estimulou a proliferação dos queratinócitos (PHAN *et al.*, 2001).

Estes resultados não foram divergentes aos encontrados no nosso trabalho, visto que quando as células Hacat foram submetidas a tratamento com as partições hidroalcoólica, clorofórmica e de acetato de etila exibiram proliferações celulares (0,0005-0,5 µg/mL).

O extrato hidroalcoólico de *Pereskia aculeate* (0,065-100 µg/mL) não foi citotóxico e nem induziu a migração em L929 (CARVALHO *et al.*, 2014). Em outro trabalho, o extrato hexânico da *Calendula officinalis* exibiu alta migração fibroblástica, mesmo em concentrações baixas concentrações (FRONZA *et al.*, 2009). Por outro lado, e de acordo com nosso trabalho, apenas a partição clorofórmica de *A. alata* apresentou efeito migratório sobre a L929 ao passo que nenhuma partição causou melhor migração em Hacat comparada as culturas controle.

O extrato metanólico de *Wedelia trilobata* (espécie da mesma família de *A. alata*) e as suas frações de acetato de etila e clorofórmica apresentaram viabilidade de aproximadamente 80% em L929 (1,5-100 µg/mL). Em contrapartida, as frações de acetato de etila e clorofórmica em concentrações acima 25 µg/mL foram citotóxicas. Além disso, em dois dias as frações de acetato de etila e clorofórmica induziram migração em L929 de aproximadamente 70 e 50%, respectivamente (BALEKAR *et al.*, 2012). De acordo com os nossos resultados, as partições hidroalcoólica e de acetato de etila foram levemente citotóxicas a L929 e a clorofórmica causou migração celular em torno de 50% (30h).

O extrato etanólico de *Boesenbergia longiflora* e suas frações foram avaliados através dos seus efeitos citotóxicos e proliferativos (0,3-100 µg/mL). O extrato etanólico e as frações hexânica, clorofórmica e de acetato de etila exibiram uma viabilidade celular superior a 80% sobre L929. Após o tratamento com fração hexânica, houve proliferação acima do controle em L929. Ademais, o extrato etanólico e todas as suas frações induziram a migração celular (SUDSAI *et al.*, 2013). Os nossos resultados coincidiram apenas quando se trata da fração de acetato de etila, pois na concentração 5µg/mL promoveu proliferação na linhagem L929.

Os extratos aquosos e etanólicos de *Plantago major* induziram proliferação e migração celulares nas concentrações 0,1e 1,0 mg /mL. Contudo, a concentração de 10 mg/mL apontou efeitos prejudiciais a células epiteliais (ZUBAIR *et al.*, 2012). Nossos resultados foram similares, pois as partições clorofórmica e de acetato de etila promoveram proliferação acima do grupo controle.

O extrato hidroalcoólico de *Caesalpinia sappan* (1,5-25 µg/mL) apresentou uma viabilidade superior a 80% para L929 e houve um aumento na migração desta mesma linhagem (6,25 µg/mL) de 65, 2% (24 h) para 100 % (48 h), maior inclusive que a cultura controle (TEWTRAKUL *et al.* 2015). No nosso trabalho, a partição acetato de etila (5 µg/mL)

induziu maior proliferação em L929, em torno de 40% e a partição clorofórmica promoveu em células L929 um fechamento em torno dos 35% (24h).

A eficiência proliferativa e migratória de L929 e HacaT é distinta tanto em cocultura como individualmente. O percentual de fechamento em L929 foi aproximadamente 49% e em HacaT foi de 15% (12 h). Em 72 horas, a migração foi concluída apenas em L929. Quando em cocultura, a linhagem L929 novamente migrou mais rapidamente que HacaT, pois em L929 houve um fechamento de 49% comparada a 16% em HacaT (12h) (WALTER *et al.*, 2010). Os nossos resultados não contradizem os de WALTER *et al.*, (2010) pois as células L929 quando submetidas a tratamento com a partição clorofórmica apresentaram uma melhor migração quando comparadas as células HacaT. Isso se deve provavelmente ao fato de que as duas linhagens possuem origens distintas, murina em fibroblastos e humana em queratinócitos. Além disso, a migração dos fibroblastos dérmicos para local da ferida é anterior à migração dos queratinócitos (KEHE *et al.*, 1999). Fibroblastos e queratinócitos são essenciais na reparação tecidual, pois participam da síntese de colágeno e no remodelamento da MEC (THAKUR, *et al.*, 2011). Os queratinócitos promovem a epitelização através da migração e proliferação celulares (HARPER *et al.*, 2014) e o aumento no número de fibroblastos possibilita melhor cicatrização (LAMME *et al.*, 2000). Um extrato que estimula a proliferação celular, por conseguinte, pode ser útil no tratamento da lesão (HOUGHTON *et al.*, 2005), pois a proliferação assim como migração são fatores limitantes a reestruturação tecidual (DEMIRCI *et al.*, 2014). No nosso trabalho, é possível supor atividade terapêutica das partições de *A. alata* no tratamento das lesões, pois em HacaT todas as partições foram proliferativas ao passo que em L929 apenas a acetotética.

Equiparados aos ensaios *in vitro*, os modelos excisionais são os mais apropriados, pois permitem identificar modificações morfológicas mais amplas (avaliação histológica) durante o processo de cicatrização de feridas (WONG *et al.*, 2011). Em ensaios *in vivo*, a *A. saturoioides* não demonstrou toxicidade (RIVERA *et al.*, 2004; SIMOES *et al.*, 1988). Além disso, administração oral do extrato hidroalcoólico de *A. saturoioides* não induziu hemorragias, mas reduziu a migração de neutrófilos, secreção de mediadores quimiotáticos e adesão de leucócitos (BARIONI *et al.*, 2013). Assim como *A. saturoioides*, a administração oral de *A. alata* em camundongos também não causou toxicidade e o seu extrato hidroalcoólico reduziu edema (TOFFOLI-KADRI *et al.*, 2014). Os nossos resultados *in vivo* não foram contrastantes aos de TOFFOLI-KADRI *et al.*, (2014), nenhuma das partições de *A. alata* apresentou toxicidade, pois os animais não expuseram irritações cutâneas ao tratamento. Em trabalho anterior ao nosso que foram analisadas as atividades cicatrizantes dos extratos de *A.*

*alata* e *A. saturoioides* em camundongos por 21 dias. O extrato bruto da *A. alata* apontou um fechamento da lesão em nove dias. Ambas as espécies reduziram a resposta inflamatória e diminuíram o número de miofibroblastos. Estes resultados comprovaram atividades cicatrizantes destas espécies *in vivo* (PEREIRA, 2013). No intuito de estabelecer quais compostos são responsáveis pelo efeito cicatrizante do extrato de *A. alata*, neste trabalho foram testadas as partições desse extrato bruto em camundongos Swiss. Não houve diferenças entre os grupos tratados e o grupo controle, exceto no 5º e 7º dias de tratamento. Mesmo reconhecendo que as partições clorofórmica, hexânica e de acetato de etila apresentaram diferenças nestes dias, não houve diferenças no tempo total de fechamento de feridas entre todos os grupos. Dessa maneira, é possível correlacionar essas diferenças *in vivo* (5º e 7º dias) com os ensaios *in vitro*. Durante o processo cicatricial, os 5º e 7º dias correspondem a intervalos dentro da fase de proliferação. De acordo com ensaio de proliferação, especialmente as partições clorofórmica e acetato de etila causaram mais de 50% de proliferação em células HacaT. Assim, as diferenças *in vivo* (5º e 7º dias) podem ser justificadas a partir dos resultados *in vitro*.

