

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

Elisângela Elduina Ferreira

**Efeitos do uso de extrato etanólico e da fração hidroetanólica do fruto maduro de
Solanum lycocarpum no processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos**

São João del-Rei, Minas Gerais

Agosto de 2022

Elisângela Elduina Ferreira

Efeitos do uso de extrato etanólico e da fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* no processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, da Universidade Federal de São João Del-Rei, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Prof(a). Dra. Flávia Carmo Horta
Pinto

Co-orientadora: Prof(a). Dra. Luciana Alves
Rodrigues dos Santos Lima

São João del-Rei, Minas Gerais

Agosto de 2022

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Naturais, no Laboratório de Microscopia, Laboratório de Esterilização, Laboratório de Cardiofisiologia e Biologia Molecular e Laboratório de Patologia Experimental, no *Campus* Dom Bosco, da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), em São João del-Rei, Minas Gerais, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

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)

F43e Ferreira, Elisângela Elduina.
 Efeitos do uso de extrato etanólico e da fração
 hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum*
 no processo de cicatrização de feridas cutâneas em
 camundongos / Elisângela Elduina Ferreira ;
 orientadora Flávia Carmo Horta Pinto; coorientadora
 Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima. -- São
 João del-Rei, 2022.
 89 p.

 Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
 Ciências Morfofuncionais) -- Universidade Federal de
 São João del-Rei, 2022.

 1. Cicatrização de feridas. 2. Plantas medicinais.
 3. *Solanum*. I. Pinto, Flávia Carmo Horta , orient.
 II. Lima, Luciana Alves Rodrigues dos Santos , co
 orient. III. Título.



Universidade Federal
de São João del-Rei



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL - REI / UFSJ
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - M.Sc.

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA CONCESSÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

Aos 22 dias do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e dois, às 14h, pela plataforma Google Meet (<https://meet.google.com/uvf-ovjr-ebt>), foi instalada a banca examinadora de dissertação de mestrado da discente **Elisângela Elduina Ferreira**. A banca examinadora foi composta pela professora Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal, (UFMG), examinadora externo, pelo professor Dr. Paulo Henrique Almeida Campos-Júnior (UFSJ), examinador interno, pela professora Dra. Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima (UFSJ), coorientadora, e pela professora Dra. Flávia Carmo Horta Pinto. A professora Dra. Flávia Carmo Horta Pinto, Presidente da Banca, fez a abertura dos trabalhos e, após apresentar os membros da banca examinadora e esclarecer a tramitação da defesa, solicitou à candidata que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada **"Efeitos do uso de extrato etanólico e da fração hidroetanólica do fruto maduro de Solanum lycocarpum no processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos"**, marcando um tempo de até sessenta minutos para a apresentação. Concluída a exposição, a Profa. Flávia Carmo Horta Pinto, presidente, passou a palavra à examinadora externa, Profa. Paula Vieira Teixeira Vidigal, para arguir a candidata, e, em seguida, ao examinador interno, Prof. Paulo Henrique Almeida Campos-Júnior, e à coorientadora, Profa. Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima, para que fizessem o mesmo. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, o resultado da avaliação da banca, conforme as normas vigentes na Universidade Federal de São João del-Rei, foi: APROVADA a defesa SEM a necessidade de alterações na dissertação. A versão final da dissertação, deverá ser entregue ao programa no prazo de 90 (noventa) dias, a contar a partir da data da defesa, contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora e constante na folha de correção anexa (Resolução Consu N° 062, de 07 de novembro de 2011, modificada pela Resolução CONSU N° 005, de 29 de fevereiro de 2016). A candidata não terá o título senão cumprir as exigências acima descritas.



Emitido em 22/08/2022

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 6/2022 - PPGCM (13.43)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 23/08/2022 09:02)

FLAVIA CARMO HORTA PINTO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DCNAT (12.12)

Matrícula: 1742558

(Assinado digitalmente em 23/08/2022 08:46)

LUCIANA ALVES RODRIGUES DOS SANTOS LIMA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

PPGBiotec (13.04)

Matrícula: 1540495

(Assinado digitalmente em 23/08/2022 10:20)

PAULO HENRIQUE DE ALMEIDA CAMPOS JUNIOR

COORDENADOR ADMINISTRATIVO - TITULAR

NUCAL (13.46)

Matrícula: 2141553

(Assinado digitalmente em 23/08/2022 09:29)

PAULA VIEIRA TEIXEIRA VIDIGAL

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 983.575.226-53

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/> informando seu número: **6**, ano: **2022**, tipo: **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**, data de emissão: **23/08/2022** e o código de verificação: **d31bd56a84**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à orientadora Prof (a). Dra. Flávia Carmo Horta Pinto por ter concedido a oportunidade de acompanhá-la e dar meus primeiros passos na ciência, desde as iniciações científicas na graduação até a defesa da minha dissertação, por me ensinar, guiar e apoiar durante esses anos. Gratidão professora! À co-orientadora Dra Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima, muito obrigada por todo apoio e colaboração no desenvolvimento desse trabalho e pela oportunidade de conhecer parte de seu trabalho. Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais por terem contribuído no meu desenvolvimento enquanto pesquisadora, ensinando e inspirando com suas aulas e pesquisas. E aqueles que colaboraram para que este trabalho pudesse ser desenvolvido, em especial aos coordenadores dos laboratórios que foram utilizados. Obrigada à professora Dra. Priscila Totarelli Monteforte por me acompanhar na qualificação e como professora avaliadora e contribuir com suas sugestões. À Universidade Federal de São João del-Rei pela oportunidade e acolhimento e à todos seus funcionários, em especial aos professores, técnicos e demais colaboradores do Departamento de Ciências Naturais e do curso de Ciências Biológicas por todo o suporte oferecido. Aos meus colegas de laboratório, Milena e Renan obrigada por todo suporte. E aos demais colaboradores com a pesquisa, obrigada pelo aprendizado e contribuição.

Aos meus pais: Pai, senhor Sebastião, eu não tenho palavras que possam expressar a minha gratidão por ser sua filha e para retribuir todo o seu esforço para que eu pudesse conseguir chegar até aqui. Peço a Deus que abençoe e te proteja, sou grata a sua vida. E mãe, Elduina, minha força, fortaleza e colo, obrigada por ser força, apoio, pela sua humildade e vida gratidão por tudo. Meu irmão Amauri, obrigada por ser também uma grande fonte de apoio, suporte e melhor amigo, gratidão a você e a Adriely por serem parte do amor mais genuíno que nossa família representa. Ao meu namorado, Lucas, gratidão por todo incentivo e estar ao meu lado apoiando nas minhas escolhas. Amo vocês. Aos amigos. Obrigada aqueles que torceram, comemoraram a conquista e estiveram comigo mesmo que distante nesse período, pelas palavras e atitudes que de alguma forma fizeram a diferença.

RESUMO

As espécies vegetais apresentam-se como uma rica fonte para a descoberta de princípios ativos e desenvolvimento de novas terapêuticas. A espécie *Solanum lycocarpum* A. St. -Hil apresenta efeitos antioxidantes, anti-inflamatório e antimicrobiano já confirmados em alguns modelos experimentais. Além disso, diversos fitoconstituintes presentes nos extratos utilizados foram encontrados em outras espécies do gênero, como alguns compostos fenólicos, relacionados aos efeitos de melhoria do processo de cura, com ações individuais ou sinérgicas sobre uma ou mais etapas da cicatrização de feridas. O projeto de pesquisa teve como objetivo analisar os efeitos do uso de extrato etanólico e da fração hidroetanólica do fruto maduro de *S. lycocarpum* no processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos. Setenta e dois animais foram distribuídos de forma aleatória em três grupos, sendo um Grupo Controle que recebeu aplicação tópica de solução salina fisiológica, um grupo tratado com extrato etanólico e um grupo tratado com a fração hidroetanólica do fruto maduro de *S. lycocarpum*. Cada grupo foi subdividido em quatro outros subgrupos conforme o período de tratamento: 1, 5, 7 e 21 dias, com n=6 em cada subgrupo. Para confecção das feridas excisionais foi utilizado um punch metálico dermatológico, com 7 mm de diâmetro. Foram feitas avaliações macroscópicas de cada lesão, diariamente, para verificar a presença de sinais inflamatórios (edema, hiperemia), presença de crostas e secreções, e para o cálculo da taxa de contração das feridas. Decorridos 1, 5, 7 ou 21 dias após a confecção da lesão excisional, os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésicos. Um fragmento contendo a ferida foi retirado, clivado e fixado em solução de formol a 10% neutro tamponado. Posteriormente, o material foi processado histologicamente e corado por métodos histológicos e histoquímicos, para avaliação histopatológica e morfométrica do infiltrado inflamatório, dos fibroblastos, da reepitelização e da deposição de colágeno, após tratamento tópico diário com extrato etanólico do fruto maduro de *S. lycocarpum* e da sua fração hidroetanólica. Os resultados mostram que macroscopicamente esses tratamentos não interferiram no fechamento das feridas excisionais, ao longo dos 21 dias. A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de *S. lycocarpum* e fração hidroetanólica reduziu o infiltrado inflamatório. O grupo tratado com extrato etanólico demonstrou melhor depósito de matriz e áreas de cicatriz menores.

Palavras-chave: Cicatrização de feridas, plantas medicinais, *Solanum*.

ABSTRACT

Plant species are a rich source for the discovery of active principles and the development of new therapies. The species *Solanum lycocarpum* A. St. -Hil has antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial effects already confirmed in some experimental models. In addition, several phytoconstituents present in the extracts used were found in other species of the genus, such as some phenolic compounds, related to the effects of improving the healing process, with individual or synergistic actions on one or more stages of wound healing. The research project aimed to analyze the effects of the use of ethanolic extract and the hydroethanolic fraction of the ripe fruit of *S. lycocarpum* on the healing process of skin wounds in mice. Seventy-two animals were randomly distributed into three groups, a Control Group that received topical application of physiological saline solution, a group treated with ethanol extract and a group treated with the hydroethanolic fraction of the mature fruit of *S. lycocarpum*. Each group was subdivided into four other subgroups according to the treatment period: 1, 5, 7 and 21 days, with n=6 in each subgroup. To make the excisional wounds, a metallic dermatological punch, 7 mm in diameter, was used. Macroscopic evaluations of each lesion were performed daily to check the presence of inflammatory signs (edema, hyperemia), presence of crusts and secretions, and to calculate the wound contraction rate. After 1, 5, 7 or 21 days after the excisional lesion was made, the animals were euthanized by a lethal dose of anesthetics. A fragment containing the wound was removed, cleaved and fixed in a 10% neutral buffered formalin solution. Subsequently, the material was histologically processed and stained by histological and histochemical methods, for histopathological and morphometric evaluation of the inflammatory infiltrate, fibroblasts, re-epithelialization and collagen deposition, after daily topical treatment with ethanolic extract of the mature fruit of *S. lycocarpum* and of its hydroethanolic fraction. The results show that macroscopically these treatments did not interfere with the closure of excisional wounds over the 21 days. Topical application of ethanolic extract from the ripe fruit of *S. lycocarpum* and hydroethanolic fraction reduced the inflammatory infiltrate. The group treated with ethanol extract showed better matrix deposition and smaller scar areas.

Keywords: Wound healing, medicinal plants, *Solanum*.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- CEUA-UFSJ – Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São João del-Rei
- cm – centímetro
- DAMPs- Padrão molecular associado a danos
- DP- células dérmicas da papila
- EESL – Extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum*
- FGF- fator de crescimento de fibroblastos
- FHSL – Fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum*
- H&E – Hematoxilina & Eosina
- MEC- Matriz extracelular
- mg – Miligrama
- mL – Mililitros
- mm² - Milímetro quadrado
- MSCs - células tronco mesenquimais
- NUCAL - Biotério Central do *Campus* Tancredo Neves da Universidade Federal de São João del-Rei
- PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PMN- polimorfonuclear
- SKPs- células progenitoras derivadas da pele
- SL- *Solanum lycocarpum* A. St. -Hil. (Solanaceae)
- TGF- β - Fator de crescimento transformante- β
- TNF- Fator de necrose tumoral
- UFSJ – Universidade Federal de São João del-Rei
- VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
- μ L – Microlitros
- μ m - Micrômetros
- μ m² - Micrômetros quadrados

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Solanum lycocarpum</i> e suas estruturas	18
Figura 2: Metodologia empregada pelo grupo de pesquisa para a confecção da lesão excisional	23
Figura 3: Procedimento de aplicação de soluções sobre a lesão	24
Figura 4: Protocolo experimental	24
Figura 5: Representação esquemática da disposição dos 10 campos para a contagem de vasos, leucócitos e fibroblastos nas lâminas coradas em H&E	27
Figura 6: Representação esquemática da disposição dos 15 campos para a contagem de mastócitos nas lâminas coradas por azul de Toluidina	27
Figura 7: O tratamento tópico com extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> e o tratamento com a fração hidroetanólica após 21 dias não interfere significativamente no fechamento de feridas excisionais em camundongos Swiss	31
Figura 8: Fotomicrografias das lesões após um dia de tratamento – coloração Hematoxilina e Eosina	33
Figura 9: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> ou da fração hidroetanólica do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> reduz o infiltrado de leucócitos após 1 dia	34
Figura 10: Fotomicrografias das lesões após cinco dias de tratamento – coloração Hematoxilina e Eosina	36
Figura 11: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> ou da fração hidroetanólica do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> reduz o infiltrado de leucócitos após 5 dias	37
Figura 12: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> e da fração hidroetanólica do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> não altera o número de novos vasos aos 5 dias	38
Figura 13: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> e da fração hidroetanólica do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> não altera o número de fibroblastos aos 5 dias	39
Figura 14: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> e da fração hidroetanólica do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> não altera o número de mastócitos aos 5 dias	40

Figura 15: Fotomicrografias das lesões após cinco dias de tratamento - coloração Azul de Toluidina	41
Figura 16: Fotomicrografias das lesões após sete dias de tratamento – coloração Hematoxilina e Eosina	43
Figura 17: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> reduz o infiltrado de leucócitos após 7 dias	44
Figura 18: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> e da fração hidroetanólica do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> não altera o número de novos vasos aos 7 dias	45
Figura 19: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> e da fração hidroetanólica do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> não altera o número de fibroblastos aos 7 dias	46
Figura 20: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> e da fração hidroetanólica do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> não altera o número de mastócitos aos 7 dias	47
Figura 21: Fotomicrografias das lesões após sete dias de tratamento - coloração Azul de Toluidina	48
Figura 22: Fotomicrografias das lesões após vinte e um dias de tratamento – coloração Hematoxilina e Eosina	50
Figura 23: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> e da fração hidroetanólica do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> não altera o número de fibroblastos aos 21 dias	51
Figura 24: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> e da fração hidroetanólica do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> altera a disposição de fibras e células aos 21 dias	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1 Morfologia da pele	1
1.2 Reparo de lesões cutâneas	
1.2.1 Etapas da cicatrização de feridas cutâneas	3
1.2.2 Principais células envolvidas no processo de cicatrização de feridas cutâneas	5
1.2.3 Fatores que podem interferir na dinâmica de cicatrização	7
1.3 Plantas Medicinais	11
1.3.1 Plantas medicinais e cicatrização de lesões cutâneas	12
1.4 O gênero <i>Solanum</i> e suas utilizações	14
1.4.1. <i>Solanum lycocarpum</i> A. St. -Hil. (Solanaceae)	15
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo Geral	20
3.2. Objetivos Específicos	20
4. MATERIAIS E MÉTODO	21
4.1. Animais	21
4.2. Obtenção do extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> e da sua fração hidroetanólica	21
4.3. Confecção da lesão excisional cutânea e aplicação tópica do extrato etanólico do fruto maduro de <i>Solanum lycocarpum</i> e da sua fração hidroetanólica	22
4.4. Avaliação macroscópica das lesões excisionais	25
4.5. Coleta e processamento das lesões excisionais	25
4.6. Avaliação histopatológica das lesões	26
4.7. Avaliação morfométrica dos leucócitos, vasos, mastócitos e fibroblastos nas lesões excisionais tratadas com EESL e FHSL.....	26
4.8. Análises estatísticas	28
5. RESULTADOS	29
5.1. Avaliação macroscópica da cicatrização de feridas	29
5.2. Avaliação histopatológica e morfométrica de leucócitos, vasos, fibroblastos e mastócitos	31

5.2.1. Avaliação histopatológica e morfométrica de leucócitos das lesões tratadas com EESL ou FHSL por 1 dia	32
5.2.2. Avaliação histopatológica e morfométrica de leucócitos, vasos sanguíneos, fibroblastos e mastócitos das lesões tratadas com EESL ou a FHSL por 5 dias	35
5.2.3 Avaliação histopatológica e morfométrica de leucócitos, vasos sanguíneos, fibroblastos e mastócitos das lesões tratadas com EESL ou FHSL por 7 dias	42
5.2.4. Avaliação histopatológica das lesões tratadas com EESL ou a FHSL por 21 dias	48
5.2. 5. Análise qualitativa da deposição de colágeno nas áreas das lesões após 21 dias de tratamento	51
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. Morfologia da Pele

A pele corresponde em torno de 15% do peso corporal de um adulto, podendo abranger uma área de 1,5 a 2 m², sendo um órgão importante na termorregulação e na proteção do organismo (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021). A pele fornece proteção ao corpo contra a radiação, xenobióticos, micro-organismos, injúrias e outros, para isso, seus componentes atuam como uma barreira física e química (PÉREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2018).

A pele estrutura-se em duas camadas: a epiderme e a derme que são conectadas ao tecido adjacente pela hipoderme ou tecido subcutâneo. A camada mais externa que comunica com o meio ambiente é a epiderme que é subdividida em camadas: a parte mais externa é o estrato córneo, constituído por células mortas também chamadas de corneócitos, seguido pela camada de tecido epitelial de revestimento estratificado pavimentoso queratinizado e abaixo do estrato, encontram-se queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans. Os queratinócitos são as células predominantes da epiderme, e, são responsáveis pela impermeabilização desta através da produção de queratina. Já os melanócitos estão presentes entre epiderme e derme e em folículos pilosos (MENON, 2002; SAHLE, *et al.*, 2015; PÉREZ-SÁNCHEZ, *et al.*, 2018).

Existe uma ampla variedade de melanócitos, que vão ocorrer não apenas na epiderme humana, em folículos pilosos, podendo existir também na mucosa, cóclea da orelha, íris do olho e mesencéfalo do cérebro, dentre outros tecidos, além disso, há certa heterogeneidade entre melanócitos presentes em camundongos sendo relatados tipos diferentes entre a derme e epiderme (AOKI *et al.*, 2009, YAMAGUCHI & HEARING, 2014). A diversidade de pigmentação de peles deve-se à melanina produzida por essas células e sua distribuição. A melanina é sintetizada nos melanossomas e confere fotoproteção da pele contra danos no DNA provocados, por exemplo, pela radiação ultravioleta (RACHMIN *et al.*, 2020).

Na camada basal da epiderme, encontram-se células basais proliferativas, responsáveis por se diferenciar nas células que constituirão camadas superiores após um processo chamado de delaminação. Forma-se ao longo desse processo, a camada espinhosa, a granular e o estrato córneo sucessivamente, ao longo desse trajeto as células sofrem modificações bioquímicas e morfológicas e formam nichos de escamas mortas, impermeáveis, que conferem a proteção do tecido contra micro-organismos e perda de água. A renovação constante de células do epitélio mantém a homeostase da epiderme. Em situações de dano, as células tronco presentes na

epiderme respondem auxiliando na recuperação tecidual, diferenciando-se em novas células e promovendo a reepitelização (BLANPLAIN & FUCHS, 2009; GONZALES & FUCHS, 2017).

Abaixo da epiderme, localiza-se a membrana basal, sobre a qual se encontram as células basais, que separa a epiderme da derme. Projeções da derme se encaixam em reentrâncias da epiderme, sendo essas projeções chamadas de papilas dérmicas com tecido conjuntivo mais frouxo e as reentrâncias chamadas de cristas epidérmicas, deste modo, é dito que a junção dessas duas camadas não é regular, mas fornece um ambiente mais coeso pela forma com que se estruturam (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). A integridade estrutural da epiderme, assim como a adesão entre as células, é mantida por associações entre o citoesqueleto e as junções intracelulares. Os queratinócitos, por exemplo, são mantidos aderidos sob a membrana basal e entre si por meio de integrinas e hemidesmossomos, estruturas que são responsáveis pela adesão dermo-epidérmica e também atuam como organizadoras da morfogênese dessas regiões (SIMPSON, PATEL & GREEN, 2011).

Os queratinócitos apresentam atividades que vão além da função de barreira física pelas suas características juncionais e impermeabilizantes. Podem atuar em processos inflamatórios (BARKER, 1991), ter atividades imunomoduladoras na pele, contribuindo possivelmente para a homeostase em situações de inflamação por meio de interações com linfócitos (SEIRINGER, *et al.*, 2021), atividades de apresentação de antígenos, liberação de moléculas antimicrobianas (PIIPPONEN & LANDÉN, 2020) ou ainda potencial atividade sob fibroblastos com os quais interagem e sofrem influências, sendo apontados com possíveis atuações sobre o processo fibrótico (RUSSO, BREMBILLA & CHIZZOLINI, 2020). Assim como as demais células da pele, os queratinócitos são reconhecidos pela infinidade de citocinas que produzem, atuando de modo a modular suas próprias atividades, proliferação, migração, ou como fontes de citocinas modulando outros eventos que podem ocorrer na pele como em situações de dano liberando interleucinas como a (IL)-1, -6, -8 e fator de necrose tumoral alfa –TNF- α . São evidenciadas nesse sentido como importantes na manutenção da homeostase epidérmica (GRÖNE, 2002).

A derme possui como componentes as fibras colágenas, fibras elásticas e vários tipos celulares como os fibroblastos, mastócitos, células dendríticas, histiócitos, a matriz desta região é capaz de conferir elasticidade e resistência à pele. Nela encontram-se os componentes do sistema vascular, nervoso e linfático (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2021) bem como glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos. A derme reticular é composta por

colágeno tipo I, proteoglicanos e fibras elásticas, que se organizam de maneira entrelaçada, formando o tecido conjuntivo denso, sendo a camada mais espessa abaixo da derme papilar (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

A camada mais interna abaixo da derme é chamada de hipoderme, tecido subcutâneo ou pânículo adiposo quando é depositado de modo mais intenso em certas regiões do corpo. Nesta camada, são encontradas células denominadas adipócitos, que são responsáveis pelo armazenamento de lipídios. A hipoderme é responsável pelo isolamento térmico do organismo, sendo uma reserva de lipídeos para a produção de hormônios, como os esteroides e na manutenção da homeostase tecidual produzindo, por exemplo, citocinas importantes na manutenção da pele. Além disso, o tecido conjuntivo frouxo que a forma une de modo pouco firme a estrutura da pele aos órgãos adjacentes (RIVERA-GONZALEZ, SHOOK & HORSLEY, 2014; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

1.2. Reparo de lesões cutâneas

1.2.1. Etapas da cicatrização de feridas cutâneas

Após lesões na pele ou em outros tecidos, uma série de eventos são desencadeados a fim de restaurar a estrutura, por meio de ações entre as células e seus subprodutos, inicialmente para impedir a perda de sangue e a entrada de micro-organismos no local da lesão, inicia-se a fase denominada de hemostasia. Para isso, ocorre a formação do tampão hemostático, com agregação plaquetária e ativação da cascata de coagulação para formação de uma matriz de fibrina de extrema importância, como um “suporte” para a migração de células leucocitárias (GURTNER, 2008). Mediadores inflamatórios e fatores de crescimento como o fator de crescimento transformante β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF) são liberados de células ao redor do dano, como as células presentes no tampão hemostático e as células epiteliais, estimulando o início da próxima fase que é a inflamatória (GEORGE BROUGHTON, JANIS & ATTINGER, 2006; MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009; GUO & DIPIETRO, 2010). Nesta fase, as citocinas, pró -inflamatórias são liberadas pelas células na margem da lesão, ativando as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, iniciando a migração dos leucócitos dos vasos sanguíneos para a área da lesão, processo chamado de diapedese (EMING, KRIEG & DAVIDSON, 2007).

Na fase inflamatória, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a chegarem ao local da ferida com a função de removerem possíveis patógenos ou partículas estranhas, estas células também secretam mediadores inflamatórios importantes para as demais fases (KIM *et al.*, 2008). Além disso, os neutrófilos produzem proteases e espécies reativas de oxigênio (ROS) que, em alguns casos, são danosos aos tecidos com a finalidade de neutralizar microorganismos (GUO & DIPIETRO, 2010). Mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 beta (IL-1 β), as espécies reativas de oxigênio (ROS), também têm a função de estimular a chegada de outras células na região de dano, como os macrófagos. Essas células são recrutadas para o local de dano em torno de 3 dias, com a função de fagocitarem os restos celulares, liberarem colagenases para o debridamento da ferida e liberarem citocinas para a ativação das células que vão participar das próximas fases, como os fibroblastos, as células epiteliais e os queratinócitos (GURTNER, 2008; RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010; GONZALES *et al.*, 2016).

A próxima etapa, a fase proliferativa, inicia-se por volta do segundo dia. As principais células que atuam são os macrófagos, os fibroblastos e as células endoteliais. Nessa fase, os queratinócitos em torno da ferida proliferam e migram para a área a ser recuperada onde amadurecem e restauram o epitélio. Os fibroblastos migram do tecido adjacente para o local da lesão e as células endoteliais são estimuladas, a partir de fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o TGF β e FGF (fator de crescimento de fibroblastos) para que ocorra o processo de angiogênese. Com a proliferação e estimulação dos fibroblastos ocorre síntese de colágeno e formação do tecido de granulação, que apresenta como característica um número elevado de células e vasos sanguíneos, sendo uma matriz provisória para que as células exerçam suas atividades. O colágeno tipo III passa a ser encontrado em maior concentração nessa etapa, pode ocorrer também à diferenciação de alguns fibroblastos em miofibroblastos também nessa fase, que atuam no fechamento da ferida (WERNER & GROSE, 2003; GEORGE BROUGHTON, JANIS & ATTINGER, 2006; GURTNER, 2008; VELNAR, BAILEY & SMRKOLJ, 2009).

Na última fase, fase de remodelamento, ocorre redução do número de células e da vascularização, e remodelamento da matriz, no qual as fibras de colágeno são sintetizadas, digeridas e ou reorganizadas. Iniciada por volta da segunda semana após o dano, essa etapa pode durar de meses a anos. Há nessa fase a substituição da matriz de colágeno tipo III, por colágeno tipo I, e apoptose das células envolvidas nas fases anteriores. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são as enzimas responsáveis por promover a degradação durante o

remodelamento da matriz, atuando principalmente sobre o colágeno e sendo secretadas por várias células como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (BEANES *et al.*, 2003; GURTNER, 2008; CRISTÓBAL *et al.*, 2019), enquanto inibidores teciduais de metaloproteinases como o TIMP-1 atuam de modo a equilibrar o processo da formação de cicatriz (VAALAMO *et al.*, 1996; MULLER *et al.*, 2008).

Diante disso, é possível perceber que uma série de eventos imunológicos e celulares estão envolvidos no processo de reparo. Interrupções ou ainda a hiperestimulação de uma das fases pode desencadear alterações, como a formação de cicatrizes hipertróficas ou o desencadeamento de uma ferida crônica matriz (ANDRADES, BENITEZ & PRADO, 2006, EMING, WYNN & MARTIN, 2017).

1.2.2. Principais Células envolvidas no processo de cicatrização de feridas cutâneas

Entre as células apontadas com papéis importantes para a realização do reparo tecidual temos, por exemplo, as diversas células-tronco, os macrófagos, os neutrófilos, os linfócitos, os fibroblastos, as células endoteliais e os mastócitos. Nesse processo são identificadas as fases de coagulação ou hemostasia e inflamação, proliferação e remodelamento, de modo estritamente coordenado para a inexistência de problemas (VELNAR, BAILEY & SMRKOLJ, 2009; GANTWERKER & HOM, 2012).

As células tronco epidérmicas, dérmicas e as células tronco mesenquimais (MSCs), têm sido estudadas quanto ao seu papel durante a cicatrização de feridas fetais e também no adulto, bem como a possibilidade de utilização em terapêuticas para a melhoria do processo de reparo. As células tronco epidérmicas, por exemplo, podem gerar todos os componentes da epiderme, estas estão presentes no folículo piloso sendo ativadas após traumas. Já as células tronco da derme relacionadas ao reparo são representadas por um conjunto de células multipotentes encontradas em reserva como células dérmicas da papila (DP) ou as células progenitoras derivadas da pele (SKPs) que se originam de DP e possuem várias propriedades de células tronco dérmicas, inclusive sob a cicatrização de feridas. Essas células são capazes de contribuir para a reposição das populações celulares prejudicadas com o dano (HU *et al.*, 2014, LI *et al.*, 2017).

Os macrófagos ao serem ativados e recrutados por meio de quimioatraentes e fatores como TNF, PDGF, FGF ou TGF- β , liberados por células na borda da lesão chegam ao local de lesão por volta de dois a três dias, com a finalidade de remover restos celulares, neutrófilos

gastos e outros corpos estranhos. As inúmeras citocinas e fatores de crescimento liberadas por tais células atuam regulando de diferentes modos a etapa proliferativa do reparo. Existem alguns fenótipos de macrófagos bem descritos, como os macrófagos M1 e os M2. Macrófagos M1 são um fenótipo pró-inflamatório responsável por atuar nos estágios iniciais do reparo e que são ativados por outros mediadores pró-inflamatórios e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) resultantes da injúria tecidual. Os M1 possuem como principal característica a capacidade de fagocitose, já os M2 possuem caráter anti-inflamatório, sendo ativados de modo alternativo e com papel importante na promoção do reparo por meio, por exemplo, da secreção de TGF- β 1 (Fator de crescimento transformante- β) e, conseqüentemente, aumento de fibroblastos, miofibroblastos, secreção de colágeno e regulação da revascularização. A alteração de fenótipos entre si, bem como o surgimento destes nessas populações celulares, está ligada de forma significativa ao ambiente da ferida e ao segmento das etapas durante o processo de reparo (HESKETH *et al.*, 2017).

Já os fibroblastos são células que promovem a síntese de macromoléculas como glicosaminoglicanas e colágeno tipo I e III. Quando na forma ativa, eles apresentam o retículo endoplasmático granuloso e complexo de Golgi mais desenvolvido, são relativamente maiores e com muitos filamentos citoplasmáticos diferentemente dos fibrócitos, estes últimos podem retomar ao estado de fibroblasto em situações de lesões, com reativação da sua capacidade de síntese conforme descrito em Junqueira & Carneiro (2013). Os fibroblastos podem se diferenciar em miofibroblastos durante o reparo de feridas, que são ricos em filamentos de actina e miosina tendo atividade contrátil importante para o fechamento da lesão (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Além dos fibroblastos, as células endoteliais desempenham um importante papel no reparo de feridas cutâneas. Estas células estão envolvidas no processo de angiogênese, essencial para o fornecimento de oxigênio e nutrientes aos tecidos, e por permitirem a chegada de células sanguíneas responsáveis pela remoção de metabólitos e resíduos (KANT *et al.*, 2015).

Os mastócitos são células com papéis descritos no reparo inclusive de feridas fetais onde este resulta em regeneração nas primeiras semanas de vida (WULLF *et al.*, 2012). Os fenótipos e atividade dos mastócitos variam conforme a região em que são encontrados e entre as espécies. Estas células atuam mediando as respostas inflamatórias, estimulando a proliferação epitelial e angiogênese e a deposição da matriz (NG, 2010). Na fase inflamatória, a permeabilidade vascular é aumentada pela histamina liberada pelos mastócitos, estes vão apresentar também efeitos sob o recrutamento de neutrófilos e na degradação da matriz

extracelular (MEC). Mediadores liberados como triptase, histamina e VEGF estimulam a angiogênese na fase proliferativa. Os mastócitos atuam também sobre o processo de re-epitelização liberando o fator de crescimento epidérmico e o fator de crescimento de queratinócitos, podem também regular positivamente a α -SMA estimulando a contração e nas fases finais da cicatrização e estimular o aumento da reticulação de colágeno (UD-DIN, WILGUS & BAYAT, 2020).

Os neutrófilos são recrutados nas primeiras horas após o dano por sinais ocasionados por este, tais como padrões moleculares associados a danos (DAMPs), peróxido de hidrogênio, mediadores lipídicos e quimiocinas liberadas por células lesadas. Estas células são produzidas na medula óssea a partir de promielócitos e no dia seguinte à lesão correspondem em torno de 50% das células presentes na região de dano. As ameaças infecciosas são destruídas por tais células através da liberação de grânulos tóxicos, reações oxidativas, fagocitose e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Estes leucócitos produzem uma infinidade de grânulos específicos voltados a destruição de patógenos. A eliminação dessas células no local do dano, por exemplo, por esferocitose é crítica para a resolução da inflamação e prosseguimento nas etapas de cura, sendo a permanência de tais células no local do dano relacionada um estado inflamatório prolongado e ao surgimento de feridas crônicas (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Os linfócitos, tais como as células Th1 e Th2, são relacionados a regulação do microambiente da ferida pela secreção de diferentes citocinas, tais perfis têm sido relacionados a ativação de macrófagos ou de estados de remodelamento tecidual. Sendo as células Th1 caracterizadas pela liberação de IFN - γ , IL-2 e TNF- α e as células Th2 pela clássica liberação de IL-4, -5 e -10. Estas células podem através de interações entre célula-célula com células no ambiente ou não da ferida influenciar sob a resposta de cicatrização, por exemplo, ao interagir com queratinócitos que expressam CD40 e alterar o perfil de expressão de mediadores inflamatórios e suas funções no reparo (EMING, KRIEG & DAVIDSON 2007; RODRIGUES *et al.*, 2019). De modo geral, pode-se dizer que as células envolvidas no reparo atuam de modo coordenado e conjunto com objetivo de reestruturação do tecido.

1.2.3. Fatores que podem interferir na dinâmica de cicatrização

Assim como em outros tecidos quando ocorre uma lesão, na pele ocorre uma série de eventos celulares e moleculares para a recuperação da arquitetura e suas funções (CLARK,

1985; KRAFTS, 2010). No entanto, ao contrário do que ocorre na pele fetal, onde a cura se dá sem formação de cicatrizes, ou seja, de modo regenerativo, em adultos essa formação ocorre, o tecido agredido tem seus componentes substituídos por uma nova matriz e nem todos serão regenerados e dispostos de modo igual ao da pele intacta (WILGUS, *et al.*, 2004). Nesse sentido, pode-se dizer que o reparo se dá por cicatrização. Folículos pilosos e glândulas sudoríparas, por exemplo, não se regeneram em feridas de adultos, do mesmo modo, a deposição de colágeno da nova matriz é diferente, onde as fibras ficam dispostas paralelamente, menos entrelaçadas e mais espaçadas, além disso, a resistência a tração do novo tecido normalmente é menor que a do tecido que ainda não sofreu dano. Outro problema é que o novo tecido, além de apresentar limitações funcionais em termos de resistência, estrutura-se dependendo da gravidade do dano como uma cicatriz visivelmente com aspecto indesejado (BEANES *et al.*, 2002, MOORE *et al.*, 2018).

Diante dos diversos níveis de comprometimento que essa formação de cicatriz pode acarretar na qualidade de vida de pacientes, muitos estudos têm buscado pela melhoria do processo de reparo, e conseqüentemente, que o tecido novo seja mais semelhante ao normal, com utilização de ferramentas que forneçam meios favoráveis a atividade celular local (AKITA, AKINO & HIRANO, 2013). Para compreender os eventos de reparo e eventuais causadores de defeito em tal dinâmica, algumas classificações se fazem necessárias.

Conforme o modo que ocorre a cicatrização pode ser classificada como de primeira intenção ou de segunda intenção. Na cicatrização de primeira intenção, ocorre uma pequena perda de tecido e poucas células tanto epiteliais como algumas do tecido conjuntivo morrem, as bordas da lesão podem ser aproximadas, tornando a situação ideal para o fechamento e com processo cicatricial dentro do período esperado, resultando em cicatrizes relativamente mais finas. Na cicatrização de segunda intenção ou de excisão uma extensa área de tecido é removida, impedindo a aproximação das bordas e levando a uma resposta inflamatória intensa, maior formação de tecido de granulação e deposição de colágeno, e por conseqüência gerando cicatrizes maiores (DENNIS *et al.* 2016).

A ocorrência de alterações no processo de reparo pode desencadear problemas que levam a permanência da ferida, tornando-a crônica, sendo caracterizada por um defeito ulcerativo na pele que perdura além do esperado, ou ainda podem levar a formação de cicatrizes hipertróficas ou queloides, devido ao excessivo acúmulo de matriz (ANDRADES, BENITEZ & PRADO, 2006; EMING, WYNN & MARTIN, 2017). Além disso, conforme os agentes causadores e fatores intrínsecos dos pacientes, as lesões apresentam características

e eventos particulares em seu processo cicatricial. Nas feridas agudas, ocorrem processos normais de cicatrização, com etapas coordenadas e sobrepostas em tempo hábil, resultando em um arranjo tecidual com estrutura e função restaurado, mas não idêntico ao do tecido normal (LI, CHEN & KIRSNER, 2007; LOOTS *et al.*, 1998). Já nas feridas classificadas como crônicas, nota-se o prolongamento ou interrupção de algumas fases que levaria ao reparo, por uma assincronia entre as fases de reparo na mesma ferida. Feridas diabéticas e úlceras venosas, por exemplo, demonstram cicatrização prejudicada, devido às condições fisiopatológicas do paciente, onde se observa um estágio inflamatório crônico, que perdura por dias, impedindo o prosseguimento normal para as fases posteriores, apresentando um padrão celular diferente do que ocorre na cicatrização de feridas agudas, como o aumento no número de macrófagos e redução de células T CD4+ configurando ainda distúrbios para além da fase inflamatória, de debridamento e proliferativa (LOOTS *et al.*, 1998, FALANGA, 2005).

As lesões por pressão, que ocorrem com frequência em pacientes hospitalizados são outro exemplo. Histopatologicamente, conforme a camada tecidual que foi afetada há variação na extensão e conseqüentemente na gravidade dessas lesões, podendo se apresentar desde em forma de eritema cutâneo até lesões que atingem músculos e ossos (WITKOWSKI & PARISH, 1982). Lesões por pressão podem apresentar elevados níveis de espécies reativas de oxigênio e mediadores pró-inflamatórios que acabam por dificultar o andamento da cura (ROMANA-SOUZA, DOS SANTOS & MONTE-ALTO-COSTA, 2018). Esse tipo de lesão apresenta-se como um problema clínico aos sistemas de saúde e pacientes, principalmente diante das dificuldades de uma cicatrização prolongada, maior risco de complicações e infecções, maior tempo de internação e, conseqüentemente nos custos de saúde (BRITO, DE VASCONCELOS GENEROSO & CORREIA, 2013).

Nesse sentido, para alguns autores, os fatores que afetam a cicatrização podem ser divididos em locais ou sistêmicos conforme revisado por GUO & DIPIETRO (2010), em locais tais como defeitos de oxigenação, presença de infecção, corpo estranho e insuficiência venosa. E em sistêmicos como idade, estresse, sexo, hormônios, isquemia, doenças, obesidade, alcoolismo, tabagismo, imunocomprometimento e estado nutricional do paciente, que podem, em diferentes graus e mecanismos interferir no prosseguimento da cura (GUO, DIPIETRO, 2010).

Desequilíbrios no número e na atividade de células inflamatórias ou presença de infecções configuram-se em muitas condições como os principais causadores de defeitos no

processo de reparo, podendo aumentar os danos e prolongando o processo de cura ou ainda impedindo que se chegue na resolução (LAROCHE *et al.*, 2018). Tratamentos empregados na cura de feridas buscam alternativas capazes de permitir uma atuação controlada das células envolvidas no processo de reparo, seja através do estímulo direto dessas células ou ainda fornecendo meios favoráveis à sua proliferação, migração bem como o desempenho de suas funções no tecido (MICHAEL *et al.*, 2013; SOLLER *et al.*, 2012).