Conforme VIEIRA *et al.*, (2008) o chá verde e própolis possuem uma variedade de polifenóis (presença de catequinas, flavonas, catecóis e epicatecóis). No entanto, eles não apresentaram diferenças significativas entre os valores do diâmetro das lesões quando comparados ao controle (soro fisiológico), pois as características histomorfológicas observadas eram similares (sinais de inflamação e edema). Além disso, durante o tratamento das lesões apesar de não ter havido diferenças entre os grupos, apenas o grupo controle apresentou sangramentos e infecções secundárias. Em contrapartida, a *Achillea biebersteinii* pertencente à família Asteraceae exibiu melhor atividade no tratamento de feridas em ratos e camundongos devido à sua fração hexânica. Esta, por sua vez, apresenta sesquiterpeno-udesmol, piperitona, borneol, que contribuíram para sua ação cicatrizante. A fração hexânica aumentou tanto a resistência a tração como a contração da ferida e pode estar relacionado ao aumento de fibroblastos (AKKOL *et al.*, 2011). Por lado, não é incomum que o extrato bruto apresente maior atividade em relação as suas frações obtidas por cromatografia em coluna (HOUGHTON *et al.*, 2007). Em outro estudo, o extrato bruto de *Kalanchoe petitiiana* apresentou melhor atividade cicatrizante comparada a sua fração clorofórmica, devido ao maior teor de componentes químicos como flavonoides e terpenoides no extrato (MEKONNEN *et al.*, 2013). Em nosso trabalho, os extratos particionados não mostraram o mesmo efeito cicatrizante quando comparados ao extrato bruto, provavelmente devido à atividade sinérgica das moléculas presentes no extrato bruto. Podemos inferir que, ao ser

particionado, pode ter havido redução na atividade sinérgica entre os seus fitocompostos. Isso justifica o fato do modelo *in vivo* apresentar o prolongamento no número de dias no fechamento das feridas (17 dias).

As espécies vegetais não evidenciam seus efeitos farmacológicos apenas com a presença de um metabólito secundário, mas através da combinação e interação desses (HORINOUCI, 2013). Além disso, a eficácia terapêutica e a redução dos efeitos colaterais dos fitoterápicos dependem da interação entre os compostos presentes em vegetais (WILLIAMSON, 2001). O isolamento de um princípio ativo de uma espécie vegetal provoca a exclusão de atividades biológicas essenciais (RATES, 2001; HORINOUCI, 2013). Se a combinação de substâncias é necessária na produção de efeito no extrato, quando esta se restringe a uma fração ou composto separadamente, a planta perde esta ação farmacológica (WILLIAMSON, 2001; GILBERT e ALVES, 2003). O fracionamento pode gerar a perda de atividade farmacológica, devido à ruptura do sinergismo ou à decomposição dos princípios ativos (HOUGHTON *et al.*, 2005). A decomposição dos compostos ativos ocorre através das reações com solventes orgânicos e/ou grupos funcionais da molécula. Um exemplo é o fracionamento por cromatografia utilizando sílica, pois presença desta substância facilita especialmente substâncias fenólicas sofrerem a oxidação (HOUGHTON *et al.*, 2007). A *Artemisia annua*, por exemplo, apresentou menor atividade sinérgica entre flavonas quando foi fracionada (GILBERT e ALVES, 2003) e os compostos secundários da alcachofra também quando isolados se tornam inativos (MULLER, 2006).

Outras pesquisas comprovam que a ação sinérgica entre os fitoconstituintes dos extratos pode acelerar o reparo tecidual. A ação cicatrizante do extrato *Sida corymbosa* foi justificada pelo sinergismo entre os fitoconstituintes do extrato, pois houve redução na inflamação e aumento na velocidade de reparação (JOHN-AFRICA *et al.*, 2013). A combinação entre extrato de *Ocimum basilicum* e mel confirmam efeitos benéficos na rapidez cicatricial e sugerem ser usados topicamente no tratamento de feridas (SALMAH *et al.*, 2005).

Neste aspecto farmacológico, um fitoderivado sintetizado a partir dos extratos de *A. saturoioides*, assa-peixe, tanchagem, cânfora e bálsamo acelerou a cicatrização de feridas, pois houve o sinergismo entre as substâncias presentes nestes vegetais (DE ARAUJO, 2010). Além disso, a administração tópica de um fitoterápico contendo *Ageratum conyzoides*, *Ficus religiosa*, *Curcuma longa* e *Tamarindus* exibiu maior ação cicatrizante em ratos e maior resistência à tracção da área lesionada (SACHIN *et al.*, 2009). Dessa maneira, a *A. alata* pode ser usada no desenvolvimento de um fitoterápico, contudo estudos complementares devem ser

realizados para tal validação científica. De acordo com HOUGHTON *et al.*, (2005), os medicamentos a base de plantas para serem legitimados cientificamente devem influenciar pelo menos dois eventos, como a proliferação fibroblástica e diferenciação dos queratinócitos dentro do processo de cicatrização. Vários medicamentos chineses a base de extratos vegetais já são utilizados no tratamento de feridas (CHAK *et al.*, 2013), como por exemplo, a *Astragali radix* e *Rehmanniae radix*. Estes quando usados separadamente não apontam relevância clínica. Contudo, a interação sinérgica entre eles promove a redução da área lesionada, migração celular, angiogênese e conseqüentemente a cicatrização em animais (LAU *et al.*, 2012).

A *Calendula officinalis*, espécie da mesma família de *A. alata*, também já foi investigada. O seu extrato etanólico (obtido das inflorescências) e suas as partições diclorometano e hexânica são indutores do processo angiogênico em feridas induzidas em ratos (PARENTE *et al.*, 2012). Através dos nossos resultados *in vitro* das partições de *A. alata*, acreditava-se que as partições clorofórmica e/ou de acetato promovessem o fechamento mais rápido das feridas, uma vez que houve maior proliferação celular, o que não foi comprovado *in vivo*. Nem sempre uma atividade farmacológica *in vitro* garante o mesmo efeito *in vivo*. Neste ponto, torna-se incoerente estabelecer equivalências de absorção e metabolismo entre seres vivos distintos (HOUGHTON *et al.*, 2007).

A cicatrização é envolvida pela sobreposição de eventos bioquímicos celulares e moleculares, a fim de promover a reparo tissular. As plantas e seus vários compostos secundários direcionam e modulam os processos cicatriciais, visto que interferem na interação célula-célula, angiogênese, fibroplasia, epitelização e remodelamento da matriz (TSALA *et al.*, 2013; THAKUR *et al.*, 2011). Os nossos resultados em CCD, podem explicar a ação cicatrizante do extrato bruto, mas não dos particionado *in vivo*. Até porque um composto secundário presente no mesmo extrato vegetal pode ter ações distintas, o que atrapalha identificar seu real efeito terapêutico (MULLER, 2006).

O estudo de plantas medicinais abrange várias etapas no intuito de garantir a eficácia e segurança em futuros medicamentos. Inicialmente, é necessária a identificação botânica. Posteriormente o estudo fitoquímico e por fim os ensaios biológicos *in vitro*, *in vivo*, pré-clínicos e clínicos (CALIXTO e YUNES, 2002). O nosso trabalho evidenciou que além da espécie estudada, vários outros fatores alteram os resultados como: concentração usada, linhagens celulares, tempo de exposição ao tratamento, dentre outros. Tudo isso torna difícil a comparação e conseqüente discussão do assunto. Vale ressaltar que, independente dos outros

estudos, este trabalho demonstrou a potencialidade das partições em serem candidatas à mais estudos visando a cicatrização de feridas.

## 7.0. CONCLUSÕES

- A cromatografia por camada delgada sugere que o extrato bruto e as partições de *A. alata* possuem flavonoides e derivados de ácidos fenólicos.
- As partições de *A. alata* foram citotóxicas na linhagem L929, entretanto em HacaT, apenas a partição clorofórmica foi citotóxica.
- Todas as partições de *A. alata* promoveram proliferação em HacaT, ao passo que em L929 apenas a partição de acetato de etila (5 µg/mL).
- Em L929, a partição clorofórmica induziu migração, entretanto as partições não funcionaram em HacaT.
- Pelo estudo *in vivo* conclui-se que os compostos separados no processo de partição não foram capazes de reduzir o tempo de cicatrização.

## 8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SALAM, B. K. A. H. Modulatory Effect of Whey Proteins in Some Cytokines Involved in Wound Healing in Male Diabetic Albino Rats. **Inflammation**, v. 37, n. 5, p. 1616-1622, 2014.

ADETUTU, A.; MORGAN, W.A.; CORCORAN, O. Ethnopharmacological survey and *in vitro* evaluation of wound-healing plants used in South-western Nigeria. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 50-56, 2011.

AGYARE, C.; LECHTENBERG, M.; DETERS, A.; PETEREIT, F.; HENSEL, A. Ellagitannins from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell.:Geraniin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 617-624, 2011.