A inflamação é apontada como um fator limitante na regeneração dos tecidos adultos, devido a rápida deposição fibrótica que se segue no processo de reparo, fator este relacionado também ao possível impedimento de células tronco multipotentes e progenitoras em atuarem no processo de regeneração como ocorre na regeneração de feridas fetais. Nessa situação, o processo de sinalização encontra-se comprometido, substâncias relacionadas a danos teciduais são produzidas em grande quantidade, comprometendo o início das próximas fases por alterar o recrutamento, a função e a proliferação de células (GURTNER, 2008; HU *et al.*, 2014; EMING, MARTIN & TOMIC-CANIC, 2014; LAROCHE *et al.*, 2018).

Várias citocinas e quimiocinas, bem como seus antagonistas, participam da manutenção equilibrada da fase inflamatória na cicatrização (SCHREML *et al.*, 2010; GEORGE BROUGHTON, JANIS & ATTINGER, 2006). Feridas que apresentam atraso na cicatrização possuem causas como alterações no estresse oxidativo que pode levar a danos nas membranas e/ou em proteínas de matriz, afetar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e enzimas proteolíticas. Essas alterações prolongam o estágio inflamatório o que acaba por comprometer a recuperação (EMING; KRIEG & DAVIDSON, 2007).

O desequilíbrio na expressão de proteínas, que são moléculas sinalizadoras, ocorre em várias condições patológicas, como diabetes, infecções e desnutrição. Um desequilíbrio, por exemplo, na expressão de metaloproteinases e fatores inibidores destas, também pode ser relacionado a atrasos na cicatrização ou processos que resultam em fibrose excessiva (VISSE & NAGASSI, 2003 *apud* LI, CHEN & KIRSNER, 2007). Após um dano, como já discutido, as células liberam diversos mediadores para recrutar mais células, degradar produtos indesejados e/ou modular funções de outras células. Radicais livres de oxigênio, íons superóxido e óxido nítrico, por exemplo, são liberados em resposta a danos ou durante diversos processos biológicos, configurando outro problema a ser contornado pelos mecanismos de reparo. Os radicais livres de oxigênio e oxidantes como peróxido de hidrogênio, por exemplo, são conhecidos por prejudicar o processo de cicatrização quando liberados em excesso, como ocorre em eventos de isquemia ou inflamações exacerbadas ou

ainda em lesões em que os sistemas antioxidantes naturais estão comprometidos (PHAN *et al.*, 2001; SOARES, 2002). Esses radicais agem sobre as células causando alterações, por exemplo, ao danificar os ácidos graxos das membranas, afetando sua fluidez e permeabilidade, podem alterar a função das proteínas, gerando danos no DNA das células e ainda ter ações diretas de toxicidade sobre as células (SOARES, 2002). Nesse sentido, a modulação desta etapa também se torna desejável em tratamentos que visam promover um melhor processo de cicatrização. Espécies vegetais e drogas vegetais obtidas a partir destas podem ter a capacidade antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana, sendo promissoras para a atuação sob tal processo (MELGUIZO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2021).

1.3. Plantas Medicinais

A definição de plantas medicinais feita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) as descreve como “todo e qualquer vegetal que em um ou mais órgãos possuem substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (WHO, 1998). O processo de produzir e industrializar uma planta medicinal, produzindo uma formulação, resulta em um fitoterápico (VEIGA, PINTO & MACIEL, 2005). A utilização de plantas para finalidades terapêuticas é uma prática antiga e cultural, sendo por alguns períodos a opção de tratamento mais acessível e disponível à população e até os dias atuais configura-se como uma prática difundida e de fácil acesso. Embora, muitas não tenham efeitos comprovados por estudos científicos, é nítida a riqueza de espécies com potencial farmacêutico para o desenvolvimento de tratamentos eficazes (ALBUQUERQUE & ANDRADE, 1998; HUSSAIN *et al.*, 2009). Diante disso, o estímulo ao avanço de pesquisas com a finalidade de estudar os potenciais efeitos das plantas é capaz de contribuir significativamente para a segurança do seu uso em diversas regiões pelas mais variadas culturas, reduzindo eventos de intoxicação e permitindo ainda desenvolvimento de novas terapêuticas (MACIEL *et al.*, 2002).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto N° 5.813, de 22 de junho de 2006 no Brasil, estabelece meios para a utilização segura de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006), ressaltando a necessidade de se estimular o avanço de pesquisas na área, garantindo sua utilização segura e contribuindo com a comunidade local na conservação das tradições e espécies da região. A Política nacional de Práticas Integrativas e Complementares, instituída no mesmo ano, visa ampliar as opções

terapêuticas aos usuários do SUS a fim de garantir o acesso aos produtos e serviços fitoterápicos, com segurança, eficácia e qualidade (BRASIL, 2006). No âmbito da fitoterapia, tais marcos regulatórios foram importantes para fomentar e apoiar a utilização de plantas medicinais e fitoterápicos na área da saúde. Além disso, com estímulo a estudos e coletas de dados a partir do saber popular aumenta-se a possibilidade de elaboração de novos medicamentos, desenvolvimento econômico e a melhoria da saúde geral (CHEIKHYOUSSEF *et al.*, 2011). Essa utilização segura pode ser alcançada pela interdisciplinaridade entre estudos envolvendo a etnobotânica, a fitoquímica e a farmacologia, por exemplo (MACIEL *et al.*, 2002).

A diversidade e a abundância de espécies de plantas existentes no Brasil, com a possibilidade de aquisição e fornecimento de matérias-primas com baixo custo, despertam interesse de vários pesquisadores, destacando-se, por exemplo, a possibilidade de descoberta de novos princípios ativos (MARTINS *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2016). Neste contexto, as plantas têm sido estudadas e testadas quanto aos seus efeitos sobre várias doenças, incluindo efeitos sobre o reparo de feridas na pele, pela capacidade de seus constituintes em acelerar e melhorar esse processo. Estes estudos englobam análises do efeito de extratos ou ainda de formulações obtidas de matéria-prima vegetal (SANTOS *et al.*, 2006; BUZZI, FREITAS & WINTER, 2016).

1.3.1. Plantas medicinais e cicatrização de lesões cutâneas:

Algumas espécies vegetais são estudadas devido a sua potencialidade sobre o reparo, estudos que confirmam tal atividade propõem sua utilização com fim de acelerar e ou melhorar o processo cicatricial, são inseridas nesse contexto principalmente aquelas plantas que já possuem uso tradicional na medicina popular e com isso surgem novos fitoterápicos no mercado a partir da validação desses saberes, alguns exemplos são a utilização da *Aloe vera* (FALEIRO *et al.*, 2009; GARCIA-ORUE, *et al.*, 2017), *Artemisia absinthium* (BENKHALED *et al.*, 2020) e *Callendula officinalis* (BUZZI, FREITAS & WINTER, 2016; PARENTE *et al.*, 2009) que são amplamente utilizados como agentes cicatrizantes e cujo estudo tem revelado sucesso em diversas fases do reparo.

Uma das vantagens do uso de plantas e agentes fitoterápicos é que esses podem atuar de diversas formas sobre o reparo tecidual, seja acelerando o processo de fechamento da ferida ou ainda reduzindo a fibrose e com baixo índice de efeitos adversos. Diante disso,

destaca-se a probabilidade de atuação em diferentes alvos durante o mesmo processo. Essa ação dependerá, por exemplo, da forma de administração, do período de uso, da concentração e principalmente das substâncias contidas naquele espécime vegetal (BUDOVSKY, YARMOLINSKY & BEN-SHABAT, 2015; SHEDOEVA *et al.*, 2019). A atividade terapêutica das plantas deve-se aos seus componentes bioativos. Na cicatrização estes podem atuar exercendo efeito antimicrobiano, eliminando radicais livres com atividade antioxidante ou ainda controlando a proliferação celular, angiogênese, aumento da síntese de colágeno ou de DNA interferindo, portanto, em uma ou mais fases da cicatrização (GHOSH & GABA, 2013). Flavonoides, alcaloides, quinonas, compostos fenólicos, terpenoides, açúcares e taninos são compostos encontrados em algumas espécies vegetais, que apresentam atividade antimicrobiana, antioxidante e estimulador da proliferação celular e síntese de colágeno, podendo dessa forma serem associados à estimulação do reparo e até mesmo a melhoria deste, o que se confirma por vários estudos *in vivo* e *in vitro* (BUDOVSKY, YARMOLINSKY & BEN-SHABAT, 2015).

Na revisão organizada por Melguizo-Rodríguez e colaboradores (2021), os compostos fenólicos presentes no azeite extra virgem, tais como polifenóis, são descritos a partir de alguns estudos por atuarem favorecendo o processo cicatricial diante de suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, bioestimuladoras e antimicrobianas (MELGUIZO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2021, MELGUIZO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2021). Tais compostos estão presentes em inúmeras espécies de plantas e muitas destas já estudadas quanto a seus efeitos em modelos de feridas. A espécie *Chromolaena odorata*, por exemplo, possui em seu extrato flavonoides, ácidos fenólicos, dentre outros que são atrelados ao seu papel na cicatrização, este extrato foi capaz de proteger células como queratinócitos e fibroblastos do estresse oxidativo (PHAN *et al.*, 2001).

A utilização de frações dos componentes das plantas em estudos também tem permitido elucidar as substâncias e seus efeitos sobre o reparo. A P1G10 (uma fração proteolítica de cisteína do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*), por exemplo, foi estudada quanto aos efeitos de sua aplicação tópica sobre lesões induzidas por UVB em camundongos, demonstrando efeitos sobre mediadores associados ao eritema e capacidade de diminuir a resposta inflamatória associada ao estresse UV e assim interferir positivamente sobre vários cenários da cicatrização de feridas (FREITAS *et al.*, 2019). Diante disso, estudos para a avaliação do efeito cicatricial e a identificação desses componentes e sua correlação

com as etapas de reparo se fazem necessários, a fim de conhecer e permitir o uso dos espécimes vegetais ou de suas frações como matéria prima para medicamentos.

1.4. O gênero *Solanum* e suas utilizações:

Algumas espécies do gênero *Solanum* recebem destaque pela sua importância econômica e na indústria alimentícia, tais como a batata (*S. tuberosum* L), o tomate (*S. lycopersicum*), a berinjela (*S. melongena* L.). Esse gênero abrange quase metade das espécies pertencentes à família Solanaceae configurando uma rica fonte para indústria alimentícia, biotecnológica e farmacêutica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A espécie *S. nigrum* tem sido amplamente estudada quanto ao seu potencial anticancerígeno, visto sua utilização na medicina tradicional chinesa para tal efeito e na literatura haver várias evidências do papel antiproliferativo do extrato aquoso sobre células tumorais (TAI *et al.*, 2012). A *S. villosum* L., também é uma espécie com amplas atividades já estudadas, apresentando potencial antiparasitário, antibacteriano, antioxidantes e anticancerígenas por diferentes extratos e frações (ZAHARA *et al.*, 2019). *S. melongena* L. foi estudada quanto ao seu papel sobre a inflamação e estresse oxidativo durante o tratamento de hemorroidas, em um modelo animal, onde o extrato contendo ácido clorogênico como principal composto fenólico presente foi capaz de reduzir a inflamação pela redução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , além de reduzir a permeabilidade capilar, edema e por aumentar a enzima SOD demonstrando seus efeitos antioxidantes (DÖNMEZ *et al.*, 2020). Nota-se para o gênero a presença de fitoconstituintes cruciais para tais efeitos, que agem de modo isolado ou sinergicamente, ressaltando a crescente necessidade de estudá-los isoladamente elucidando mecanismos de ação e aplicabilidade terapêutica. Observa-se também a distribuição cosmopolita do gênero, fator esse que destaca a abundância de espécies pelo mundo e sua importância econômica.

Estudos em reparo de feridas, utilizando algumas espécies do gênero, têm apresentado resultados que confirmam os efeitos já observados na medicina popular ou ainda integram um novo espectro terapêutico para as espécies. Pomadas feitas a partir do extrato etanólico de *S. tuberosum* a 1% e 2% apresentaram atividade cicatrizante em feridas induzidas em *Mus musculus* Balb/c após sete dias, os autores apontam a presença dos fitoconstituintes fenólicos, como ácido clorogênico, flavonoides e polifenóis como os responsáveis por tal efeito diante

de dados encontrados na literatura, e quanto a atividade anti-inflamatória, antioxidante e antibacteriana dessas substâncias (ROSAS-CRUZ *et al.*, 2020).

O extrato hidroalcoólico de frutos de *S. diploconos* (Mart.) Bohs, uma planta nativa brasileira, foi estudado quanto a sua atividade anti-inflamatória e cicatrizante por Benvenuti e colaboradores (2021), e apresentou estes efeitos pela sua capacidade de modulação da ativação e migração de neutrófilos, aumento da migração de fibroblastos e aceleração da cicatrização associados a presença de ácido cafeico, ferúlico e cumarínico no extrato. Do mesmo modo, *Solanum incanum* melhorou a cicatrização em feridas induzidas por queimaduras, sendo sua atividade associada ao potencial antioxidante, atividade de eliminação de radicais livres, possivelmente por constituintes como taninos e flavonoides (QURESHI *et al.*, 2019). *S. xantocarpum* também apresentou atividade cicatrizante semelhante sobre o reparo de feridas diabéticas, sendo esta também relacionada à presença de ácido clorogênico e sua ação conjunta com outros fitoconstituintes (PARMAR *et al.*, 2018).

É notável, portanto a rica constituição dessas espécies e sua potencial atuação no reparo de ferida, no entanto, ainda são poucos os estudos que avaliam o efeito isolado de cada componente, porém, conforme mencionado anteriormente, a possibilidade de atuação em diferentes etapas do processo de reparo, bem como a ação sinérgica dos fitoconstituintes representa uma forma de tratamento que tem gerado interesse diante de seus benefícios e redução de efeitos adversos.

1.4.1. *Solanum lycocarpum* St. -Hil. (Solanaceae)

Solanum lycocarpum St. -Hil. é uma planta de porte arbustivo ou arbóreo (Figura 1), conhecida popularmente como “Lobeira”, “Fruta de lobo” ou ainda “Jurubebão” em algumas regiões, sendo comumente encontrada no Cerrado brasileiro, com ocorrência em áreas com incidência maior de luminosidade. A espécie suporta climas áridos e secos, sendo frequente em áreas degradadas e resistente a ciclos de queimadas promovidos por ação antrópica, realizadas com frequência neste domínio. Apresenta frutos verdes e globosos que pesam até 500 gramas, medindo de 8 a 12 cm de diâmetro, estes são produzidos abundantemente pela planta, tornando-a alvo atraente para a exploração biotecnológica e sustentável no país. Quando maduros, os frutos são amarelos com aspecto macio e emitem aroma característico (LOMBARDI & MOTTA JR., 1993; LORENZI, 2008). Em algumas regiões, os frutos da lobeira são consumidos crus, cozidos ou na forma de geleias e doces ou

ainda utilizados em preparações de remédios caseiros como calmantes, diuréticos, antiespasmódicos e antifídicos (LORENZI, 2008; OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2003).

Oliveira Junior *et al.* (2003), detectaram um alto teor de nutrientes como vitamina C e fósforo no fruto maduro de *S. lycocarpum* semelhante a outros frutos como banana, laranja, abacaxi e manga. Os frutos são apontados como fontes promissoras de pectina, que é comumente utilizada na indústria alimentícia como espessante, estabilizante, gelificante e ou modificador de textura. E também podem ser fonte de amido no setor de biocombustíveis uma vez que tem alto rendimento no fornecimento de amido e bioetanol, sendo apontado como uma fonte alternativa de amido promissora para produção de bioenergia renovável não alimentar (TORRALBO *et al.*, 2012; MORAIS *et al.*, 2019).

A espécie recebe nome popular em algumas regiões de lobeira ou fruta de lobo pelo fato dos frutos fazerem parte da dieta generalizada lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus* Illiger 1815), que também é um dispersor de sementes para esta espécie. O animal parece optar por tal fruto pelo fato do potencial de suas sementes inibirem a ação de certos endoparasitas, como o nematoide *Dictophyme renale* em seus rins e outros em seu intestino, como *Trichuris*, *Ancylostoma* e *Toxocara* (LOMBARDI & MOTTA JR., 1993).

O pó branco extraído a partir dos frutos de *S. lycocarpum* é popularmente chamado “polvilho de lobeira”, sendo utilizado na medicina popular contra diabetes e epilepsia. Alguns estudos apontam que o polvilho extraído dos frutos possui atividade hipoglicemiante, redutora dos níveis de colesterol, redutor dos níveis de triglicérides e de colesterol hepático podendo estes efeitos ser relacionados aos níveis de alguns polissacarídeos e seus efeitos sobre o metabolismo (DALL’AGNOL & VON POSER, 2000; PEREZ *et al.*, 2006; SOARES-MOTA *et al.*, 2010, ROCHA *et al.*, 2012). Em contrapartida, Alves e colaboradores (2016), em um estudo com ratos Wistar machos com diabetes induzido por Estreptozotocina, não observaram efeito hipoglicemiante significativo proveniente do extrato de lobeira.

Há também dados que sugerem ação antiespasmódica, antiepiléptica, sedativa e anti-inflamatória de *Solanum lycocarpum*. Além disso, os glicoalcaloides presentes nos frutos, solamargina e solasodina, possuem componentes que são utilizados como matéria prima na síntese industrial de hormônios esteroidais e a composição fitoquímica dos frutos é bastante estudada. A solasodina possui importante efeito anti-inflamatório, enquanto para solamargina é descrito principalmente atividade inibitória do crescimento de células tumorais (VIEIRA *et al.*, 2003; MUNARI *et al.*, 2014). Xie e colaboradores, (2017), sugeriram ao estudarem a migração e invasão de células HepG2, que a solamargina foi capaz de bloquear a transição

epitelial mesenquimal, fase esta importante para a migração de células cancerígenas, isto pelo fato de regular positivamente E-caderina e negativamente N-caderina e vimentina (XIE *et al.*, 2017), evidenciando assim efeitos sobre a migração e invasão tumoral.

É relatado ainda a utilização popular das folhas e flores da espécie em infusões e banhos, contra gripes, resfriados, como emoliente, tônica, antirreumatismo e contra asma, além de infusos com as raízes empregados contra hepatite (RODRIGUES & CARVALHO, 2001). Costa e colaboradores (2015), demonstraram efeito anti-inflamatório de algumas frações do extrato de folhas de *S. lycocarpum* num modelo de edema de pata induzido por carragenina, além do efeito antioxidante e antibacteriano de algumas frações. Os efeitos anti-inflamatório e antioxidante observados nesse estudo foram relacionados à presença de flavonoides, como apigenina e kaempferol.

Morais e colaboradores (2020), relataram efeito anti-inflamatório do extrato etanólico do fruto maduro de *S. lycocarpum*, em um modelo de edema de pata induzido por carragenina, onde observou-se redução do edema e da migração de polimorfonucleares para o tecido de modo semelhante a indometacina um antiinflamatório não esteroideal. Verificaram também um efeito antinociceptivo que pode ser associado à redução da produção de mediadores inflamatórios pelo extrato. Esses efeitos foram atribuídos principalmente aos alcaloides, como solasodina e peiminina, e aos ácidos fenólicos presentes na composição química do extrato, tornando seu uso interessante para tratamento de processos inflamatórios e dolorosos segundo os autores.

Espécies com potencial antioxidante são apontados em alguns estudos como capazes de reduzirem os efeitos adversos em feridas, removendo ou reduzindo os produtos da inflamação, como o excesso de proteases e espécies reativas de oxigênio provenientes do acúmulo de neutrófilos na lesão (SUNTAR *et al.*, 2012). Essa atividade aliada a propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias podem contribuir para o processo cicatricial em menor tempo (KASOUNI *et al.*, 2021) e melhoria do reparo, como destacado anteriormente.

Diante disso, visamos fazer uma análise do efeito do extrato etanólico do fruto maduro dessa planta e sua fração hidroetanólica sobre cicatrização, partindo da hipótese de que este atue sobre a etapa inflamatória e melhore o processo de cura, uma vez que o processo inflamatório é uma etapa importante desse processo e sua modulação tem apresentado resultados positivos.