AKKOL, E. K.; KOCA, U.; PESIN, I.; YILMAZER, D. Evaluation of the wound healing potential of *Achillea biebersteinii* Afan.(Asteraceae) by *in vivo* excision and incision models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2011, p.1-7, 2011.

ALBAAYIT, S. F., ABBA, Y.; RASEDEE, A.; ABDULLAH, N. Effect of *Clausena excavata* Burm. f.(Rutaceae) leaf extract on wound healing and antioxidant activity in rats. **Drug design, development and therapy**, v.9, p.3507, 2015.

ALERICO, G. C.; BECKENKAMP, A.; VIGNOLI-SILVA, M.; BUFFON, A.; VON POSER, G. L. Proliferative effect of plants used for wound healing in Rio Grande do Sul state, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 176, p. 305-310, 2015.

ALI, E. M. M.; BADWI, S.M. A.; ABDELREHMANED, S. H.; KHOGALI, S. M. E.; SAAD, O. A. Wound Healing Effect and Anti-Microbial Activity of Methanolic and Petrolum Ether Extract of *Punica granatum* in Polyethylene Glycol. **Nova Journal of Medical and Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p.1-8, 2014.

ALMEIDA, P. C. C. **Estudo da transição dermoepidérmica dos enxertos de pele e sua relação com o surgimento de vesículas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2009.

ALMEIDA, W. A. D.; FERREIRA, A. M.; IVO, M. L.; RIGOTTI, M. A.; GONÇALVES, R. Q.; SANTOS PEREIRA, A. P. D. Socio-demographic and clinic characteristics and quality of life of people with wounds: an integrative review. **Journal of Nursing UFPE**, v.8 n.12, p. 4353-4361, 2014.

ALTMAYER, P.; HOFFMANN, K.; EL GAMMAL, S.; HUTCHINSON, J. **Wound healing and skin physiology**. Springer Science & Business Media, 2012.

ANNAN, K.; HOUGHTON, P. J. Two novel lupane triterpenoids from *Paullinia pinnata* L. with fibroblast stimulatory activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 5, p. 663-668, 2010.

ARO, A. A.; FREITAS, K. M.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; DOLDER, H.; GOMES, L.; VIDAL, B. C.; PIMENTEL, E. R. Effect of the *Arrabidaea chica* extract on collagen fiber organization during healing of partially transected tendon. **Life sciences**, v. 92, n. 13, p. 799-807, 2013.

ARREDONDO, M. F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MORQUIO, A.; M.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; DAJAS, F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C and some of its main flavonoids against oxidative stress. **Journal of ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 13-20, 2004.

ATIBA, A.; UENO, H.; UZUKA, Y. The effect of *Aloe vera* oral administration on cutaneous wound healing in type 2 diabetic rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 5, p. 583-589, 2011.

BAGDAS, D.; GUL, N. Y.; TOPAL, A.; TAS, S.; OZYIGIT, M. O.; CINKILIC, N.; TURACOZEN, O. Pharmacologic overview of systemic chlorogenic acid therapy on experimental wound healing. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 387, n.11, p.1101-1116, 2014.

BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M. H.; RAHIMI, R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. **Archives of dermatological research**, v. 306, n. 7, p. 601-617, 2014.

BAI, M. Y.; CHOU, T. C.; TSAI, J. C.; YANG, H. C. Active ingredient-containing chitosan/polycaprolactone nonwoven mats: Characterizations and their functional assays. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 1, p. 224-233, 2013.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Braz J Pharm Sci**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BALEKAR, N.; KATKAM, N. G.; NAKPHENG, T.; JEHTAE, K.; SRICHANA, T. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 14 n. 3, p. 817-824, 2012.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BANERJEE, J.; CHAN, Y. C.; SEN, C. K. MicroRNAs in skin and wound healing. **Physiological genomics**, v. 43, n. 10, p. 543-556, 2011.

BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R.; MOURA, M. D.; SILVA, M. S.; LIMA, K. V. B.; DA-CUNHA, E. V. L.; TAKEMURA, O. S. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 1, p. 109-139, 2006.

BARIONI, E. D.; SANTIN, J. R.; MACHADO, I. D.; RODRIGUES, S. F. D. P.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; WAGNER, T. M.; NIERO, R. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC hydroalcoholic extract inhibits neutrophil functions related to innate host defense. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585-601, 2008.

BARUA, C. C.; TALUKDAR, A.; BEGUM, S. A.; SARMA, D. K.; FATHAK, D. C.; BARUA, A. G.; BORA, R. S. Wound healing activity of methanolic extract of leaves of *Alternanthera brasiliana* Kuntz using *in vivo* and *in vitro* model. **Indian J Exp Biol**, v. 47, n. 12, p. 1001-1005, 2009.

BAUER, L.; SIMÕES, C. M. O.; SIQUEIRA, N. C. S.; SCHENKEL, E. P.; SILVA, G. A. A. B.; ALICE, C.B. Flavonoids of the inflorescences of *Achyrocline alata*. **Revista Latinoamericana de Química**, v.18, n.3, p.91, 1987.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências – Desvendando o Sistema Nervoso**. Porto Alegre 2ª ed, Artmed Editora, 2002.

BEHM, B.; BABILAS, P.; LANDTHALER, M.; SCHREML, S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, n. 7, p. 812-820, 2012.

BERNADI, W. A.; DE CARVALHO, Z. J.; LIMA, E. M.; SOUZA, T. D.; ENDRINGER, D. C.; DE SOUZA, V. R. C. Effects of topical application of essential oil from resin of almescar (*Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand) in experimentally induced skin wounds in rats. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 1, p.10-15 2015.

BLANES, L. Tratamento de feridas. In: Baptista-Silva J.C.C. (Ed.). **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo: 2004. Disponível em: URL: <<http://www.bapbaptista.com.br>> Acesso: 10 de outubro 2015.

BOHLMANN, F.; ABRAHAM, W. R.; ROBINSON, H.; KING, R. M. A new labdane derivative and geranylphloroglucinols from *Achyrocline alata*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 11, p. 2475-2477, 1980.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 48 , de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** Disponível em: <[http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/docs/Resolucao RDC 48 de 16032004.PDF](http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/docs/Resolucao_RDC_48_de_16032004.PDF)>. Acesso em: 30 nov. 2015.

BROUSSALIS, A. M.; FERRARO, G. E.; COUSSIO, J. D. Phenolic constituents of *Achyrocline alata*. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 21, n. 2, p. 306, 1993.

BROUSSALIS, A. M.; FERRARO, G. E.; CURNI, A.; COUSSIO, J. D. Phenolic constituents of four *Achyrocline* species. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 16, n. 4, p. 306, 1988.

BRYANT, R. A.; NIX, D. P. **Acute & chronic wounds: current management concepts**, 50ª ed. Elsevier Health Sciences, 2015.

BUDOVSKY, A.; YARMOLINSKY, L.; BEN-SHABAT, S. Effect of medicinal plants on wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.23, n. 2, p.171-183, 2015.

BUENO, F. G. ***Poincianella pluviosa*: Estudo da viabilidade celular e proliferação de fibroblastos e queratinócitos in vitro, e avaliação da atividade cicatrizante em ratos diabéticos e normoglicêmicos.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá, 2014.

BUI, N. T., HO, M. T., KIM, Y. M., LIM, Y., & CHO, M. Flavonoids promoting HaCaT migration: II. Molecular mechanism of 4', 6, 7-trimethoxyisoflavone via NOX2 activation. **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 570-577, 2014.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. **Chapecó: Argos**, 2002.

CARIDDI, L. N.; SABINI, M. C.; ESCOBAR, F. M.; BACCHETTI, R.; MONTIRONI, I.; MERCKIS, C.; SABINI, L. I. *In Vitro* and *In Vivo* Cytogenotoxic Effects of Hot Aqueous Extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

CARLSON, B. M. Integumentary, skeletal, and muscular systems. Human **Embryology and Developmental Biology**, p. 153-181, 1994.

CARVALHO, A. C.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, E. G.; SOARES, C. P.; BLAU, L.; MENEGON, R. F.; JOAQUIM, W. M. Wound healing properties and mucilage content of *Pereskia aculeata* from different substrates. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 6, p. 677-682, 2014.

CASTRO, L. C. **Avaliação das atividades antibacteriana e amebicida dos extratos aquoso e etanólico de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

CAVALCANTE L. C.; MOREIRA, M. C.; MOTA, O. M. L.; TURATTI, E.; VIANA, F. A. C.; PEREIRA S. L. S. Efeito da pedra umes no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. **Periodontia**, v. 22, n. 1, p. 69-73, 2012.

CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. **Phytotherapy Research**, v.23, n.10, p. 1347-1354, 2009.

CHAK, K. F.; HSIAO, C.Y.; CHEN, T. Y. A Study of the Effect of Shiunko, a traditional chinese herbal medicine, on fibroblasts and its implication on wound healing processes. **Advances in wound care**, v. 2, n. 8, p. 448-455, 2013.

CHANDIKA, P.; KO, S. C.; JUNG, W. K. Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration. **International journal of biological macromolecules**, v. 77, p. 24-35, 2015.

CHATTOPADHYAY, S.; RAINES.; R. T. Review collagen-based biomaterials for wound healing. **Biopolymers**, v. 101, n. 8, p. 821-833, 2014.

CHEN, W. C.; LIOU, S. S.; TZENG, T. F.; LEE, S. L.; LIU, I. M. Effect of topical application of chlorogenic acid on excision wound healing in rats. **Planta medica**, v. 79, n. 8, p. 616-621, 2013.

CHEN, F. M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, 2015.

CHEN, L.; SCHREMENTI, M. E.; RANZER, M. J.; WILGUS, T. A.; DIPIETRO, L. A. Blockade of mast cell activation reduces cutaneous scar formation. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85226, 2014.

CHRISSOULI, S.; PRATSINIS, H.; VELISSARIOU, V.; ANASTASIOU, A.; KLETSAS, D. Human amniotic fluid stimulates the proliferation of human fetal and adult skin fibroblasts: the roles of bFGF and PDGF and of the ERK and Akt signaling pathways. **Wound repair and regeneration**, v. 18, n. 6, p. 643-654, 2010.

CLARK, R. **The molecular and cellular biology of wound repair**. Springer Science & Business Media, 2013.

COLDREN, C. D.; HASHIM, P.; ALI, J. M.; OH, S. K.; SINSKEY, A. J.; RHA, C. Gene expression changes in the human fibroblast induced by *Centella asiatica* triterpenoids. **Planta medica**, v. 69, n. 8, p. 725-732, 2003.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

DARBY, I. A.; LAVERDET, B.; BONTÉ, F.; DESMOULIÈRE, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, v. 7, p. 301-11, 2014.

DE ARAÚJO, G. L. **Estudo de formulações de fitoderivados e flavonoide na inflamação e cicatrização de feridas em coelhos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, 2010.

DE SOUZA, V. F. **Preparação e caracterização de micro e nanopartículas de ácido hialurônico com encapsulação do extrato bruto vegetal da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot para aplicações farmacêuticas e cosméticas**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2012.

DELAVARY, B. M.; VAN DER VEER, W. M.; VAN EGMOND, M.; NIESSEN, F. B.; BEELEN, R. H. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 753-762, 2011.

DELVING, L. K. O. B. **Avaliação dos potenciais citotóxico e antiinflamatório dos extratos etanólico e hexânico da *Calyptanthes grandifolia* O. Berg em cultura celular**. Dissertação de mestrado. Centro Universitário Univates, 2015.

DEMARQUE, D. P.; FITTS, S. M. F.; BOARETTO, A. G.; DA SILVA, J. C. L.; VIEIRA, M. C.; FRANCO, V. N.; CAROLLO, C. A. Optimization and Technological Development Strategies of an Antimicrobial Extract from *Achyrocline alata* Assisted by Statistical Design. **PloS one**, v. 10, n. 2, p.1-15, 2015.

DEMIRCI, S.; DOĞAN, A.; DEMIRCI, Y.; ŞAHİN, F. *In vitro* wound healing activity of methanol extract of *Verbascum speciosum*. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 7, n. 3, p. 37-44, 2014.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2.ed. John Wiley e Sons, Ltd, 2002.

DHIYAALDEEN, S. M.; ALSHAWSH, M. A.; SALAMA, S. M.; ALWAJEEH, N. S.; ALBATRAN, R.; ISMAIL, S.; ABDULLA, M. A. Potential activity of 3-(2-Chlorophenyl)-1-phenyl-propenonein accelerating wound healing in rats. **Bio Med research international**, v.2014, p.1-10, 2014.

DI GRAZIA, A.; CAPPIELLO, F.; IMANISHI, A.; MASTROFRANCESCO, A.; PICARDO, M.; PAUS, R.; MANGONI, M. L. The Frog Skin-Derived Antimicrobial Peptide Esculentin-1a (1-21) NH<sub>2</sub> Promotes the Migration of Human HaCaT Keratinocytes in an EGF Receptor-Dependent Manner: A Novel Promoter of Human Skin Wound Healing? **PloS one**, v. 10, n. 6, p.1-20, 2015.

DINH, T.; BRAUNAGEL, S.; ROSENBLUM, B. I. Growth Factors in Wound Healing: The Present and the Future? **Clinics in podiatric medicine and surgery**, v. 32, n. 1, p. 109-119, 2015.

DOGOURY, H. G.; FARAHPOUR, M. R.; AMNIATTALAB, A. Comparison effect of chamomile (*Chamomilla recutita*) hydroethanolic extract and flaxseed oil (*Linum ustatissum*) alone and simultaneous administration with nitrofurazone in wound healing process. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 5, n.1, p. 216-223, 2015.

DONG, Y. L., HE, L. C.; WANG, H. H.; YOU, H. S.; WU, J. F. Effect of taspine hydrochloride on skin wound healing in rats and its mechanism. **Journal of Chinese integrative medicine**, v. 3, n. 5, p. 386-390, 2005.

DROZGYIK, A.; HEGEDÉUS, V.; LOTZ, G. P.; ONODY, P. A.; SZIJARTO, A.; BLAZOVICS, A.; DITRÓ, K. Effect of different dose cannabidiol treatment on experimental induced colitis. **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v. 49, n. 05, p. A12, 2011.

DUARTE, C. M.; QUIRINO, M. R.; PATROCÍNIO, M. C.; ANBINDER, A. L. Effects of *Chamomilla recutita* (L.) on oral wound healing in rats. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 16, n. 6, p. e716, 2011.

DURAZ, A.Y.; KHAN, S. A. Knowledge, attitudes and awareness of community pharmacists towards the use of herbal medicines in muscat region. **Oman medical journal**, v. 26, n. 6, p. 451-453, 2011.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 514-525, 2007.

ESTEVÃO, L. R. M.; MENDONÇA, F. D. S.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, R. S.; BARROS, M. E. G. D.; ARANTES, R. M. E.; EVÊNCIO-NETO, J. Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 202-209, 2013.

FANIKU, C.; WRIGHT, C. S.; MARTIN, P. E. Connexins and pannexins in the integumentary system: The skin and appendages. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 15, p. 2937-2947, 2015.

FERREIRA, M. E.; DE ARIAS, A. R.; YALUFF, G.; DE BILBAO, N. V.; NAKAYAMA, H.; TORRES, S.; FOURNET, A. Antileishmanial activity of furoquinolines and coumarins from *Helietta apiculata*. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 375-378, 2010.

FERREIRA, K. F. C.; NARDIN, J. M. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do extrato de *Bauhinia glabra* em células linfocitárias normais. **Caderno da Escola de Saúde**, v.1, n. 13, 2015.

FLORIM, J. C. **Emprego de nanopartículas lipídicas sólidas contendo extrato de semente de uvas para aceleração da cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2013.

FRONZA, M.; HEINZMANN, B.; HAMBURGER, M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 463-467, 2009.

GANAPATHY, N.; VENKATARAMAN, S. S.; DANIEL, R.; ARAVIND, R. J.; KUMARAKRISHNAN, V. B. Molecular biology of wound healing. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 4, suppl2, S334-S337 2012.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Facial plastic surgery clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 441-453, 2011.

GARTNER, L.P; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em Cores**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

GENESER, F. **Histologia: com bases moleculares**. 3.ed. Rio de Janeiro: Médica Panamericana, Guanabara Koogan, 2003.

GHOSH, A. R.; ABDULLAH, M. F.; DAS, S.; ROY, P.; DATTA, S.; MUKHERJEE, A. New Guar Biopolymer Silver Nanocomposites for Wound Healing Applications. **BioMed research international**, v. 2013, p.1-8, 2013.