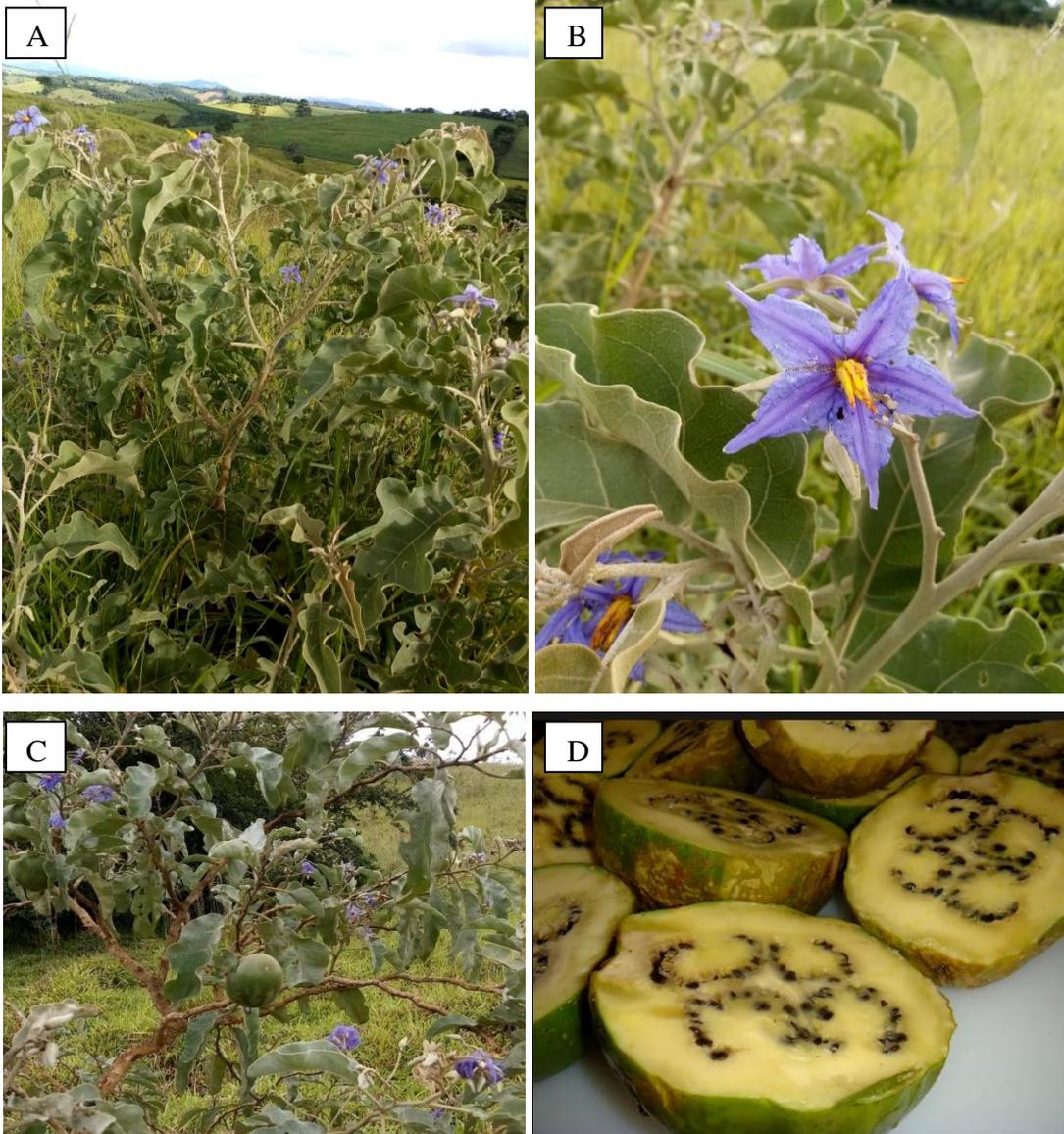


Figura 1: *Solanum lycocarpum* e suas estruturas: A) Arbusto com flores e folhas. B) Detalhe para as flores de *Solanum lycocarpum*. C) Detalhe para o fruto ainda verde de *Solanum lycocarpum*. Fonte: Acervo pessoal. D) ¹ Detalhe para o fruto maduro de *Solanum lycocarpum*. Fonte: Neide Rigo, 2010 – Blog Come-se.

¹ Disponível em:< <https://come-se.blogspot.com/2010/09/fruta-de-lobo-ou-lobeira-resposta.html> >. Acesso em: 24 fev. 2021.

2. JUSTIFICATIVA

As etapas envolvidas no reparo tecidual configuram eventos para a recuperação do tecido. Terapias que visam acelerar ou melhorar esse processo são empregadas a fim de auxiliar os mecanismos fisiológicos de resolução. O processo inflamatório, por exemplo, que se instala durante o evento, com a finalidade de remoção do agente agressor ou de possíveis microorganismos no local, pode ser considerada uma fase importante da cicatrização. Embora este evento ocorra como forma de resolução, caso sua ação se prolongue, as células inflamatórias envolvidas e os mediadores químicos secretados, podem aumentar os danos na área de lesão (LAROUICHE *et al.*, 2018).

Diversas plantas têm mostrado potencial no reparo de feridas e a principal característica está relacionada aos efeitos de seus componentes nas fases inflamatória, proliferativa e melhora da recuperação cirúrgica. Compostos fenólicos, alcaloides e flavonoides estão entre os principais responsáveis pela atividade cicatrizante de diversas espécies (BUDOVSKY, YARMOLINSKY & BEN-SHABAT, 2015). Os domínios vegetais brasileiros são ricos em espécies com potencial medicinal, com algumas destas empregadas na medicina popular. Essa disponibilidade de recursos naturais encontrados na flora brasileira pode facilitar a obtenção de matérias-primas para o desenvolvimento de novos medicamentos, bem como a redução de custos de obtenção e distribuição de medicamentos, uma vez que práticas sustentáveis de cultivo podem ser estimuladas. A espécie *S. lycocarpum* é comumente encontrada no Cerrado brasileiro e possui alta produtividade de frutos, que são empregados na medicina popular e em estudos que têm demonstrado efeitos antiinflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes importantes, sendo estes relacionados principalmente aos seus compostos fenólicos e flavonoides (SANTOS *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2015).

Diante dos efeitos já relatados de *S. lycocarpum* e suas ações, neste estudo visamos testá-lo como terapêutica no processo de cicatrização de lesões na pele, de modo a avaliar seu efeito sobre a inflamação e reparo tecidual, abrindo a possibilidade de novos estudos nessa área.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar os efeitos do uso de extrato etanólico e da fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* no processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar macroscopicamente, nos tempos de 1, 5, 7 e 21 dias após a confecção das lesões excisionais, a presença de crostas e sinais de infecção e/ou inflamação na área da lesão, após o tratamento tópico diário com extrato etanólico e com a fração hidroetanólica do fruto maduro de *S. lycocarpum*;
- Analisar microscopicamente, por métodos histológicos e histoquímicos, o infiltrado inflamatório, os fibroblastos, os vasos sanguíneos, os mastócitos, a área de tecido de granulação, a reepitelização e a deposição de colágeno, após tratamento tópico diário com extrato etanólico do fruto maduro de *S. lycocarpum* e com sua fração hidroetanólica, por 1, 5, 7 e 21 dias após a lesão excisional.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1. Animais

Todos os procedimentos seguiram as normas estabelecidas no Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São João del Rei – protocolo aprovado em N° 3128180521 (ID 000072).

Neste estudo foram utilizados 72 camundongos machos, Swiss, com 8 semanas de vida, obtidos do Biotério Central do *Campus* Tancredo Neves (NUCAL). Durante o período de experimentação, os animais permaneceram no Biotério Setorial, localizado no Laboratório de Cardiofisiologia e Biologia Molecular, sala B. 1. 11, do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de São João del-Rei UFSJ, *Campus* Dom Bosco, em gaiolas contendo seis animais cada, sendo alimentados com ração comercial balanceada e água à vontade e submetidos ao controle artificial de ciclos de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro), temperatura ambiente entre 21°C e 22°C e umidade relativa do ar de 60 a 70%.

4.2. Obtenção do extrato etanólico e da sua fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum*

O extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (EESL) e sua fração hidroetanólica (FHSL) foram obtidos pela professora Dra. Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima, do Campus Centro-Oeste Dona Lindu, UFSJ. A escolha do extrato etanólico e de sua fração hidroetanólica foi realizada a partir da atividade anti-inflamatória apresentada em trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa das professoras Flávia Carmo Horta Pinto e Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima. A principal diferença encontrada entre os dois extratos está na concentração de compostos fenólicos e taninos, que estão em maior quantidade no extrato etanólico, e flavonoides que são encontrados em quantidade discretamente maior na fração hidroetanólica (MORAIS, 2018; MORAIS *et al.*, 2020).

Para a preparação do extrato, os frutos maduros da espécie *S. lycocarpum* foram coletados e uma exsicata foi depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da

Universidade Federal de Minas Gerais, com o número de registro 159397, sendo identificada pelo Prof. Dr. Alexandre Salino.

O extrato etanólico foi obtido pelo método de percolação com etanol P.A., onde o pó seco foi colocado em um percolador e adicionado etanol P.A. (99,5 °GL), permanecendo em contato por 24 horas. O material foi extraído e o percolado foi concentrado em evaporador rotatório a 50 °C, sob pressão reduzida, para posterior liofilização e obtenção do extrato etanólico (EESL). Uma parte desse extrato etanólico foi solubilizada em solução etanol/água (1:1) e particionado sucessivamente com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano e acetato de etila, para obtenção das frações hexânica, diclorometânica, acetoetílica e hidroetanólica (FHSL- utilizado neste estudo), que foram secas em evaporador rotatório a 50 °C, sob pressão reduzida (MORAIS, 2018).

4.3. Confeção da lesão excisional cutânea e aplicação tópica do extrato etanólico do fruto maduro de *S. lycocarpum* e da sua fração hidroetanólica

Setenta e dois animais foram distribuídos de forma aleatória em três grupos, sendo um Grupo Controle que recebeu aplicação tópica de solução salina fisiológica, um grupo tratado com extrato etanólico (Grupo EESL) e um grupo tratado com a fração hidroetanólica do fruto maduro de *S. lycocarpum* (Grupo FHSL). Cada grupo foi subdividido em quatro outros subgrupos conforme o período de tratamento: 1, 5, 7 e 21 dias, com n=6 em cada subgrupo (DIAS, 2020).

Os animais foram anestesiados com 0,15 mL de solução anestésica contendo Cloridrato de xilazina (16,5 mg/Kg), (Anasedan Injetável Ceva), Cloridrato de ketamina (97 mg/kg) (Dopalen Injetável Ceva) e salina fisiológica, na proporção de 1:1:2, respectivamente, por via intraperitoneal. Posteriormente, o animal foi colocado sobre prancha cirúrgica em decúbito ventral para procedimento operatório. Foi realizada a tricotomia com lâmina de aço dos pêlos do dorso, com extensão de 6 cm no comprimento e 4 cm na largura a uma linha imaginária que passe na borda inferior das orelhas. O local foi higienizado com álcool 70%. Para confecção das feridas excisionais foi utilizado um *punch* dermatológico metálico com 7mm de diâmetro. Com esse instrumento foi excisado dois fragmentos cutâneos na área tricotomizada, até a exposição da fáscia muscular dorsal (Figura 2). A hemostasia foi realizada por compressão digital, utilizando-se gaze esterilizada.

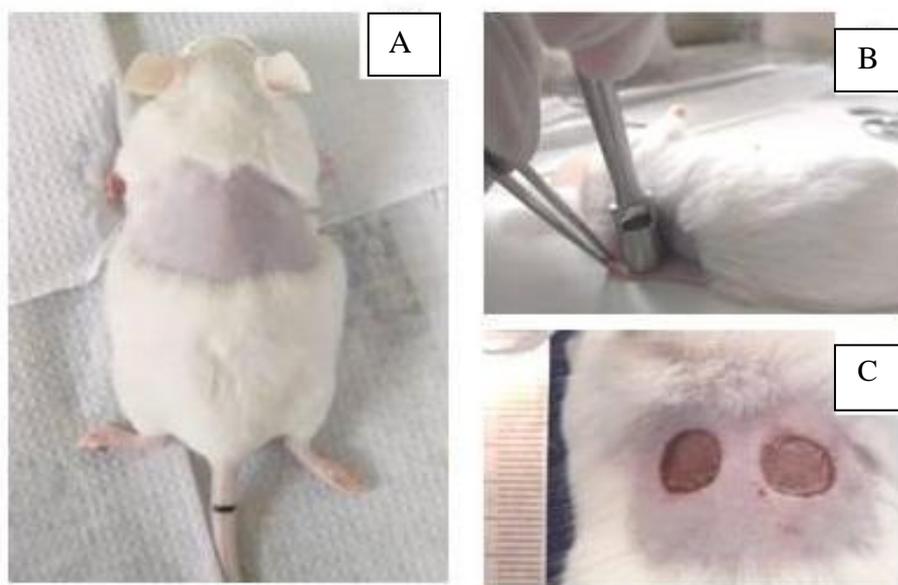


Figura 2: Metodologia empregada pelo grupo de pesquisa para a induzir a lesão excisional. A: Animal após a tricotomia, B: posicionamento do animal sob prancha cirúrgica e posicionamento do *punch* dermatológico sobre a pele com auxílio de uma pinça. C: Lesões excisionais. Fonte: Acervo pessoal.

As soluções para o tratamento dos animais foram obtidas pela ressuspensão em solução fisiológica do extrato etanólico (EESL) e da fração hidroetanólica (FHSL). Nos animais dos Grupos Tratados, a partir do 1º dia, no local da lesão, foi adicionado 40µl das soluções EESL ou FHSL na concentração de 150mg/kg, duas vezes ao dia com intervalo de 9 horas entre as aplicações. A aplicação foi realizada com o auxílio de uma pipeta automática com ponteiros esterilizados (Figura 3). Esse procedimento foi repetido durante 1, 5, 7 ou 21 dias, conforme o subgrupo. No Grupo Controle, foi adicionado o mesmo volume de salina, conforme a Figura 4.

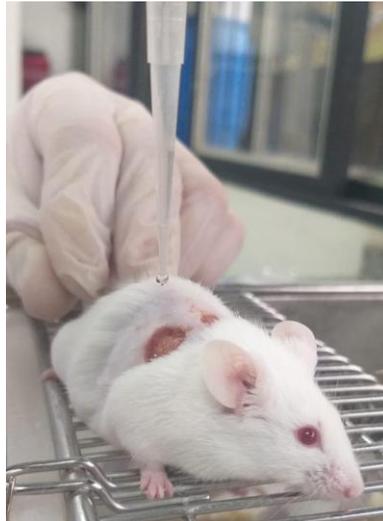


Figura 3: Procedimento de aplicação de soluções sobre a lesão. Na imagem, aplicação de solução salina sobre a lesão excisional. O animal era imobilizado e a solução aplicada com auxílio de uma pipeta automática e ponteiros descartáveis estéreis. Fonte: Acervo pessoal.

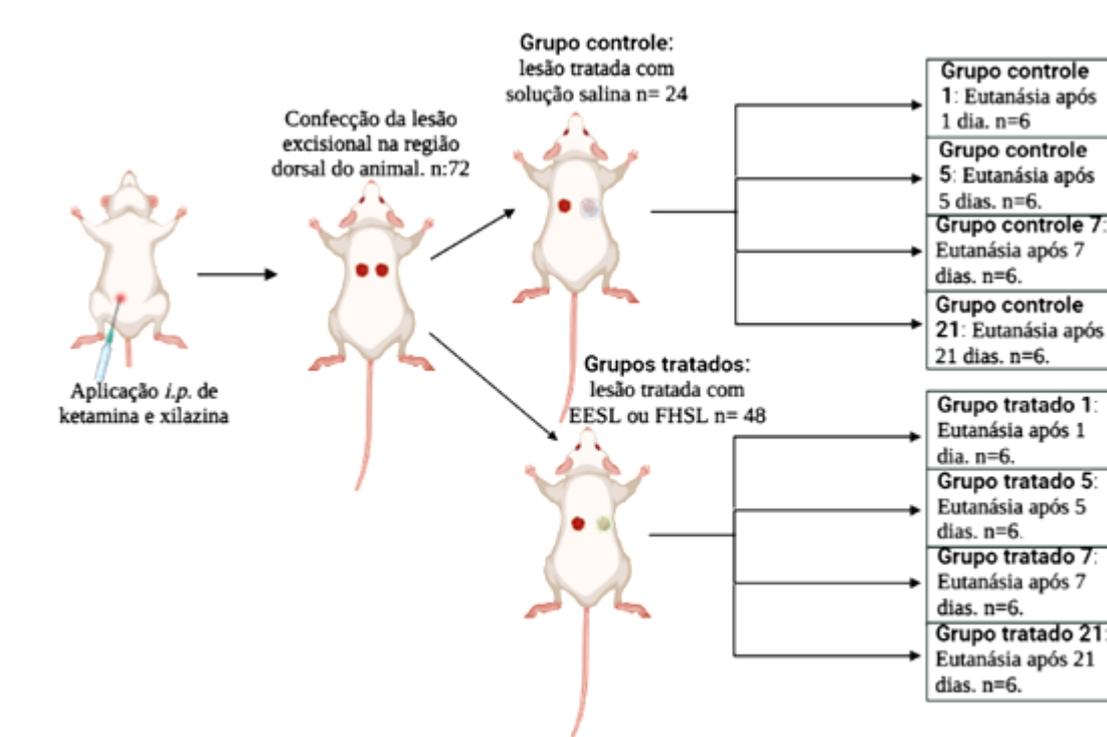


Figura 4: Protocolo experimental. (EESL: Extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum*; FHSL: Fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum*). Adaptado de: Meizarini *et al.*, 2020.

4.4. Avaliação macroscópica das lesões excisionais

Cada lesão foi avaliada diariamente, observando-se a presença de sinais inflamatórios (edema, hiperemia), presença de crostas e secreções. As feridas foram fotografadas com câmera digital fixa em tripé em cada período de tratamento. As imagens foram importadas para o *Software* de análise de imagem *Image J* versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.) e os contornos manualmente traçados para o cálculo do tamanho da ferida em milímetros quadrados, em cada tempo, 1, 5, 7 e 21 dias após a confecção da lesão.

Foi calculada a taxa de fechamento das feridas (TF), que representa a taxa de diminuição da área da ferida no último dia de tratamento, onde valores menores que zero representa o aumento da área de lesão e valores maiores que zero uma evolução no processo de reepitelização e fechamento da lesão, os cálculos foram feitos utilizando-se a seguinte fórmula:

$$TF = \frac{A_i - A_f}{A_i} * 100$$

Onde, A_i é a área da ferida no dia da lesão e A_f a área da ferida no dia da eutanásia (OKUMA *et al.*, 2015; QURESHI *et al.*, 2019).

4.5. Coleta e processamento das lesões excisionais

Decorridos 1, 5, 7 ou 21 dias após a confecção da lesão excisional, os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésicos. Um fragmento contendo a ferida em toda sua extensão e profundidade foi retirado com um bisturi número 11, e esse material foi clivado e fixado em solução de formol a 10% neutro tamponado por 24 horas, armazenado em álcool 70% e posteriormente desidratado em soluções sucessivas de álcool, diafanizado pelo xilol, impregnado e incluído em parafina conforme o seguinte protocolo padrão de processamento histológico utilizado pelo nosso grupo de pesquisa:

1. *Desidratação*: imersão em álcool 80% – 30 minutos; álcool 90% – 30 minutos; álcool absoluto I – 30 minutos; álcool absoluto II – 30 minutos;
2. *Diafanização*: imersão em xilol I – 30 minutos; xilol II – 30 minutos;

3. *Infiltração*: imersão em parafina I em estufa a 60°C – 30 minutos; parafina II em estufa a 60°C – 30 minutos;

4. *Inclusão*: em parafina a uma temperatura de 60°C e confecção de blocos em parafina, com devida referência do animal e grupo experimental.

Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo, obtendo-se cortes de 4µm. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (H.E.), Tricromático de Gomori e Azul de Toluidina, para avaliação histopatológica e morfométrica.