GHOSH, P. K.; GABA, A. Phyto-Extracts in Wound Healing. **J Pharm Pharm Sci**, v.16, n.5, p. 760 - 820, 2013.

GILBERT, B.; ALVES, L. Synergy in plant medicines. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 1, p. 13-20, 2003.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 194-205, 2012.

GRASSI-ZAMPIERON, R.; FRANÇA, L. V.; CAROLLO, C. A.; VIEIRA, M. D. C.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; SIQUEIRA, J. M. D. Comparative profiles of *Achyrocline alata* (Kunth) DC. and *A. satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae, applying HPLC-DAD-MS. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 575-579, 2010.

GRASSI-ZAMPIERON, R. F.; VIEIRA, M. C.; SIQUEIRA, J. M. Atividade antioxidante e captora de radicais livres dos extratos de *Achyrocline alata* (Kunth.) DC. em comparação com extratos de *Achyrocline satureioides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 572-576, 2009.

GREAVES, N. S.; ASHCROFT, K. J.; BAGUNEID, M.; BAYAT, A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of dermatological science**, v. 72, n. 3, p. 206-217, 2013.

HARPER, D.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C.E. The physiology of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 32, n. 9, p. 445-450, 2014.

HARRIS, M. I. N. C. **Pele: Estrutura, propriedades e envelhecimento**. 2ª ed. São Paulo: Editora SENAC, 2005.

HE, S.; BLOMBÄCK, M.; BARK, N.; JOHNSON, H.; WALLÉN, N. H. The direct thrombin inhibitors (argatroban, bivalirudin and lepirudin) and the indirect Xa-inhibitor (danaparoid) increase fibrin network porosity and thus facilitate fibrinolysis. **Thrombosis and haemostasis**, v. 103, n. 5, p. 1076-1084, 2010.

HEINEMANN, S.; EHRLICH, H.; DOUGLAS, T.; HEINEMANN, C.; WORCH, H.; SCHATTON, W.; HANKE, T. Ultrastructural studies on the collagen of the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 11, p. 3452-3457, 2007.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H.; SIMÕES, C. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 5, p. 765-792, 2004.

HILGERT, N.I. Plants used in home medicine in the Zenta River basin, Northwest Argentina. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 11-34, 2001.

HORINOUCI, C. D. S **Atividade anti-inflamatória tópica de *Vochysia bifalcata* warm: Potencial terapêutico para uma espécie de reflorestamento.** Tese e doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2013.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J.; MENSAH, A. Y.; HENSEL, A.; DETERS, A. M. *In vitro* tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 100-107, 2005.

HOULT, J. R. S.; PAYA, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

HOYER, B.; BERNHARDT, A.; LODE, A.; HEINEMANN, S.; SEWING, J.; KLINGER, M.; GELINSKY, M. Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 883-892, 2014.

HSU, A.; MUSTOE, T. A. The principles of wound healing. **Plastic Surgery Secrets Plus**, cap.1, p. 3-7, 2010.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; KUMAR, P. S.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 3, p. 322-337, 2011.

JOHN-AFRICA, L. B.; YAHAYA, T. A.; ISIMI, C. Y. Anti-ulcer and wound healing activities of *Sida corymbosa* in rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 11, n. 1, p. 87-92, 2013.

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

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, **Histologia básica - texto e atlas**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.

KEHE, K.; ABEND, M.; RIDI, R.; PETER, R. U.; VAN BEUNINGEN, D. Tissue engineering with HaCaT cells and a fibroblast cell line. **Archives of dermatological research**, v. 291, n.11, p. 600-605, 1999.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. **Histologia e biologia celular- Uma Introdução à Patologia**. Elsevier, Brasil, 2012.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. D. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2010.

KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic science international**, v. 203, n. 1, p. 93-98, 2010.

KORKINA, L.; KOSTYUK, V.; DE LUCA, C.; PASTORE, S. Plant phenylpropanoids as emerging anti-inflammatory agents. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v.11, n. 10, p. 823-835, 2012.

KÜPELI, E.; YESILADA, E. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, n.3, p.524-530, 2007.

KWAN, K. H.; LIU, X.; TO, M. K.; YEUNG, K. W.; HO, C. M.; WONG, K. K. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing. **Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 4, p. 497-504, 2011.

LABUCKAS, D. O.; MAESTRI, D. M.; GROSSO, N. R.; ZYGADLO, J. A. Essential oils of *Achyrocline satureioides*, *Achyrocline alata* and *Achyrocline tomentosa*. **Planta medica**, v. 65, n. 2, p. 184-186, 1999.

LAMATY, G.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M.; SCHENKEL, E. P.; DOS SANTOS, M. A.; BASSANI, V. The chemical composition of some *Achyrocline satureioides* and *Achyrocline alata* oils from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 3, n. 5, p. 317-321, 1999.

LAMME, E. N.; VAN LEEUWEN, R. T.; BRANDSMA, K.; VAN MARLE, J.; MIDDELKOOP, E. Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. **The Journal of pathology**, v. 190, n. 5, p. 595-603, 2000.

LARSON, BARRETT J.; LONGAKER, MICHAEL T.; LORENZ, H. P. Scarless fetal wound healing: a basic science review. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 126, n. 4, p. 1172, 2010.

LAU, K. M.; LAI, K. K.; LIU, C. L.; TAM, J. C. W.; TO, M. H.; KWOK, H. F.; POON, S. K. S. Synergistic interaction between Astragali Radix and Rehmanniae Radix in a Chinese herbal formula to promote diabetic wound healing. **Journal of ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 250-256, 2012.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Cicatrização de feridas. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**, v. 69, n. 3, p. 355-367, 2011.

LAZIC, T.; FALANGA, V. Bioengineered skin constructs and their use in wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 127, p. 75S-90S, 2011.

LI, K.; DIAO, Y.; ZHANG, H.; WANG, S.; ZHANG, Z.; YU, B.; YANG, H. Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula Fructus* Retz promote cutaneous wound healing in rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 86, 2011.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

LOEUILLE, B.; MITTELSTAEDT, C. A.; SEMIR, J.; PIRANI, J. R. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Compositae-Gnaphalieae e Inuleae. **Boletim de Botânica**, v. 31, n. 1, p. 13-25, 2013.

LOPEZ, P. G.; FERRARO, G. E.; BROUSSALIS, A. M. Determinación del contenido de derivados cafeilquínicos en especies sudamericanas del género *Achyrocline*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n.4, p. 571-573, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil - Nativas e exóticas**. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MANTENA, S. K.; MUTALIK, S.; SRINIVASA, H.; SUBRAMANIAN, G. S.; PRABHAKAR, K. R.; REDDY, K. R.; UNNIKRIISHNAN, M. K. Antiallergic, antipyretic, hypoglycemic and hepatoprotective effects of aqueous extract of *Coronopus didymus* Linn. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 3, p. 468-472, 2005.

MAQUART, F. X.; MONBOISSE, J. C. Extracellular matrix and wound healing. **Pathologie Biologie**, v.22, n.1, p.1-15, 2014.

MASSON, D. S. **Atividades cicatrizante e antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em úlceras cutâneas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2011.

MAVER, T.; MAVER, U.; STANA, K.K.; SMRKE, D. M.; KREFT, S. A review of herbal medicines in wound healing. **International journal of dermatology**, v.54, n. 7, p.740-757, 2015.

MEKONNEN, A.; SIDAMO, T.; ASRES, K.; ENGIDAWORK, E. *In vivo* wound healing activity and phytochemical screening of the crude extract and various fractions of *Kalanchoe petitiiana* A. Rich (Crassulaceae) leaves in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, n. 2, p. 638-646, 2013.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MOGHBEL, A.; GHALAMBOR, A.; ALLIPANAH, S. Wound healing and toxicity evaluation of *Aloe vera* cream on outpatients with second degree burns. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 157-160, 2007.

MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 13, p. 4894-4897, 1988.

MORIMOTO, N.; TAKEMOTO, S.; KAWAZOE, T.; SUZUKI S. Nicotine at a low concentration promotes wound healing. **Journal of Surgical Research**, v. 145, n. 2, p. 199-204, 2008.

MUHAMMAD, A. A.; PAUZI, N. A. S.; ARULSELVAN, P.; ABAS, F.; FAKURAZI, S. *In vitro* wound healing potential and identification of bioactive compounds from *Moringa oleifera* Lam. **BioMed research international**, v. 2013, p.1-10, 2013.