4.6. Avaliação histopatológica das lesões

Através de um microscópio óptico, as lâminas coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E.) foram analisadas para avaliação qualitativa quanto à presença de edema, crostas, infiltrado inflamatório, extensão da lesão, reepitelização e tecido de granulação nos diferentes períodos de observação. As lâminas coradas com Tricromático de Gomori foram analisadas para avaliação das fibras colágenas no tempo de 21 dias. As lâminas coradas com Azul de Toluidina usadas para a identificação e quantificação de mastócitos nos tempos de 5 e 7 dias.

4.7. Avaliação morfométrica dos leucócitos, vasos sanguíneos, mastócitos e fibroblastos nas lesões excisionais tratadas com EESL e FHSL

As lâminas coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E.) foram fotografadas com uma câmera digital (Moticam 3000) acoplada ao microscópio óptico convencional, sob foco fixo e clareza de campo. As fotomicrografias foram avaliadas através do software *Image J* versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.). Nesses cortes histológicos foram quantificados leucócitos nos tempos de 1, 5 e 7 dias, novos vasos sanguíneos nos tempos de 5 e 7 dias e os fibroblastos nos tempos de 5, 7 e 21 dias. As células foram identificadas a partir de sua morfologia característica, em 10 campos por caso/lâmina, a um aumento de 400X, sendo 4 campos dispostos no leito da lesão e 6 campos entre a lesão e a derme adjacente, já para os vasos foram considerados para a quantificação aqueles com um número menor ou igual a 3 células endoteliais visíveis.

Para a quantificação de mastócitos, as lâminas correspondentes aos tempos de 5 e 7 dias coradas com azul de toluidina e quantificados quinze campos por lâmina, a um aumento

de 400x. Sendo os campos dispostos de três em três campos ao longo da área de lesão de modo que abrangesse diferentes áreas na região da lesão. Posteriormente, o número total de leucócitos, de vasos, de mastócitos e de fibroblastos (somatória de todos os campos analisados) de cada animal foi dividido por 9,177, valor que corresponde à área por micrômetro quadrado (μm^2) da objetiva utilizada, totalizando assim o número de células/ μm^2 .

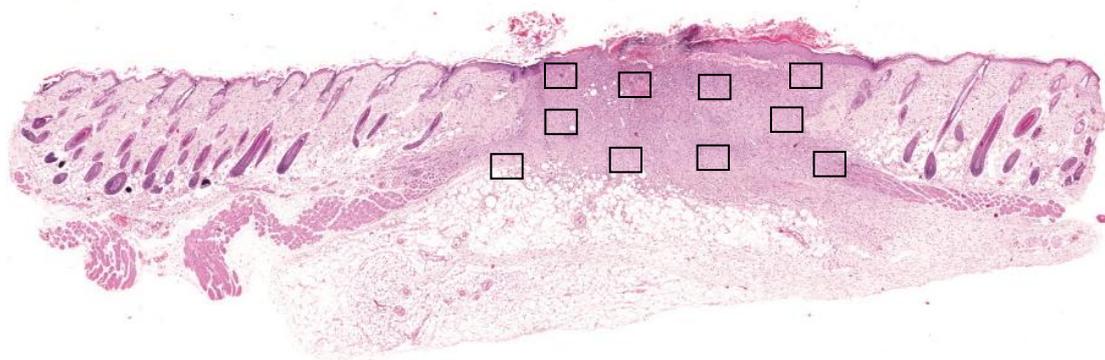


Figura 5: Representação esquemática da disposição dos 10 campos para a contagem de vasos, leucócitos e fibroblastos nas lâminas coradas em H&E.

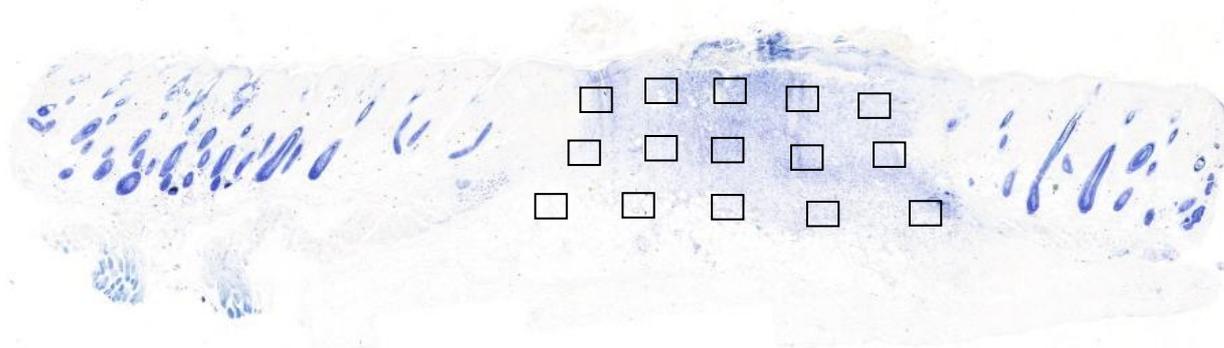


Figura 6: Representação esquemática da disposição dos 15 campos para a contagem de mastócitos nas lâminas coradas por azul de Toluidina.

4.8. Análises estatísticas

Foi calculado a média±erro padrão da média de cada grupo experimental, sendo comparadas as diferenças entre as médias do Grupo Controle e dos Grupos Tratados. Para análise estatística foi utilizado o Programa *Graph Pad Prism 5* (Graph Pad Software, CA, USA), onde foi feito o teste One-Way ANOVA, seguido do pós teste Newman-Keuls, para comparação entre as médias dos três grupos (Controle, EESL e FHSL). Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação macroscópica da cicatrização de feridas

O primeiro parâmetro utilizado para avaliar a evolução do reparo foi a verificação das diferenças entre as áreas das feridas excisionais dos grupos Controle (que recebeu solução Salina) e tratados topicamente com o extrato etanólico e ou fração hidroetanólica do fruto maduro de *S. lycocarpum* durante 1, 5, 7 e 21 dias. As características macroscópicas de cada ferida foram avaliadas, quanto à presença de crostas, ressecamentos e sinais inflamatórios (Figura 7A).

Após 1 (um) dia da aplicação dos respectivos tratamentos tópicos não foi observada diferença significativa entre as áreas da ferida entre os grupos: Controle ($49,28 \pm 3,09 \text{ mm}^2$), EESL ($44,36 \pm 2,95 \text{ mm}^2$) e FHSL ($51,08 \pm 4,38 \text{ mm}^2$) (Figura 7B). No entanto, o percentual médio de fechamento no grupo controle foi de 5,54%, 10,81% no grupo tratado com extrato etanólico do fruto maduro de *S. lycocarpum* e 22,96% no grupo tratado com a fração hidroetanólica do fruto maduro de *S. lycocarpum*. Nesse período as feridas de ambos os grupos mostraram-se sem grandes quantidades de secreções e com aspecto limpo embora sejam feridas abertas, sendo a maior taxa de fechamento observada no grupo FHSL (Figura 7 A).

Os grupos que receberam o tratamento tópico por cinco dias não apresentaram diferença significativa entre as áreas das feridas, sendo em média $26,60 \pm 7,10 \text{ mm}^2$ no controle, no EESL $38,42 \pm 4,07 \text{ mm}^2$ e no FHSL $46,55 \pm 6,50 \text{ mm}^2$, (Figura 7 B). No grupo controle a taxa de fechamento média foi de 52,5% da área inicial, seguido pelo grupo EESL com 49,47% e no grupo FHSL de 26,83%, observando-se em ambos os grupos a redução da área após cinco dias. No grupo controle após cinco dias as lesões apresentaram-se com aspecto seco, com crostas em desprendimento. No grupo EESL, a maioria das lesões apresentou crostas com as bordas já ressecadas iniciando o desprendimento. A maioria das lesões do grupo FHSL apresentaram-se com crostas sem sinais de desprendimento (Figura 7 A).

Aos sete dias de tratamento, a área média das feridas dos grupos foram: FHSL ($66,06 \pm 14,02 \text{ mm}^2$), Controle ($27,85 \pm 4,26 \text{ mm}^2$) e EESL ($17,33 \pm 2,05 \text{ mm}^2$), sendo a média da área das feridas tratadas com FHSL significativamente maior que os demais demais grupos, com $p=0,0027$. Já entre os grupos Controle e EESL não houve diferença significativa

entre a média das áreas da ferida (Figura 7 B). A taxa de fechamento média no grupo controle foi de 62,57%, já no grupo EESL esta foi de 71,58%, ambos apresentando redução significativa na área de lesão, sendo a contração maior vista no grupo EESL. Quanto ao aspecto morfológico das lesões, no grupo controle, a maioria das feridas apresentaram-se com crostas. Já no grupo EESL metade dos animais apresentaram lesões com crosta ainda inteira, nos outros, parte desta já havia se desprendido. As lesões aos sete dias no grupo EESL mostraram se visivelmente menores que os demais grupos. No grupo FHSL, a maioria das lesões apresentaram-se com crostas maiores e aparentemente mais espessas em comparação aos demais grupos desse período de tratamento (Figura 7 A).

Vinte e um dias após os tratamentos, não houve diferença significativa entre as áreas médias finais de cicatriz das feridas dos grupos: Controle ($9,10 \pm 1,55 \text{ mm}^2$), EESL ($12,90 \pm 1,62 \text{ mm}^2$) e FHSL ($15,73 \pm 5,08 \text{ mm}^2$) (Figura 7 B). A taxa de fechamento observada no grupo controle foi de 85,05%, seguida por 82,13% no grupo EESL e de 73,59% no FHSL (Figura 7 A). Aos 21 dias, os grupos controle e tratamentos apresentam no local da lesão cicatrizes pequenas.

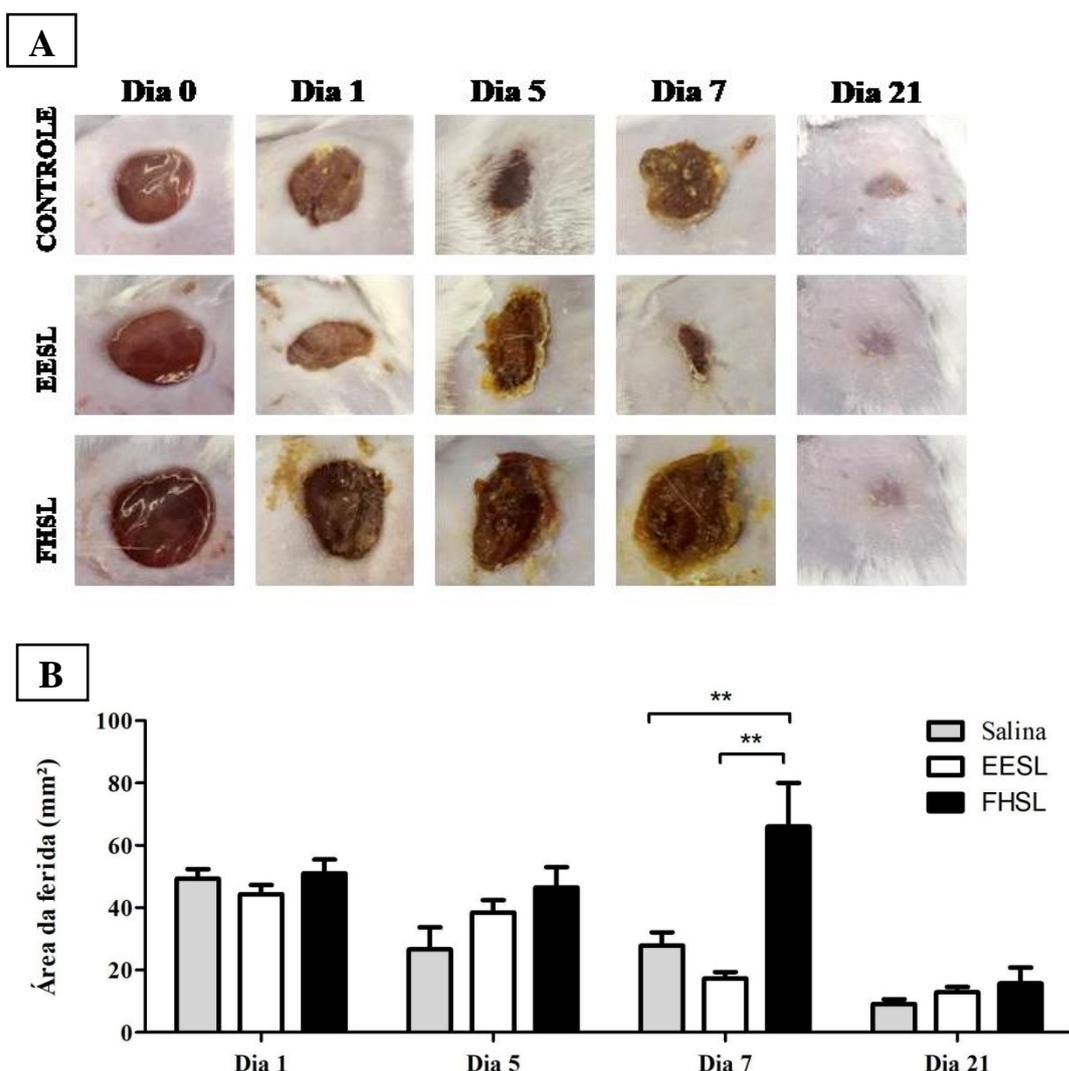


Figura 7: O tratamento tópico com extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* e o tratamento com a fração hidroetanólica após 21 dias não interfere significativamente no fechamento de feridas excisionais em camundongos Swiss. Em A, fotografias representativas das áreas de lesão em cada grupo e tempo experimental, sendo 0 o dia da confecção da lesão e 1, 5, 7 e 21 o dia da eutanásia de cada animal. Em B gráfico representativo das áreas finais das feridas em mm² em ambos os períodos, cujos valores são expressos como média ± SEM, n=6. Teste ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental, seguido por pós-teste Newman-Keuls, sendo **p<0,01.

5.2. Avaliação histopatológica e morfométrica de leucócitos, vasos, fibroblastos e mastócitos

Para avaliação histopatológica das lesões excisionais foi realizada a avaliação qualitativa das fotomicrografias de lâminas coradas em H&E em todos os períodos, observando-se características como: reepitelização, área de tecido granulação, presença de sinais e infiltrado inflamatórios, padrão de depósito da nova matriz e aspectos da região cicatricial.

Na análise morfométrica, foi feita a quantificação de leucócitos após 1, 5 e 7 dias, a quantificação de neovasos e mastócitos após 5 e 7 dias, a quantificação dos fibroblastos após 5, 7 e 21 dias e posterior análise estatística dos resultados.

5.2. 1. Avaliação histopatológica e morfométrica de leucócitos das lesões tratadas com EESL ou FHSL por 1 dia:

Após um dia de tratamento, as lâminas coradas em H&E foram analisadas qualitativamente quanto aos aspectos iniciais da cicatrização e da fase inflamatória inicial e quantitativamente quanto ao número de leucócitos. Nesse período, em ambos os grupos as lesões se apresentaram com área sendo preenchida por restos de fibrina e restos celulares, principalmente na superfície próxima a região onde se formaria o tampão hemostático e nas bordas do tecido normal (Figura 8).

No grupo controle, foi observada a presença de infiltrado inflamatório principalmente nos tecidos conjuntivos adjacentes e já com algumas células distribuídas pelo leito da ferida sobre a rede de fibrina, sendo observada principalmente a presença de polimorfonucleares (PMN). Na superfície da lesão, logo abaixo do tampão hemostático em formação e acima dessa área, foi detectada a presença de muitos fragmentos celulares e áreas de edema. As laterais da ferida entre o leito e o tecido intacto apresentaram morte tecidual devido à confecção da lesão e presença de infiltrado inflamatório. Nos tecidos adjacentes foram observados também hiperemia, caracterizada pela presença de vasos congestivos assim como nos demais grupos. Todos os sinais aqui relatados são característicos da etapa inflamatória.

No grupo tratado com extrato etanólico de SL, conforme mencionado, as lesões estavam com um aspecto menor que o grupo controle, também com presença de um tampão hemostático em formação. No leito da ferida, foi visto a presença de leucócitos, distribuídos nas adjacências da lesão e uns poucos na área de coágulo. Na superfície também foram observados fragmentos celulares e nas laterais a presença de tecido necrótico.

No grupo FHSL, o tampão hemostático também já estava em formação. No espaço havia presença de edema e os restos celulares estavam dispostos principalmente entre a malha de adiposo que preenche o espaço do tecido removido. O infiltrado inflamatório apresentou-se também com predominância de PMN, concentrados em maior quantidade nos tecidos adjacentes.

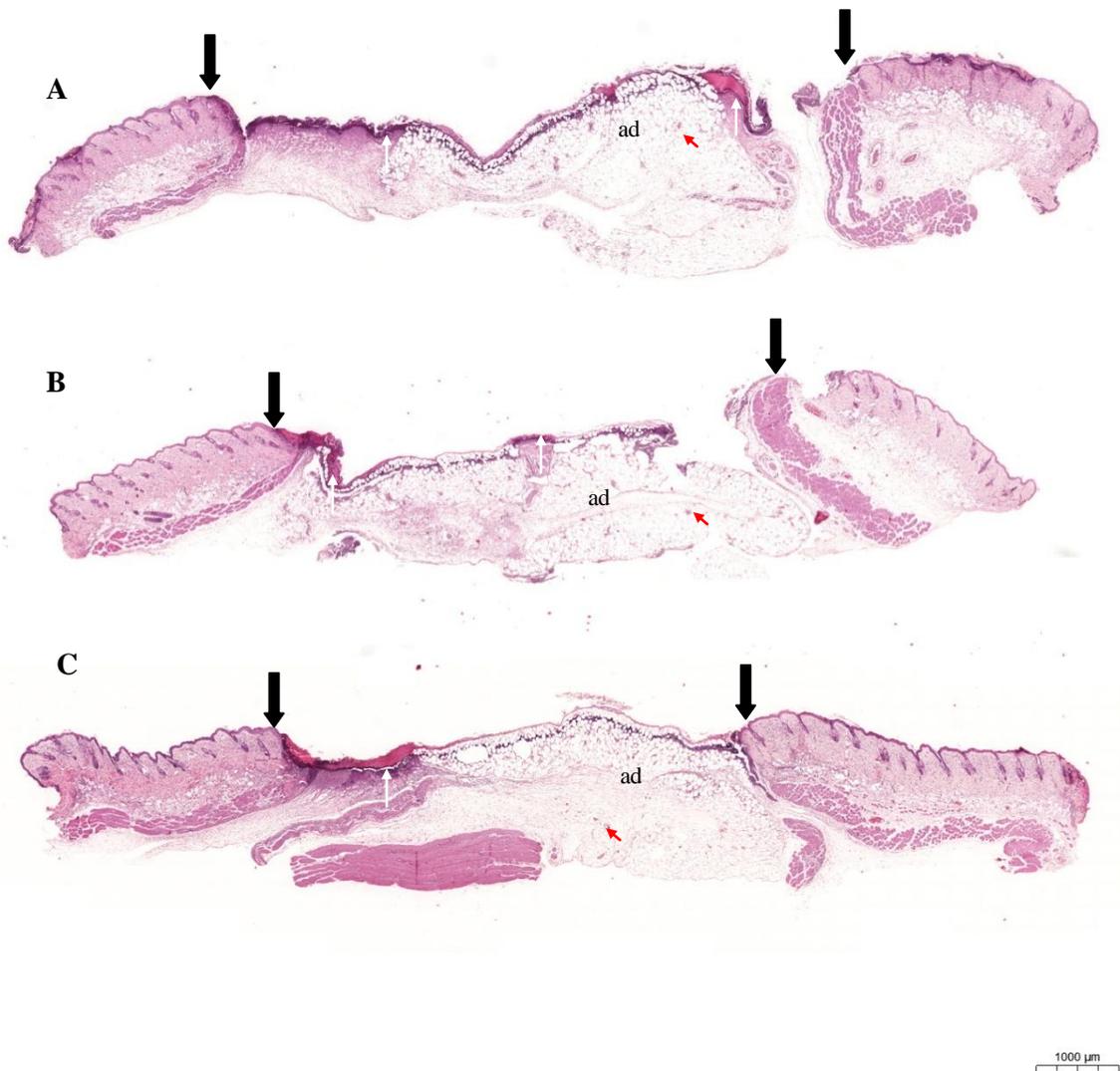


Figura 8: Fotomicrografias das lesões após um dia de tratamento – coloração Hematoxilina e Eosina. Observa-se em A, B e C as áreas de lesões nota-se a área onde o tecido foi removido com tecido adiposo indicado por “ad”, na superfície a formação de crosta (setas brancas), as bordas das lesões apresentam morte tecidual, infiltrado inflamatório no entorno da área removida e vasos hiperêmicos (setas vermelhas). Em A, grupo controle (salina), em B, grupo tratado com EESL e em C grupo tratado com FHSL. Setas pretas indicam início das áreas de lesão. Escala de barras 1000 μ m.

A análise morfométrica de leucócitos entre os grupos tratados no período de 1 dia demonstrou diferença significativa. O grupo tratado com o extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* apresentou menor número de leucócitos no leito da lesão ($1,946 \pm 0,1191/\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo controle ($4,139 \pm 0,4888/\mu\text{m}^2$) e ao grupo tratado com a fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* ($3,075 \pm 0,2816/\mu\text{m}^2$). Do mesmo modo, o grupo que recebeu FHSL mostrou-se com um número significativamente menor de leucócitos em relação ao grupo controle e significativamente maior que o grupo tratado com EESL $p=0,0012$ (Figura 9). O extrato etanólico e a fração hidroetanólica, portanto, reduziram o infiltrado inflamatório após um dia de tratamento.

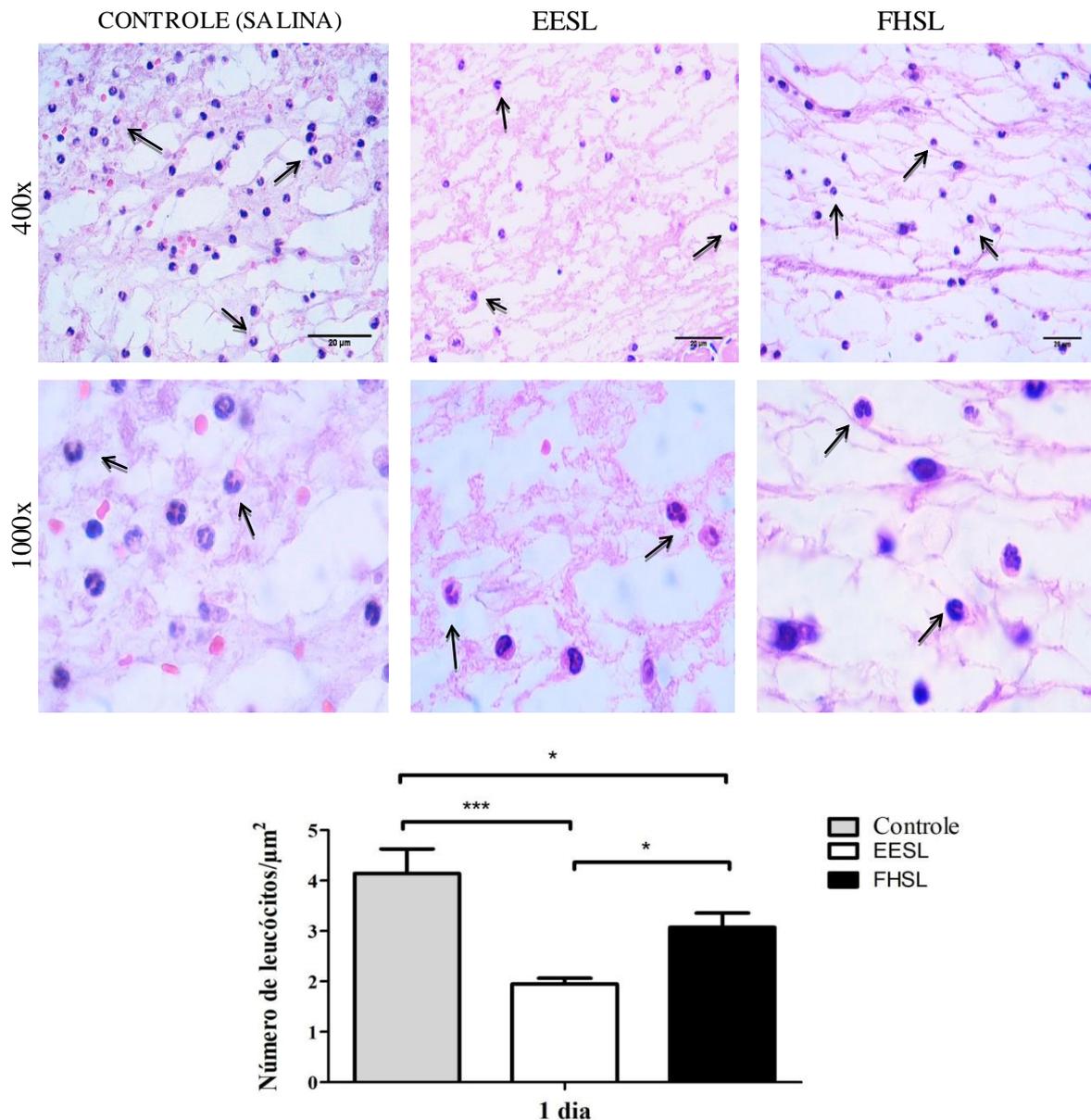


Figura 9: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* ou da fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* reduz o infiltrado de leucócitos após 1 dia. Em A, fotomicrografias representativas das lesões excisionais coradas em H&E dos grupos que receberam Solução salina (Controle), extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (EESL) e fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (FHSL) duas vezes ao dia por 1 dia. As setas pretas finas indicam leucócitos. Aumento de 400x e 1000x. Escala de barras de 20 μm . Em B, avaliação morfológica de leucócitos. Observa-se uma redução significativa do infiltrado leucocitário no grupo EESL e no grupo FHSL em relação ao grupo que recebeu solução salina com $p=0,0012$, pode-se notar ainda que o grupo EESL apresenta um número significativamente menor que o grupo FHSL. Sendo * $p\leq 0,05$, *** $p\leq 0,001$. Valores expressos como média \pm SEM, com $n=6$, teste ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental, seguido por pós-teste Newman-Keuls.

5.2. 2. Avaliação histopatológica e morfométrica de leucócitos, vasos sanguíneos, fibroblastos e mastócitos das lesões tratadas com EESL ou a FHSL por 5 dias:

Após cinco dias dos tratamentos, as lâminas coradas em H&E foram analisadas qualitativamente quanto aos aspectos iniciais da cicatrização e quantitativamente quanto ao número de leucócitos, neovasos e fibroblastos. Histopatologicamente foi observado que as lesões dos grupos EESL, FHSL e do grupo controle mostraram-se com presença de crosta rica em fibrina e restos celulares na região do tampão hemostático. O depósito de tecido de granulação já havia iniciado em todos os grupos (Figura 10).

No grupo controle, a área da lesão mostrou-se com sua maior parte infiltrada pelo tecido adiposo, com áreas de edema na superfície do adiposo e nas bordas da lesão, abaixo do tampão de fibrina foi observado um depósito inicial de tecido de granulação. Nesse tecido foi detectada vasos sanguíneos e leucócitos, os vasos com hiperemia foram vistos também no tecido adiposo adjacente. A reepitelização foi iniciada em ambos os animais desse grupo, onde se observou nas laterais um epitélio hiperproliferado iniciando a extensão sobre a área de granulação. Sob esse epitélio e se estendendo pela área de lesão havia uma crosta espessa rica em restos celulares e abaixo desta em área ainda não reepitelizada o tampão hemostático.

No grupo tratado com EESL, as superfícies das lesões estavam protegidas por um tampão hemostático médio, com presença de edema. O depósito de tecido de granulação havia se iniciado nas laterais e na superfície do tecido adiposo que preenchia grande parte do leito da ferida, sendo caracterizados pela presença de fibroblastos, vasos, leucócitos e início do depósito de matriz. A reepitelização estava em andamento partindo das bordas das lesões, caracterizada pela proliferação dos queratinócitos e extensão destes sobre o tecido de granulação.

No grupo FHSL, a área de tecido de granulação em relação aos outros grupos era menor, com reepitelização em fase inicial, com a hiperproliferação de queratinócitos nas laterais e extensão sobre a área de lesão. Na superfície, a crosta é relativamente maior em comparação aos outros grupos desse período e logo abaixo dela verifica-se a presença de tampão de fibrina. O tecido de granulação encontra-se principalmente nas laterais da ferida indicando o início dessa deposição, este é constituído pelas células características com infiltrado inflamatório e de alguns fibroblastos e vasos, foi observada na área da ferida a presença de muitos leucócitos e restos celulares.

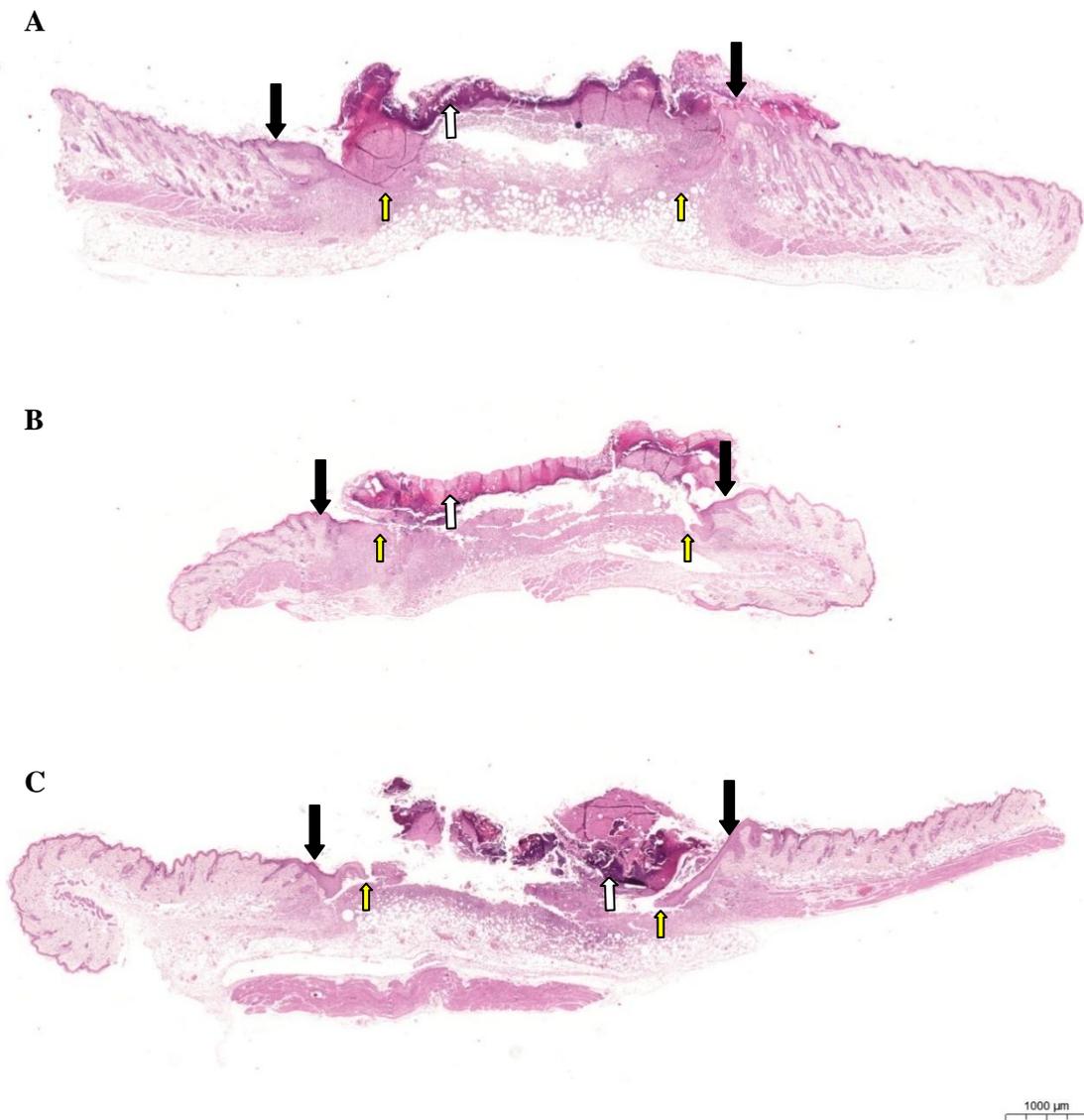


Figura 10: Fotomicrografias das lesões após cinco dias de tratamento – coloração Hematoxilina e Eosina. Observa-se em A, B e C as áreas de lesões com a presença de crostas (setas brancas), sob as bordas das lesões nota-se início da reepitelização (setas amarelas) e infiltrado inflamatório distribuído pelo leito. Em A, grupo controle (salina), em B, grupo tratado com EESL e em C grupo tratado com FHSL. Setas pretas indicam início das áreas de lesão.. Escala de barras 1000 μ m.

O número de leucócitos mostrou-se significativamente menor nos grupos que receberam os tratamentos. Sendo no grupo EESL ($2,504 \pm 0,2807/\mu\text{m}^2$) encontrado um menor número de leucócitos em relação ao grupo controle ($4,287 \pm 0,6420/\mu\text{m}^2$) e do mesmo modo, o grupo tratado FHSL ($2,399 \pm 0,2457/\mu\text{m}^2$) também apresentou um número significativamente menor de leucócitos em relação ao controle, onde $p=0,0090$, os resultados podem ser observados na figura 11.

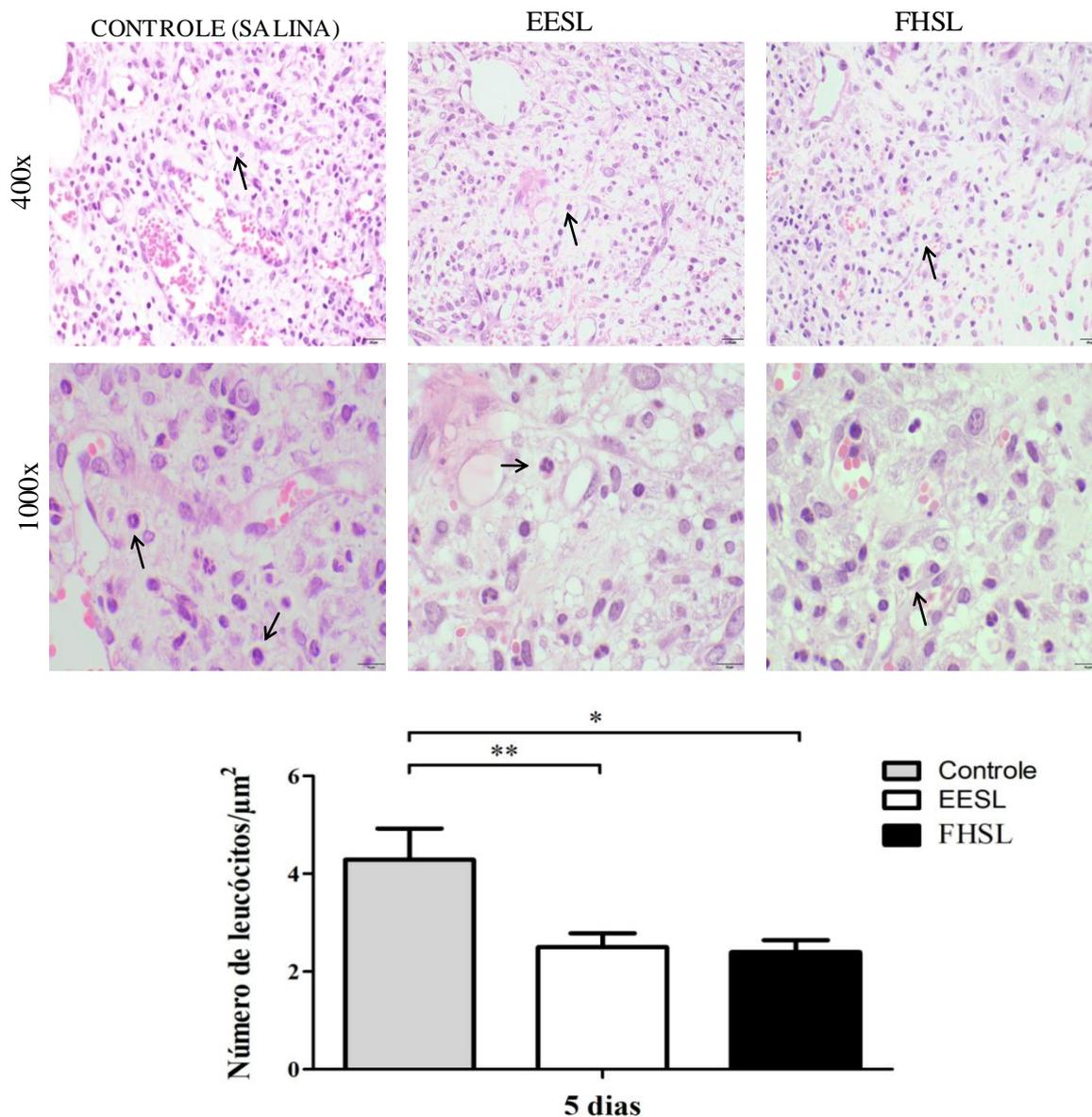


Figura 11: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* ou da fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* reduz o infiltrado de leucócitos após 5 dias. Em A, fotomicrografias representativas das áreas das lesões excisionais, coradas em H&E, dos grupos que receberam Solução salina (Controle), extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (EESL) e fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (FHSL) duas vezes ao dia por cinco dias. As setas pretas finas indicam leucócitos. Aumento de 400x - escala de barras de 20 μm , e aumento de 1000x - escala de barras de 10 μm . Em B, avaliação morfométrica de leucócitos. Observa-se uma redução significativa do infiltrado leucocitário no grupo EESL e no grupo FHSL em relação ao grupo que recebeu apenas solução salina com $p=0,009$. Sendo $*p\leq 0,05$, $**p\leq 0,01$. Valores expressos como média \pm SEM, com $n=6$, teste ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental, seguido por pós -teste Newman-Keuls.

Foi quantificado o número de novos vasos, para isso foram considerados aqueles cujo endotélio apresentava até três células endoteliais. Foi verificada a presença de neovasos, representando o início da angiogênese em todos os grupos. Nenhuma diferença significativa foi observada na quantidade de novos vasos entre os grupos controle ($0,033 \pm 0,0035/\mu\text{m}^2$),

EESL ($0,038 \pm 0,0115/\mu\text{m}^2$) e FHSL ($0,062 \pm 0,0209/\mu\text{m}^2$), sendo esta discretamente maior nesse grupo, como ilustra a figura 12.