MULLER, J. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antinociceptiva das folhas da *Luehea divaricata* Martius**. Tese de Doutorado. MSc Thesis in Pharmacy, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

MURAKAMI, K.; AOKI, H.; NAKAMURA, S.; NAKAMURA, S. I.; TAKIKAWA, M.; HANZAWA, M.; ISHIHARA, M. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. **Biomaterials**, v. 31, n. 1, p. 83-90, 2010.

MURPHY, P. S.; EVANS, G. R. D. Advances in wound healing: a review of current wound healing products. **Plastic surgery international**, v. 2012, p.1-8, 2012.

MUSONDA, C. A.; CHIPMAN, J. K. Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced NF-kappaB DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 9, p. 1583-1589, 1998.

MUSSURY, R. M.; BETONI, R., VIEIRA, M. C.; SCALON, S. D. P. Q.; BARROS, S. Morfo-anatomia do eixo vegetativo aéreo de *Achyrocline alata* (Kunth) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 94-101, 2007.

NAYAK, B. S.; KANHAI, J.; MILNE, D. M.; PEREIRA, L. P.; SWANSTON, W. H. Experimental evaluation of ethanolic extract of *Carapa guianensis* L. leaf for its wound healing activity using three wound models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

NAYAK S. B.; RODRIGUES, V.; MAHARAJ, S.; BHOGADI, V.S. Wound healing activity of the fruit skin of *Punica granatum*. **Journal of medicinal food**, v. 16, n. 9, p. 857-861, 2013.

NESTEROVA, Y. V.; POVETIEVA, T. N.; SUSLOV, N. I.; ZHDANOV, V. V.; HRICHKOVA, T. Y.; UDUT, E. V.; DYGAJ, A. M. Regeneratory characteristics of complex extract and isolated diterpene alkaloids of *Aconitum baikalense*. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 152, n. 4, p. 439-443, 2012.

NG, M. F.Y. The role of mast cells in wound healing. **International wound journal**, v. 7, n. 1, p. 55-561, 2010.

NIZAMUTDINOVA, I. T.; KIM, Y. M.; CHUNG, J. I.; SHIN, S. C.; JEONG, Y. K.; SEO, H. G.; KIM, H. J. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. **Food and chemical toxicology**, v. 47, n. 11, p. 2806-2812, 2009.

NUNES, G. P.; SILVA, M. D.; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J. D. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 83-92, 2003.

OBERRINGER, M.; MEINS, C.; BUBEL, M.; POHLEMANN, T. A new *in vitro* wound model based on the co-culture of human dermal microvascular endothelial cells and human dermal fibroblasts. **Biology of the Cell**, v. 99, n. 4, p. 197-207, 2007.

OLIVEIRA, B. G. R. B.; ERDMANN, A. L.; FULY, P. D. S. C.; DE OLIVEIRA, A. P.; RODRIGUES, A. L. S. Wound care research groups registered in Brazil: a transversal study. **Online Brazilian Journal of Nursing**, v. 12, n. 2, p. 307-18, 2013.

OLIVEIRA, S. G. D., DE MOURA, F. R. R., DEMARCO, F. F., DA SILVA NASCENTE, P., DEL PINO, F. A. B.; LUND, R. G. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal of ethnopharmacology**, v.140, n. 2, p. 428-437, 2012.

ORYAN, A.; NAEINI, A. T.; NIKAHVAL, B.; GORJIAN, E. Effect of aqueous extract of *Aloe vera* on experimental cutaneous wound healing in rat. **Veterinarski arhiv**, v. 80, n. 4, p. 509-522, 2010.

OZTÜRK, N.; KORKMAZ, S.; OZTÜRK, Y. Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 33-39, 2007.

OZTÜRK, N.; KORKMAZ, S.; OZTÜRK, Y.; BAŞER, K. H. Effects of gentiopicroside, sweroside and swertiamarine, secoiridoids from gentian (*Gentiana lutea* ssp. *symphyandra*), on cultured chicken embryonic fibroblasts. **Planta medica**, v. 72, n. 4, p. 289-294, 2006.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007.

PAGANELA, J. C.; RIBAS, L. M.; SANTOS, C. A.; FEIJÓ, L. S.; NOGUEIRA, C. E.; FERNANDES, C. G. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 104, p. 569-72, 2009.

PAGANO, M. C.; MARIA, S. M. Effect of phosphorus fertilization on arbuscular mycorrhizal colonization of *Zeyheria tuberculosa* a native species in Brazil's forest. **Middle-East J Sci Res**, v. 6, n. 6, p. 604-611, 2010.

PAN, Z.; DING, J. Poly (lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. **Interface focus**, v. 2, n. 3, p. 366-377, 2012.

PARENTE, L.M.; ANDRADE, M. A.; BRITO, L. A.; MOURA, V. M.; MIGUEL, M. P.; LINO-JUNIOR, R. S.; TRESVENZOL, L. F. M.; DE PAULA, J. R.; PAULO, N. M. Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 19-24, 2011.

PARENTE, L. M.; LINO JUNIOR, R. S.; TRESVENZOL, L. M.; VINAUD, M. C.; DE PAULA, JR.; PAULO, N. M. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p.1-7, 2012.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M.; VON POSER, G. L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 19, p. 140-149, 2009.

PASTAR, I.; STOJADINOVIC, O.; YIN, N. C.; RAMIREZ, H., NUSBAUM, A. G.; SAWAYA, A.; TOMIC-CANIC, M. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. **Advances in wound care**, v. 3, n. 7, p. 445-464, 2014.

PAZYAR, N.; YAGHOOBI, R.; RAFIEE, E.; MEHRABIAN, A.; FEILY A. Skin wound healing and phytomedicine: a review. **Skin Pharmacol Physiol**. v.27, n.6, p.303-310, 2014.

PEACOCK JR., E. E. **The wound repair**. Philadelphia: W B Saunders, p. 76-85, 1984.

PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. E.; REHDER, V. L.; CARVALHO, J. C. Effect of *Artemisia annua* L. leaves essential oil and ethanol extract on behavioral assays. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 686-689, 2008.

PEREIRA, L. X. **Análises morfológicas de lesões de pele de camundongos submetidos ao tratamento com extratos vegetais e plaquetas de descarte**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

PEREIRA, R. F.; BARRIAS, C. C.; GRANJA, P. L.; BARTOLO, P. J Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. **Nanomedicine**, v. 8, n. 4, p. 603-621, 2013.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Jornal de Biotecnologia e Biodiversidade** v. 3, n. 4, 2012.

PHAN, T. T.; WANG, L.; SEE, P.; GRAYER, R. J.; CHAN, S. Y.; LEE, S. T. Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: implication for cutaneous wound healing. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 12, p. 1373-1379, 2001.

PIETRA, D.; BORGHINI, A.; BIANUCCI, A. M. *In vitro* studies of antifibrotic and cytoprotective effects elicited by proto-berberine alkaloids in human dermal fibroblasts. **Pharmacological Reports**, 2015.

PIRIZ, M. A.; LIMA, C. A. B.; JARDIM, V. M. R.; MESQUITA, M. K.; SOUZA, A. D. Z.; HECK, R. M. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16, n.3, p. 628-636, 2014.

POLYDORO, M.; DE SOUZA, K. C. B.; ANDRADES, M. E.; DA SILVA, E. G., BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life sciences**, v. 74, n. 23, p. 2815-2826, 2004.

PONNUSAMY, Y.; CHEAR, N. J. Y.; RAMANATHAN, S.; LAI, C. S. Polyphenols rich fraction of *Dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation *in vitro*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 168, p. 305-314, 2015.

PRISACARU A. I.; ANDRIȚOIU C. V.; ANDRIESCU, C.; HĂVÂRNEANU, E. C.; POPA, M.; MOTOC, A. G. M.; SAVA, A. Evaluation of the wound-healing effect of a novel *Hypericum perforatum* ointment in skin injury. **Rom J Morphol Embryol**, v. 54, n. 4, p. 1053-9, 2013.

RAMIRES, H.; PATEL, S. B.; PASTAR, I. The Role of TGF $\beta$  Signaling in Wound Epithelialization. **Advances in wound care**, v. 3, n. 7, p. 482-491, 2014.