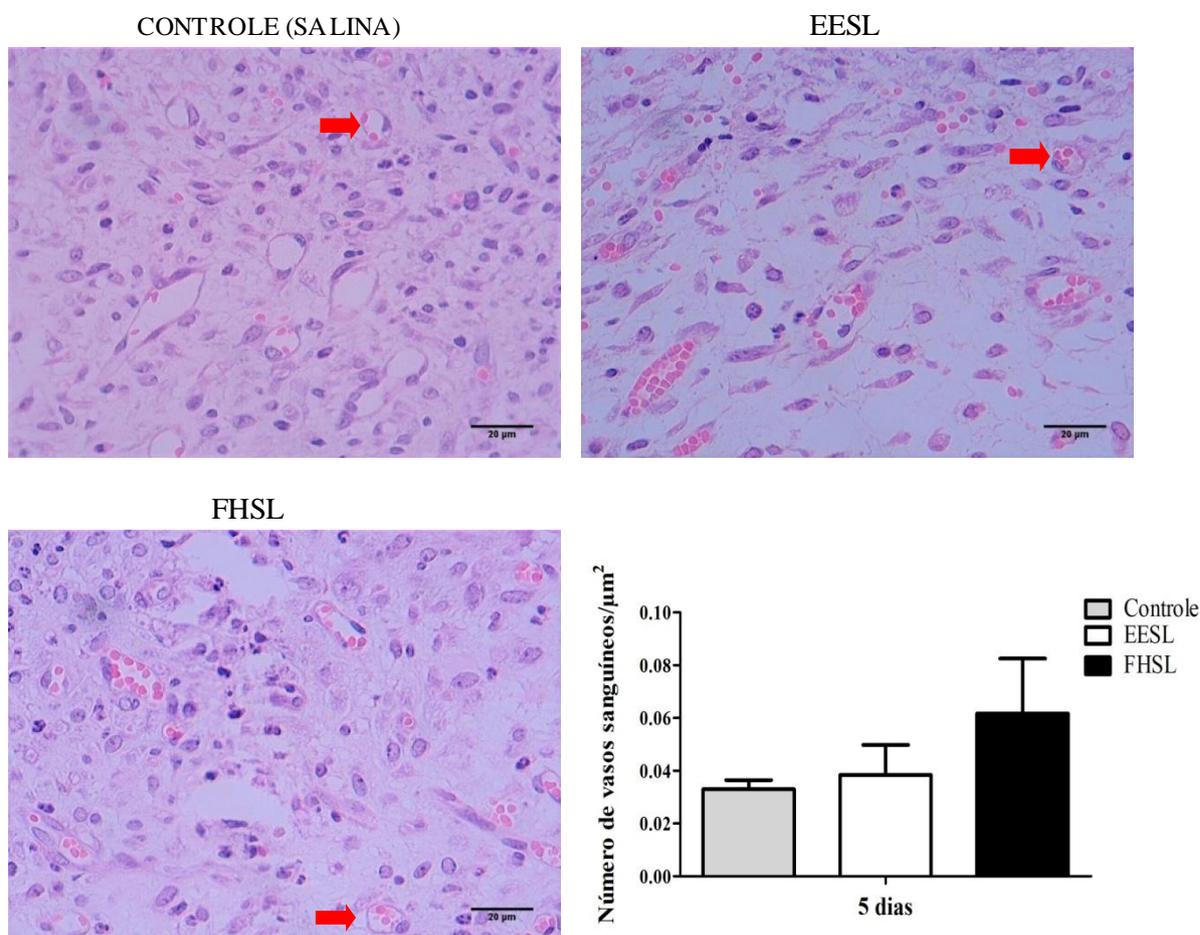


Figura 12: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* e da fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* não altera o número de novos vasos aos 5 dias. Fotomicrografias representativas das lesões excisionais coradas em H&E dos grupos que receberam Solução salina (Controle), extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (EESL) e fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (FHSL) duas vezes ao dia por cinco dias. As setas vermelhas indicam novos vasos. Aumento de 400x. Escala de barras de 20 μm. Avaliação morfométrica de neovasos sem diferenças significativas entre os grupos. Valores expressos como média ± SEM, com n=6, teste ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental, seguido por pós-teste Newman-Keuls.

Na análise morfométrica de fibroblastos após cinco dias não foi constatada diferença significativa entre os grupos. No grupo controle foi verificado um total de $0,496 \pm 0,1069/\mu\text{m}^2$, no grupo EESL $0,718 \pm 0,1416/\mu\text{m}^2$ e no grupo FHSL $0,420 \pm 0,116/\mu\text{m}^2$ (Figura 13).

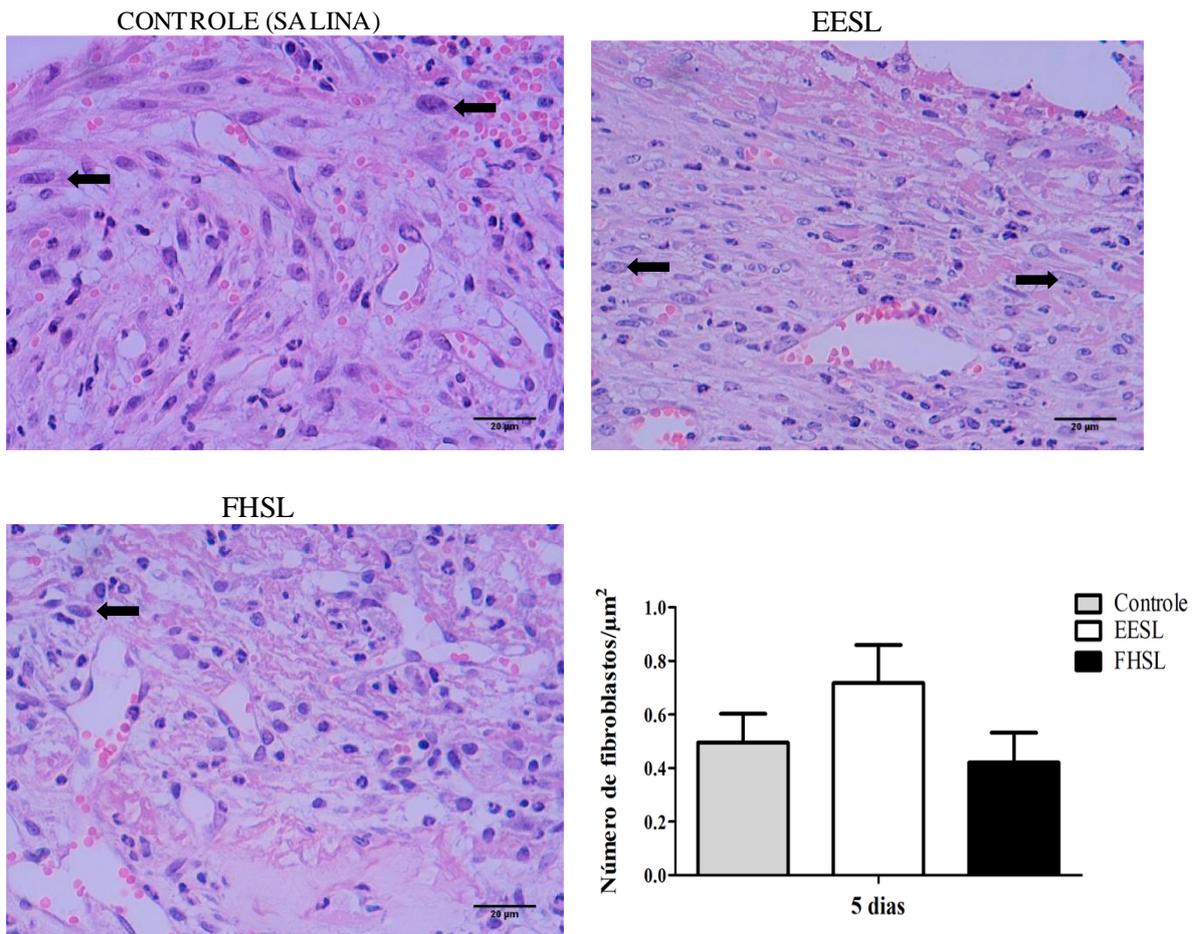


Figura 13: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* e da fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* não altera o número de fibroblastos aos 5 dias. Fotomicrografias representativas das áreas de lesões excisionais coradas em H&E, dos grupos que receberam Solução salina (Controle), extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (EESL) e fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (FHSL) ao dia por cinco dias. As setas pretas indicam fibroblastos. Aumento de 400x. Escala de barras de 20 μm. Avaliação morfológica de fibroblastos sem diferenças significativas entre os grupos. Valores expressos como média ± SEM, com n=6, teste ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental, seguido por pós-teste Newman-Keuls.

Na análise morfológica de mastócitos após cinco dias não foi constatado diferença significativa entre os grupos. No grupo controle foi verificado um total de $0,02906 \pm 0,007958/\mu\text{m}^2$ mastócitos, no grupo EESL $0,02422 \pm 0,004052/\mu\text{m}^2$ e no grupo FHSL $0,01574 \pm 0,007122/\mu\text{m}^2$ (figura 14). Foi visto, portanto, a presença de poucos mastócitos na área de lesão em todos os grupos, sendo a maioria dessas células localizadas próximas aos vasos. Já nos tecidos adjacentes foi vista uma grande densidade dessas células (Figura 15).

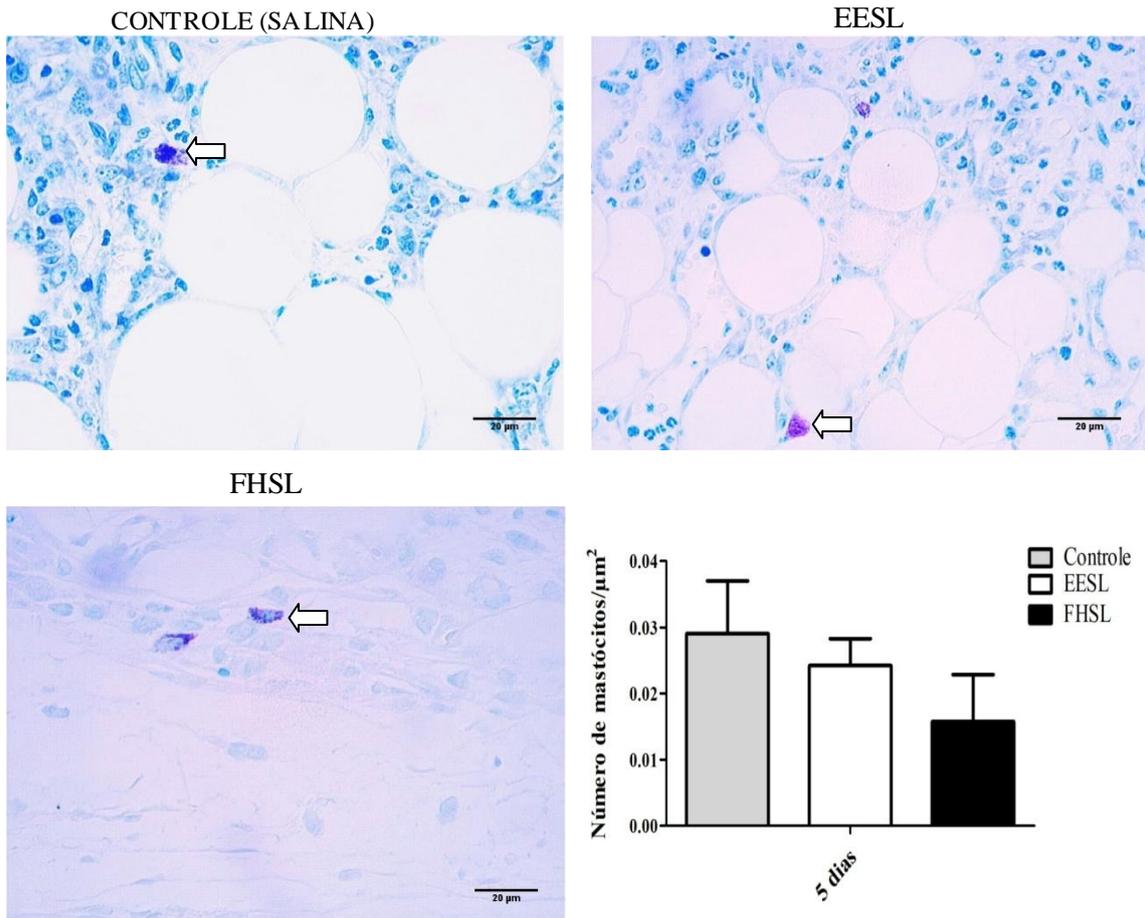


Figura 14: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* e da fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* não altera o número de mastócitos aos 5 dias. Fotomicrografias representativas de áreas das lesões excisionais coradas em Azul de toluidina para evidencição de mastócitos, nos grupos que receberam Solução salina (Controle), extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (EESL) e fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (FHSL) ao dia por cinco dias. Setas brancas indicam mastócitos. Aumento de 400x. Escala de barras de 20 μm. Avaliação morfométrica de mastócitos sem diferenças significativas entre os grupos. Valores expressos como média ± SEM, com n=6, teste ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental, seguido por pós-teste Newman-Keuls.

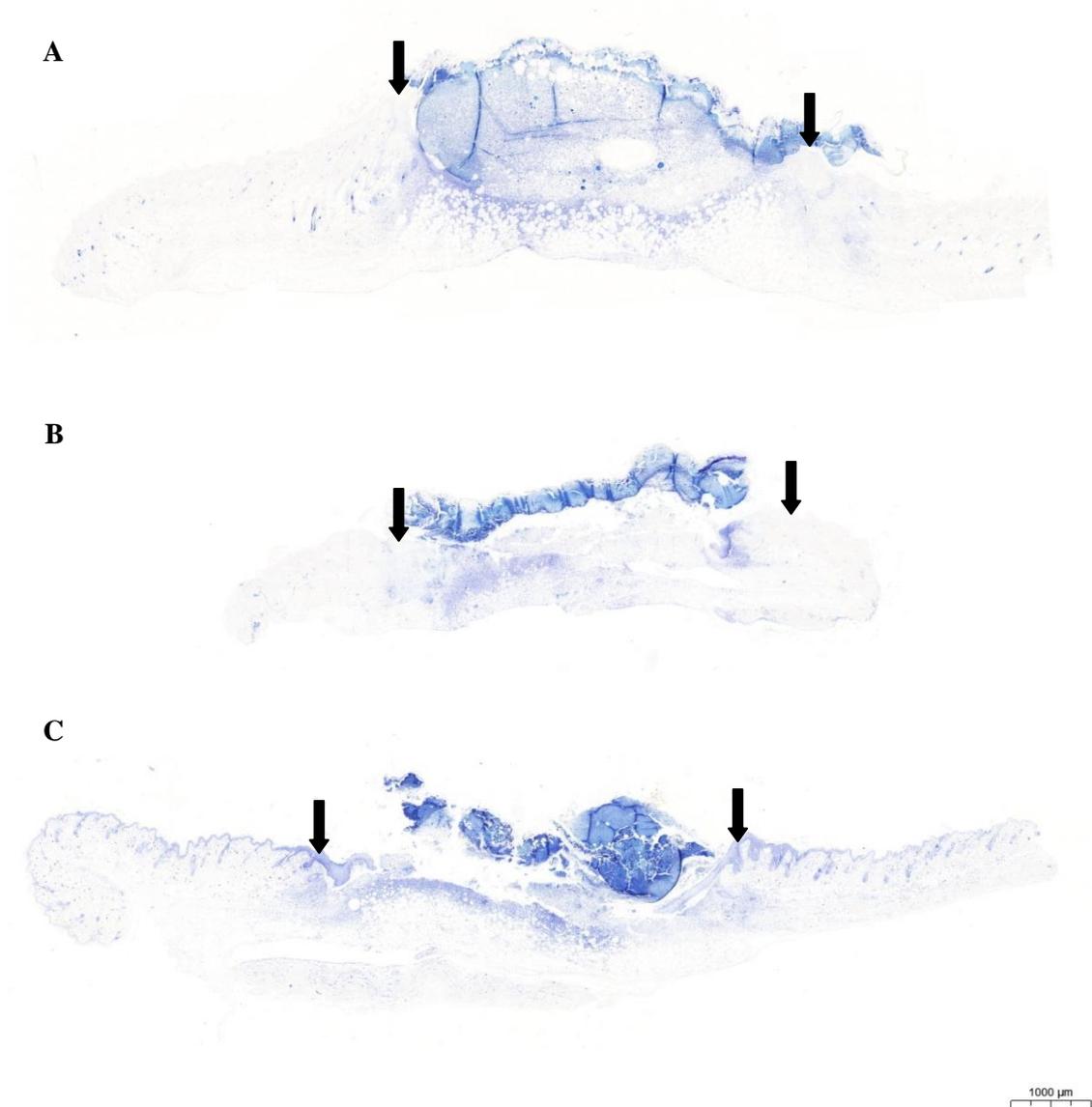


Figura 15: Fotomicrografias das lesões após cinco dias de tratamento - coloração Azul de Toluidina. Nesse período foi observado poucos mastócitos nas áreas de lesão, sendo estes encontrados principalmente nas regiões adjacentes a ferida. Em A, ferida do grupo controle (salina), em B, ferida tratada com EESL e em C, ferida tratada com FHSL. Setas indicam início das áreas de lesão. Escala de barras 1000µm.

5.2.3. Avaliação histopatológica e morfométrica de leucócitos, vasos sanguíneos, fibroblastos e mastócitos das lesões tratadas com EESL ou FHSL por 7 dias:

Aos sete dias após a confecção da lesão, as lâminas coradas em H&E foram analisadas e foi feita a avaliação histopatológica e morfométrica de leucócitos, vasos e fibroblastos. Foi observado em todos os grupos a presença de tecido de granulação (Figura 16).

No grupo controle é perceptível a presença maior de tecido de granulação nas bordas da área de lesão, área esta de depósito inicial. No leito da ferida, observa-se a presença de fibroblastos, grande infiltrado de leucócitos e alguns vasos. A re-epitelização, se encontra avançada, porém ainda não havia se completado em todos os animais, sobre a lesão havia crostas em desprendimento, onde se observa focos de hemorragia e presença de fibrina.

No grupo tratado com extrato etanólico do fruto maduro de *S. lycocarpum* por 7 dias a re-epitelização, na maioria dos animais, encontrava-se avançada e com crostas em desprendimento. A área de tecido de granulação já depositada aparenta estar mais preenchida que no grupo controle, com infiltrado adiposo menor, mas, ainda com presença de muitos leucócitos. A nova matriz que está sendo depositada assemelha-se ao colágeno da derme, embora seja relativamente mais fina. Nesse grupo as áreas de lesão são aparentemente menores que as dos demais grupos.

No grupo tratado com a fração hidroetanólica do fruto maduro de *S. lycocarpum* por 7 dias, foi verificada a presença de crostas grandes sobre as lesões, embora abaixo desta a reepitelização já havia se iniciado. O tecido de granulação apresenta-se em menor quantidade que os demais grupos, com uma área maior de lesão, com focos inflamatórios e restos celulares.

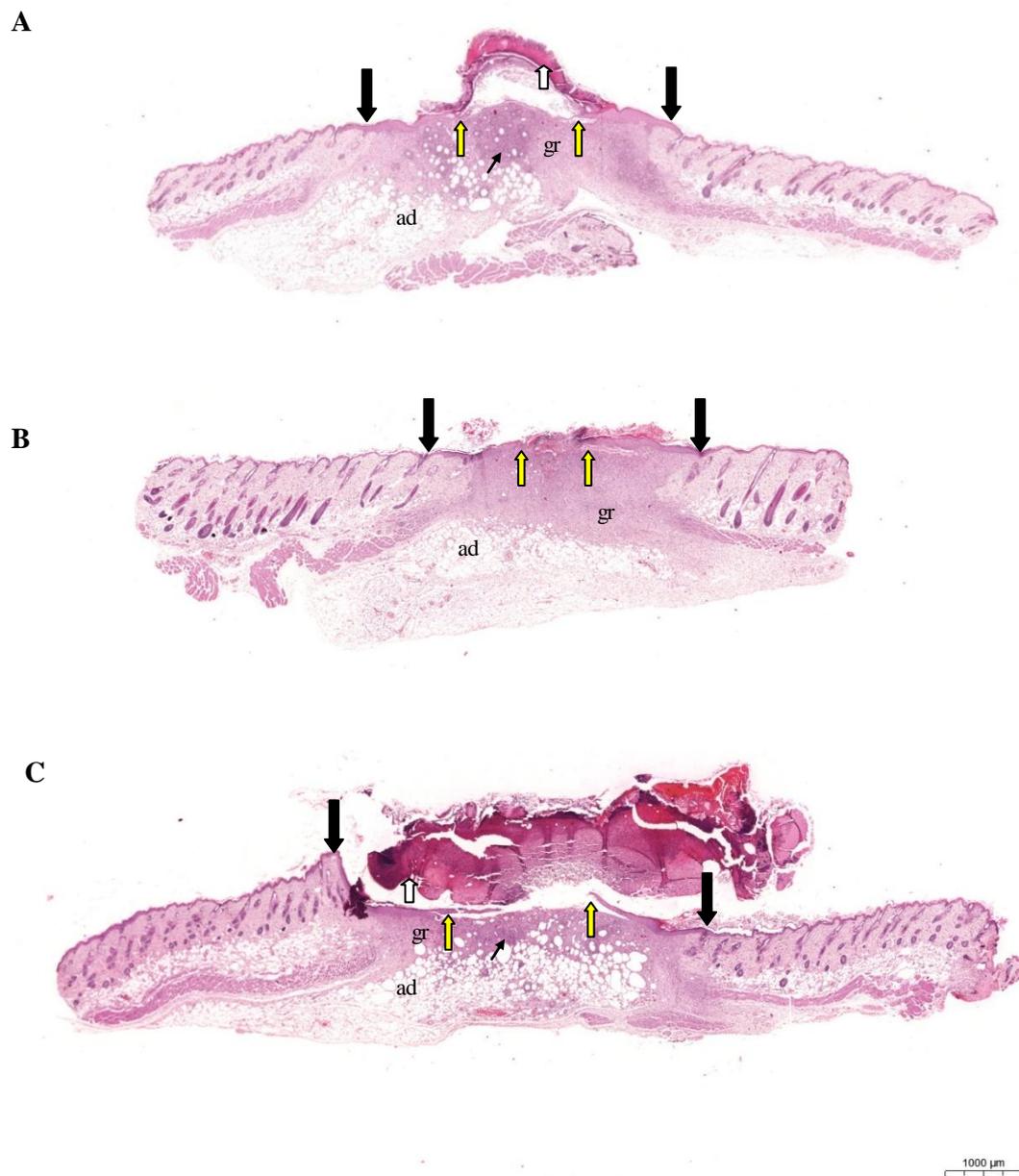


Figura 16: Fotomicrografias das lesões após sete dias de tratamento – coloração Hematoxilina e Eosina. Observa-se em A, B e C as áreas de lesões preenchidas por tecido de granulação (gr) com regiões mais internas contendo o tecido adiposo (ad), na superfície pode-se notar a presença de crostas (setas brancas), sob as bordas das lesões nota-se o processo de reepitelização em andamento (setas amarelas). Detecta-se também a presença de focos inflamatórios (pontas de seta). Em A, grupo controle (salina), em B, grupo tratado com EESL e em C grupo tratado com FHSL. Setas pretas indicam início das áreas de lesão. Escala de barras 1000µm.