RAMOS, S. M.; FERREIRA, A.F.; BIBAS, R.; CARNEIRO, S. Clinical evaluation of fluid extract of *Chamomilla recutita* for oral aphthae. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 5, n. 7, p. 612-617, 2005.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

RATZ-LYKO, A.; ARCT, J.; MAJEWSKI, S.; PYTKOWSKA, K. Influence of Polyphenols on the Physiological Processes in the Skin. **Phytotherapy Research**, v. 29, n.4, p. 509-517, 2015.

RAWAT, S.; SINGH, R.; THAKUR, P.; KAUR, S.; SEMWAL, A. Wound healing agents from medicinal plants: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1910-S1917, 2012.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

RIVEIRO, M. E.; DE KIMPE, N.; MOGLIONI, A.; VAZQUEZ, R.; MONCZOR, F.; SHAYO, C.; DAVIO, C. Coumarins: old compounds with novel promising therapeutic perspectives. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 13, p. 1325-1338, 2010.

RIVERA, F.; GERVAZ, E.; SERE, C.; DAJAS, F. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela). **Journal of ethnopharmacology**, v.95, n.2, p. 359-362, 2004.

ROBBINS; COTRAN. **Patologia: Bases patológicas das doenças**. 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 79-107, 2010.

ROCHA, F. A. G.; ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. O uso terapêutico da flora na história mundial. **HOLOS**, v. 1, p. 49-61, 2015.

RODERO, M. P.; KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 3, n. 7, p. 643-653, 2010.

RODRIGUES, L. S.; MARTINS, L. D. V.; BANTIM FELICIO, C. I.; MEIRELES DE DEUS, M. D. S.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A. P. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

RODRIGUES, R. A.; QUEIROGA, C. L.; RODRIGUES, M. V.; FOGGIO, M. A.; SARTORATTO, A.; MONTANARI, JR. Study of the variation of the composition of the essential oil of leaves and flowers of *Achyrocline alata* (DC) along a period of the day. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 4, p. 280-281, 2002.

ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. **Natural product extraction: principles and applications**. Royal Society of Chemistry, 2013.

ROY, P; AMDEKAR S; KUMAR, A; SINGH R; SHARMA, P; SINGH V. *In vivo* antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **Journal of ethnopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 186-192, 2012.

SABINI, M. C.; CARIDDI, L. N.; ESCOBAR, F. M.; MAÑAS, F.; COMINI, L., REINOSO, E.; ZANON, S. M. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Food and chemical toxicology**, v. 60, p. 463-470, 2013.

SABINO, F.; AUF DEM KELLER, U. Matrix metalloproteinases in impaired wound healing. **Metalloproteinases in Medicine**, v. 2, p. 1-8, 2015.

SACHIN, J.; NEETESH, J.; TIWARI, A.; BALEKAR, N.; JAIN, D. K. Simple evaluation of wound healing activity of polyherbal formulation of roots of *Ageratum conyzoides* Linn. **Asian Journal of Research in Chemistry (AJRC)**, v. 2, n. 2, p. 135-138, 2009.

SALMAH, I.; MAHMOOD, A. A.; SIDIK, K. Synergistic effects of alcoholic extract of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves and honey on cutaneous wound healing in rats. **Int. J. Mol. Med. Adv. Sci**, v. 1, n. 3, p. 220-224, 2005.

SANTOS, J. A. A.; SOUSA, M. F. A. M.; SILVA, E. L. V; AGUIAR JÚNIOR, F. C. A. Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n. 3, supl. 1, p. 637-643, 2014.

SCHAUBER, J.; GALLO, R. L. Expanding the roles of antimicrobial peptides in skin: alarming and arming keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 510-512, 2007.

SCHMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; ZANETTI, G. D.; HEINZMANN, B. M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 523-532, 2009.

SCHMIDT, C. A.; MURILLO, R.; BRUHN, T.; BRINGMANN, G.; GOETTERT, M.; HEINZMANN, B.; MERFORT, I. Catechin derivatives from *Parapiptadenia rigida* with *in vitro* wound-healing properties. **Journal of natural Products**, v. 73, n. 12, p. 2035-2041, 2010.

SCHREML, S.; SZEIMIES, R. M.; PRANTL, L.; LANDTHALER, M.; BABILAS, P. Wound healing in the 21st century. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 5, p. 866-881, 2010.

SCHULTZ, G. S.; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. **Wound repair and regeneration**, v. 17, n. 2, p. 153-162, 2009.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; DAUER, A.; AURA, A. M.; SAURA-CALIXTO, F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular nutrition & food research**, v. 53, n. S2, p. S310-S329, 2009.

SEVIMLI-GÜR, C.; ONBAŞILAR, İ.; ATILLA, P.; GENÇ, R.; ÇAKAR, N.; DELILOĞLU-GÜRHAN, İ.; BEDİR, E. *In vitro* growth stimulatory and *in vivo* wound healing studies on cycloartane-type saponins of *Astragalus* genus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 844-850, 2011.

SHAW, T. J.; MARTIN, P. Wound repair at a glance. **Journal of cell science**, v. 122, n. 18, p. 3209-3213, 2009.

SHIOTA, N.; NISHIKORI, Y.; KAKIZOE, E.; SHIMOURA, K.; NIIBAYASHI, T.; SHIMBORI, C.; OKUNISHI, H. Pathophysiological role of skin mast cells in wound healing after scald injury: study with mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice. **International archives of allergy and immunology**, v. 151, n. 1, p. 80-88, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae. **Journal of ethnopharmacology**, v.22, n.3, p. 281-293, 1988.

SINGH, S. D.; KRISHNA, V.; MANKANI, K. L.; MANJUNATHA, B. K.; VIDYA, S. M.; MANOHARA, Y. N. Wound healing activity of the leaf extracts and deoxyelephantopin isolated from *Elephantopus scaber* Linn. **Indian journal of pharmacology**, v. 37, n. 4, p. 238, 2005.

SONG, H. S.; PARK, T. W.; SOHN, U. D.; SHIN, Y. K.; CHOI, B. C.; KIM, C. J.; SIM, S. The effect of caffeic acid on wound healing in skin-incised mice. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 12, n. 6, p. 343-347, 2008.

SOTTILE, J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Reviews on Cancer**, v. 1654, n. 1, p. 13-22, 2004.

SOUTO, A. L.; TAVARES, J. F.; DA SILVA, M. S.; DINIZ, M. D. F. F. M.; DE ATHAYDE-FILHO, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Anti-inflammatory activity of alkaloids: An update from 2000 to 2010. **Molecules**, v. 16, n. 10, p. 8515-8534, 2011.

SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C extracts by oral route. **Phytomedicine**, v. 14, n. 2, p. 102-108, 2007.

SPARG, S.G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of ethnopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 219-243, 2004.

SRIVASTAVA, J. K.; PANDEY, M.; GUPTA, S. Chamomile, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. **Life sciences**, v. 85, n. 19, p. 663-669, 2009.

SUDSAI, T.; WATTANAPIROMSAKUL, C.; NAKPHENG, T.; TEWTRAKUL, S. Evaluation of the wound healing property of *Boesenbergia longiflora* rhizomes. **Journal of ethnopharmacology**, v.150, n. 1, p. 223-231, 2013.

SÜNTAR, I. P.; AKKOL, E. K.; YILMAZER, D.; BAYKAL, T.; KIRMIZIBEKMEZ, H.; ALPER, M.; YESILADA, E. Investigations on the *in vivo* wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 468-477, 2010a.

SÜNTAR, I. P.; AKKOL, E. K.; YALÇIN, F. N.; KOCA, U.; KELEŞ, H.; YESILADA, E. Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. **Journal of ethnopharmacology**, v.129, n.1, p.106-114, 2010 b.

TADOKORO, S.; IDE, S.; TOKUYAMA, R.; UMEKI, H.; TATEHARA, S.; KATAOKA, S.; SATOMURA, K. Leptin promotes wound healing in the skin. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0121242, 2015.

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

TEWTRAKUL, S.; TUNGCHAROEN, P.; SUDSAI, T.; KARALAI, C.; PONGLIMANONT, C.; YODSAOUE, O. Antiinflammatory and Wound Healing Effects of *Caesalpinia sappan* L. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 6, p. 850-856, 2015.

THAKUR, R.; JAIN, N.; PATHAK, R.; SANDHU, S. S. Practices in wound healing studies of plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p.1-17, 2011.

THOMÉ, R. G.; DOS SANTOS, H. B.; DOS SANTOS, F. V.; DA SILVA, O. R. J.; DE CAMARGOS, L. F.; PEREIRA, M. N.; RIBEIRO, R. I. M. A. Evaluation of healing wound and genotoxicity potentials from extracts hydroalcoholic of *Plantago major* and *Siparuna guianensis*. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 12, p. 1379-1386, 2012.

TILLMANN, M. T.; FELIX, S. R.; MUNDSTOK, C. P.; MUCILLO, G. B.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, M. O. Tratamento e manejo de feridas cutâneas em cães e gatos (revisão de literatura). **Nosso Clínico**, n. 103, p. 12-19, 2015.

TOFFOLI-KADRI, M. C.; CAROLLO, C. A.; LOURENÇO, L. D.; FELIPE, J. L.; NÉSPOLI, J. H. B.; WOLFF, L. G. C.; DE SIQUEIRA, J. M. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory properties of *Achyrocline alata* (Kunth) DC. **Journal of ethnopharmacology**, v. 153, n. 2, p. 461-468, 2014.

TOKUMARU, S.; SAYAMA, K.; SHIRAKATA, Y.; KOMATSUZAWA, H.; OUHARA, K.; HANAKAWA, Y.; HASHIMOTO, K. Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 7, p. 4662-4668, 2005.

TROMBETTA, D.; PUGLIA, C.; PERRI, D.; LICATA, A.; PERGOLIZZI, S.; LAURIANO, E. R.; BONINA, F. P. Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat. **Phytomedicine**, v. 13, n. 5, p. 352-358, 2006.

TSALA, D. E.; AMADOU, D.; HABTEMARIAM, S. Natural wound healing and bioactive natural products. **Phytopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 532-60, 2013.

TSURUYA, M.; NIWANO, Y.; NAKAMURA, K.; KANNO, T.; NAKASHIMA, T.; EGUSA, H.; SASAKI, K. Acceleration of proliferative response of mouse fibroblasts by short-time pretreatment with polyphenols. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.174, n.6, p. 2223-2235, 2014.

VALENTE, F. S. **Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

VAN PUYVELDE, L.; DE KIMPE, N.; COSTA, J.; MUNYJABO, V.; NYIRANKULIZA, S.; HAKIZAMUNGU, E.; SCHAMP, N. Isolation of flavonoids and a chalcone from *Helichrysum odoratissimum* and synthesis of helichrysetin. **Journal of natural products**, 52(3), 629-633, 1989.

VARGAS, V. M. F.; GUIDOBONO, R. R.; HENRIQUES, J. A P. Genotoxicity of plant extracts. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 67-70, 1991.

VASCONCELOS, A.; CAVACO-PAULO, A. Wound dressings for a proteolytic-rich environment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 2, p. 445-460, 2011.

VAZ, C. R. **Avaliação do potencial biológico de extratos de espécies de Asteraceae**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **Journal of International Medical Research**, v. 37, n. 5, p. 1528-1542, 2009.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. **Surgery (Oxford)**, v. 29, n. 10, p. 471-474, 2011.

VIEIRA, A. P.; DOS SANTOS, N. R.; BORGES, J. H. S.; VINCENZI, M. P. A.; SCHMITZ, W. O. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 65-74, 2008.

VILLEGAS, L. F.; MARÇALO, A.; MARTIN, J.; FERNÁNDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Epi- $\alpha$ -Bisbolol is the Wound-Healing Principle of *Peperomia galioides*: Investigation of the *in Vivo* Wound-Healing Activity of Related Terpenoids. **Journal of natural products**, v. 64, n. 10, p. 1357-1359, 2001.

VINCKEN, J. P., HENG, L.; DE GROOT, A.; GRUPPEN, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 68, n. 3, p. 275-297, 2007.

VIOLANTE, I. M.; SOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F.; SANTOS, R. A.; FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 452-457, 2009.

VITURI, C. L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G.; BORELLI, P. Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir proliferação de células mielóides *in vitro* no modelo de desnutrição protéica em camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v. 44, n. 3, 2008.

VOLPE, A. V. T.; ALBIERO, A. L. M.; MOURÃO, K. S. M.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. Farmacobotânica das partes aéreas de *Achyrocline alata* DC (Asteraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, p. 505-511, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2ª edição. Springer Science e Business Media, 1996.

WALTER, M. N. M.; WRIGHT, K. T.; FULLER, H. R.; MACNEIL, S.; JOHNSON, W. E. B. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an *in vitro* study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. **Experimental cell research**, v. 316, n. 7, p. 1271-1281, 2010.

WELLER, K.; FOITZIK, K.; PAUS, R.; SYSKA, W.; MAURER, M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. **The FASEB journal**, v. 20, n. 13, p. 2366-2368, 2006.

WILLIAMSON, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 401-409, 2001.

WONG, V. W.; SORKIN, M.; GLOTZBACH, J. P.; LONGAKER, M. T.; GURTNER, G. C. Surgical Approaches to Create Murine Models of Human Wound Healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.

WOODLEY, D. T., WYSONG, A., DECLERCK, B., CHEN, M., & LI, W. Keratinocyte Migration and a Hypothetical New Role for Extracellular Heat Shock Protein 90 Alpha in Orchestrating Skin Wound Healing. **Advances in wound care**, v. 4, n. 4, p. 203-212, 2015.

WU, S. C.; MARSTON, W.; ARMSTRONG, D. G. Wound care: the role of advanced wound healing technologies. **Journal of vascular surgery**, v. 52, n. 3, p. 59S-66S, 2010.

WU, L.; WANG, X.; XU, W.; FARZANEH, F.; XU, R. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 32, p. 4236-4260, 2009.

WULFF, B. C.; WILGUS, T. A. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? **Experimental dermatology**, v. 22, n. 8, p. 507-510, 2013.

YENDO, A. C.; DE COSTA, F.; GOSMANN, G.; FETT-NETO, A. G. Production of plant bioactive triterpenoid saponins: elicitation strategies and target genes to improve yields. **Molecular biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 94-104, 2010.

ZAPATA, B.; DURAN, C.; STASHENKO, E.; BETANCUR-GALVIS, L.; MESA-ARANGO, A. C. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 101-103, 2010.

ZIPPEL, J.; DETERS, A.; HENSEL, A. Arabinogalactans from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret bark as active principles for wound-healing properties: Specific enhancement of dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 391-396, 2009.

ZUBAIR, M.; EKHOLM, A.; NYBOM, H.; RENVERT, S.; WIDEN, C.; RUMPUNEN, K. Effects of *Plantago major* L. leaf extracts on oral epithelial cells in a scratch assay. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, n.3, p. 825-830, 2012.

## 9.0. ANEXOS

### 9.1. ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



---

Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSJ – CEUA/UFSJ

#### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação 023/2014 “Avaliação dos extratos vegetais e sua ação cicatrizante em feridas induzidas em Camundongos” coordenado pela Prof.<sup>a</sup> Rosy Lara Maciel de A. Ribeiro – CCO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, dispostos na Lei Federal nº 11.794, de 08.10.2008 e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UFSJ em reunião do dia 27 de fevereiro de 2015.

São João del-Rei, 27 de fevereiro de 2015.

*Leila de Genova Gaya*

**Prof.<sup>a</sup> Leila de Genova Gaya**  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA-UFSJ

## 9.2. ANEXO B

Perfil cromatográfico antes da revelação do extrato bruto, partições de *A. alata* e alguns compostos-padrão. Extrato bruto de *A. alata* (1), partição hexânica (2), partição clorofórmica (3), acetato de etila (4), partição hidroalcoólica (5); compostos-padrão: ácido clorogênico (6), quercetina (7), rutina (8), chalcona (9). Eluentes: AchOEt:AcOH:H<sub>2</sub>O (100:14, 4 :10).



### 9.3. ANEXO C

Perfil cromatográfico antes da revelação do extrato bruto, partições de *A. alata* e alguns compostos-padrão. Extrato bruto (1), partição hidroalcoólica (2), partição hexânica (3), partição clorofórmica (4), acetato de etila (5), gnafalina (6), chalcona (7), rutina (8). Eluentes:AcOEt:ACOH.H<sub>2</sub>O (100:10:10).