Na morfometria de leucócitos foi verificada uma redução significativa dessas células ($p=0,0285$) no grupo tratado EESL por sete dias ($1,321 \pm 0,1782/\mu\text{m}^2$) em comparação com o grupo controle ($2,485 \pm 0,4010/\mu\text{m}^2$) como pode ser observado na figura 15, enquanto que não foi observada diferença significativa no grupo tratado com FHSL ($1,865 \pm 0,1761/\mu\text{m}^2$) em comparação aos demais grupos nesse período (Figura 17).

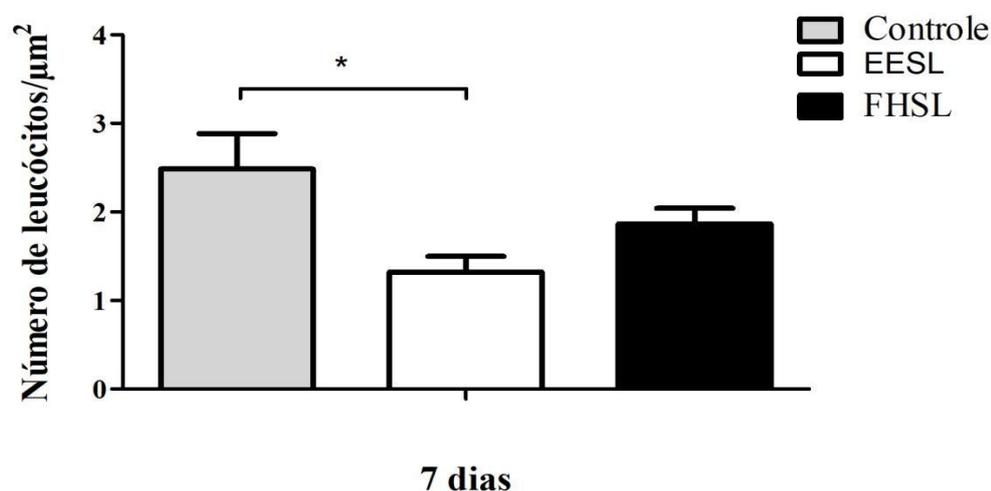
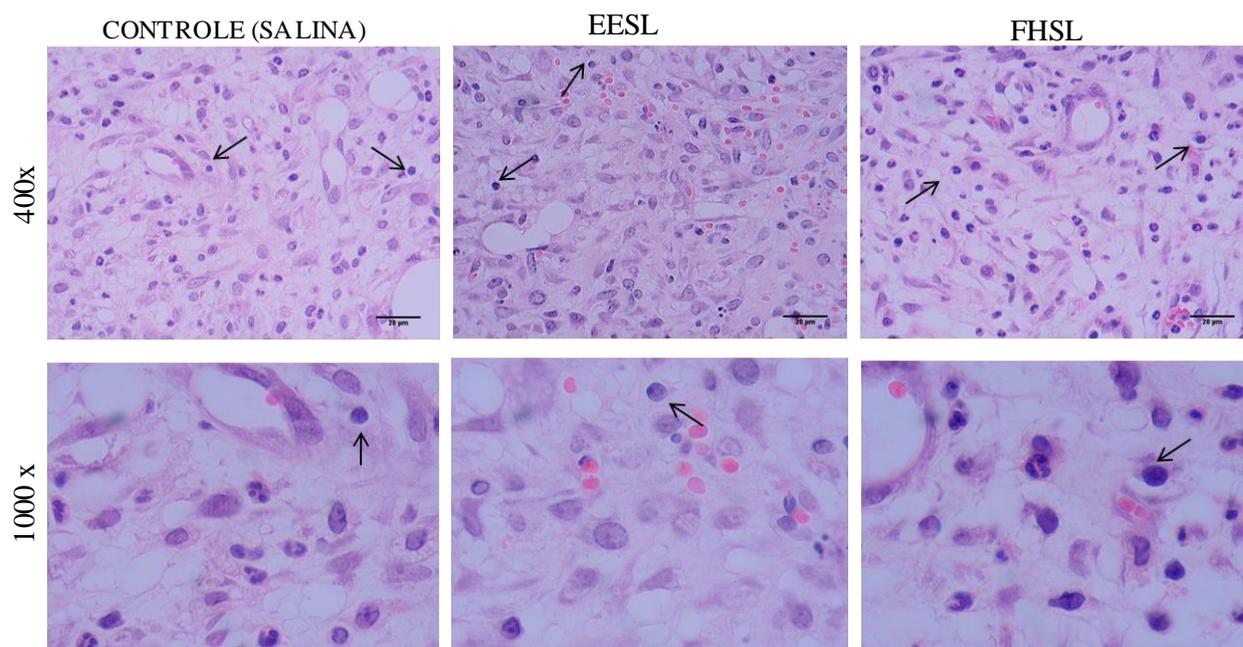


Figura 17: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* reduz o infiltrado de leucócitos após 7 dias. Em A, fotomicrografias representativas das áreas das lesões excisionais coradas em H&E dos grupos que receberam Solução salina (Controle), extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (EESL) e fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (FHSL) duas vezes ao dia por sete dias. As setas pretas finas indicam leucócitos. Aumento de 400x e 1000x. Escala de barras de 20 μm. Em B, avaliação morfológica de leucócitos. Observa-se uma redução significativa do infiltrado leucocitário no grupo EESL ($p=0,0285$) em relação ao grupo que recebeu apenas solução salina. Sendo $*=p\leq 0,05$. Valores expressos como média \pm SEM, com $n=6$, teste ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental, seguido por pós-teste Newman-Keuls.

O número de neovasos não foi estatisticamente diferente entre os três grupos após sete dias. Sendo, maior no grupo controle $0,065 \pm 0,0101/\mu\text{m}^2$ e menor no grupo EESL $0,031 \pm 0,0064/\mu\text{m}^2$ e no grupo FHSL $0,047 \pm 0,0221/\mu\text{m}^2$ conforme visto na figura 18.

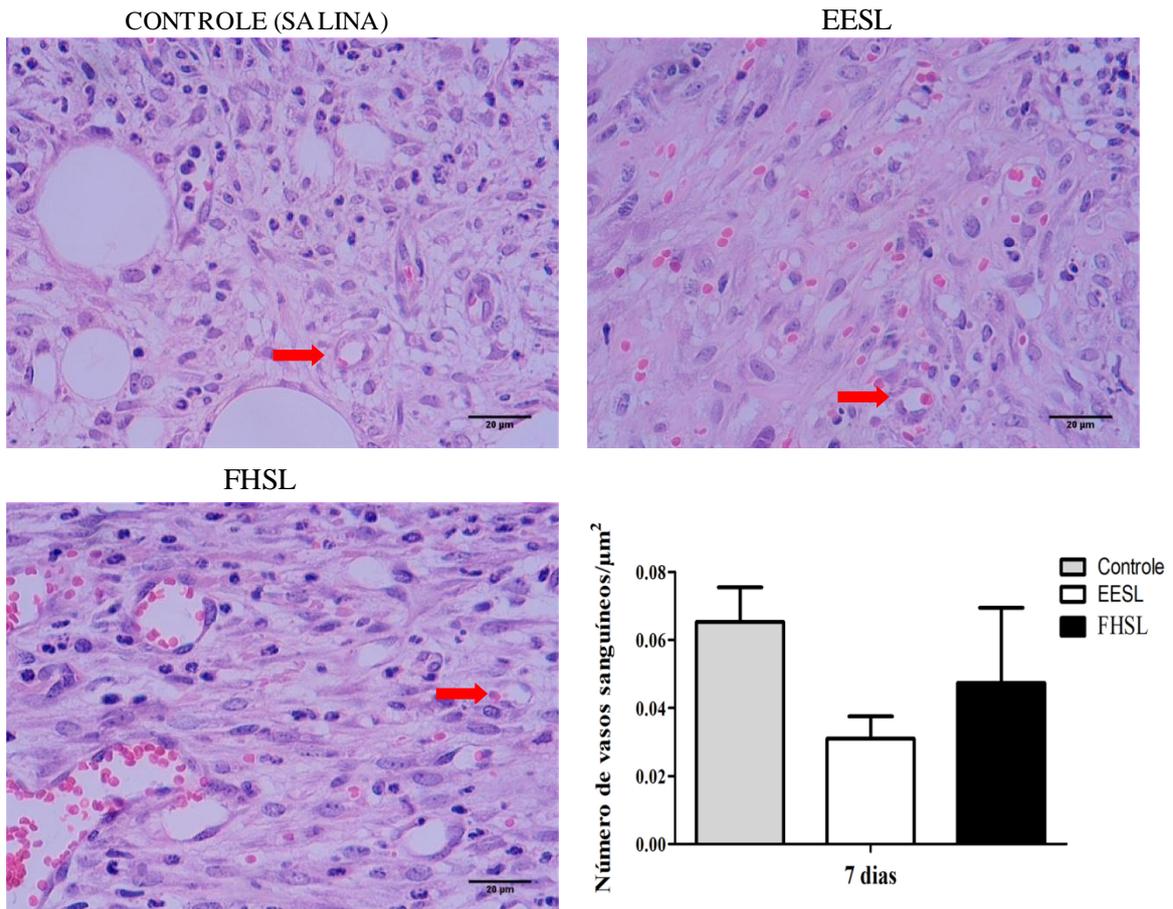


Figura 18: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* e da fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* não altera o número de novos vasos aos 7 dias. Fotomicrografias representativas das áreas de lesões excisionais coradas em H&E dos grupos que receberam Solução salina (Controle), extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (EESL) e fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (FHSL) por sete dias. As setas vermelhas indicam novos vasos. Aumento de 400x. Escala de barras de 20 µm. Avaliação morfométrica de neovasos sem diferenças significativas entre os grupos. Valores expressos como média ± SEM, com n=6, teste ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental, seguido por pós-teste Newman-Keuls.

Quanto ao número de fibroblastos nas análises quantitativas, aos sete dias não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos, conforme pode ser observado na figura 19, sendo o grupo Controle com $1,186 \pm 0,08617/\mu\text{m}^2$, o grupo EESL com $1,052 \pm 0,1811/\mu\text{m}^2$ e o grupo FHSL com $1,155 \pm 0,1366/\mu\text{m}^2$.

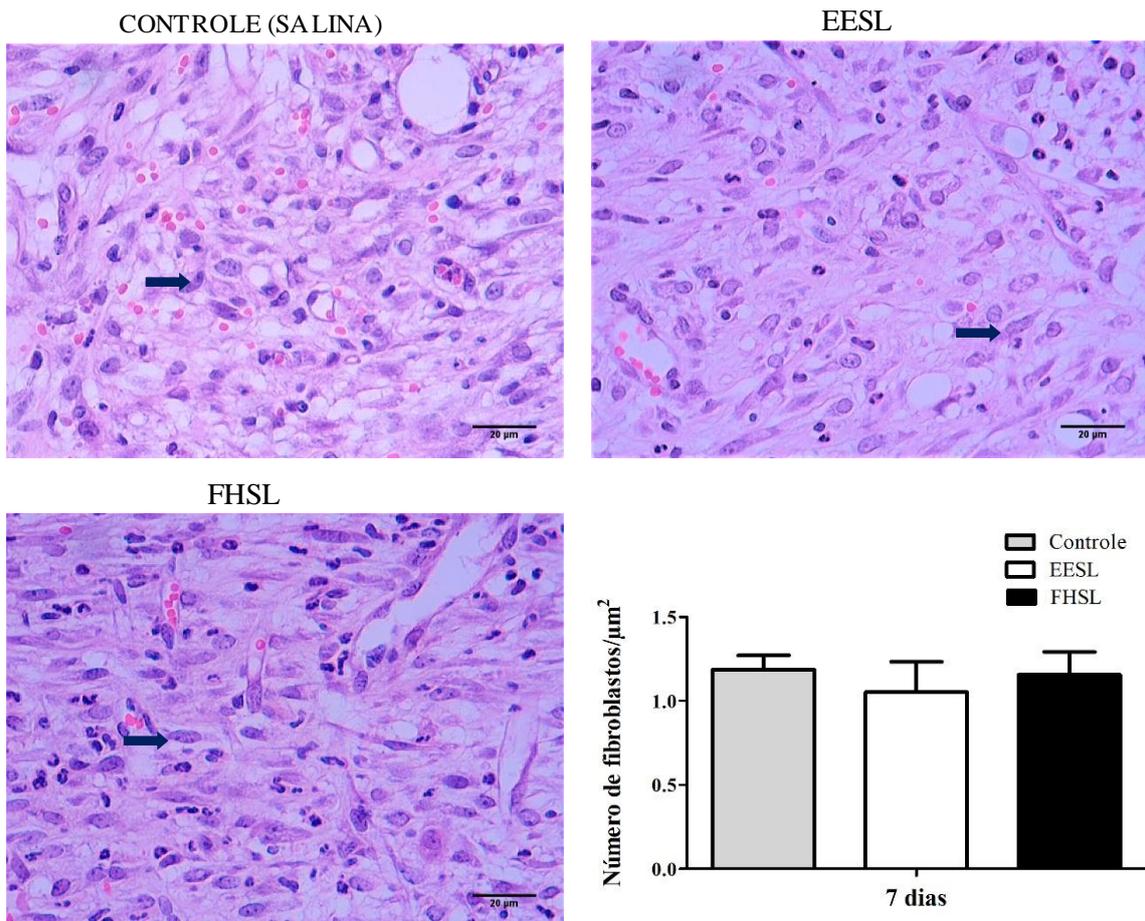


Figura 19: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* e da fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* não altera o número de fibroblastos aos 7 dias. Fotomicrografias representativas das áreas de lesões excisionais coradas em H&E dos grupos que receberam Solução salina (Controle), extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (EESL) e fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (FHSL) por sete dias. As setas pretas indicam fibroblastos. Aumento de 400x. Escala de barras de 20 µm. Avaliação morfométrica de fibroblastos sem diferenças significativas entre os grupos. Valores expressos como média ± SEM, com n=6, teste ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental, seguido por pós -teste Newman-Keuls.

Nas análises quantitativas de mastócitos, os quais foram evidenciados pela coloração Azul de toluidina aos sete dias não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos, conforme pode ser observado na figura 20, sendo o grupo Controle com $0,009686 \pm 0,006934/\mu\text{m}^2$, o grupo EESL com $0,006054 \pm 0,003942/\mu\text{m}^2$ e o grupo FHSL com $0,007265 \pm 0,004963/\mu\text{m}^2$. Do mesmo modo ao observado aos cinco dias, foi visto que essas células se encontram nas áreas de lesão em pouca densidade, estando mais concentradas nas áreas de pele intacta (Figura 21).

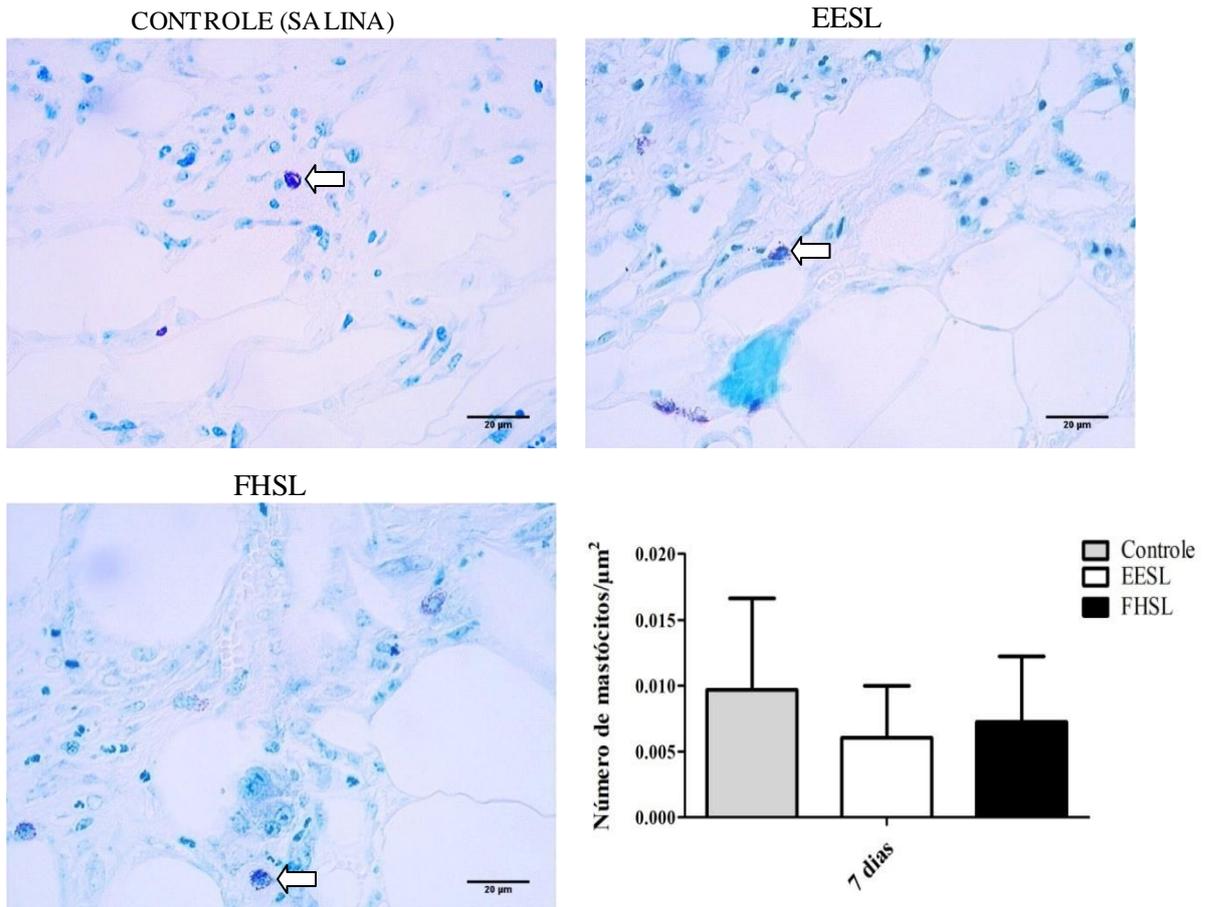


Figura 20: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* e da fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* não altera o número de mastócitos aos 7 dias. Fotomicrografias representativas das áreas de lesões excisionais coradas em Azul de toluidina para evidencição de mastócitos (setas brancas) nos grupos que receberam Solução salina (Controle), extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (EESL) e fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (FHSL) ao dia por sete dias. Setas brancas indicam mastócitos. Aumento de 400x. Escala de barras de 20 µm. Avaliação morfológica de mastócitos sem diferenças significativas entre os grupos. Valores expressos como média ± SEM, com n=6, teste ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental, seguido por pós-teste Newman-Keuls.

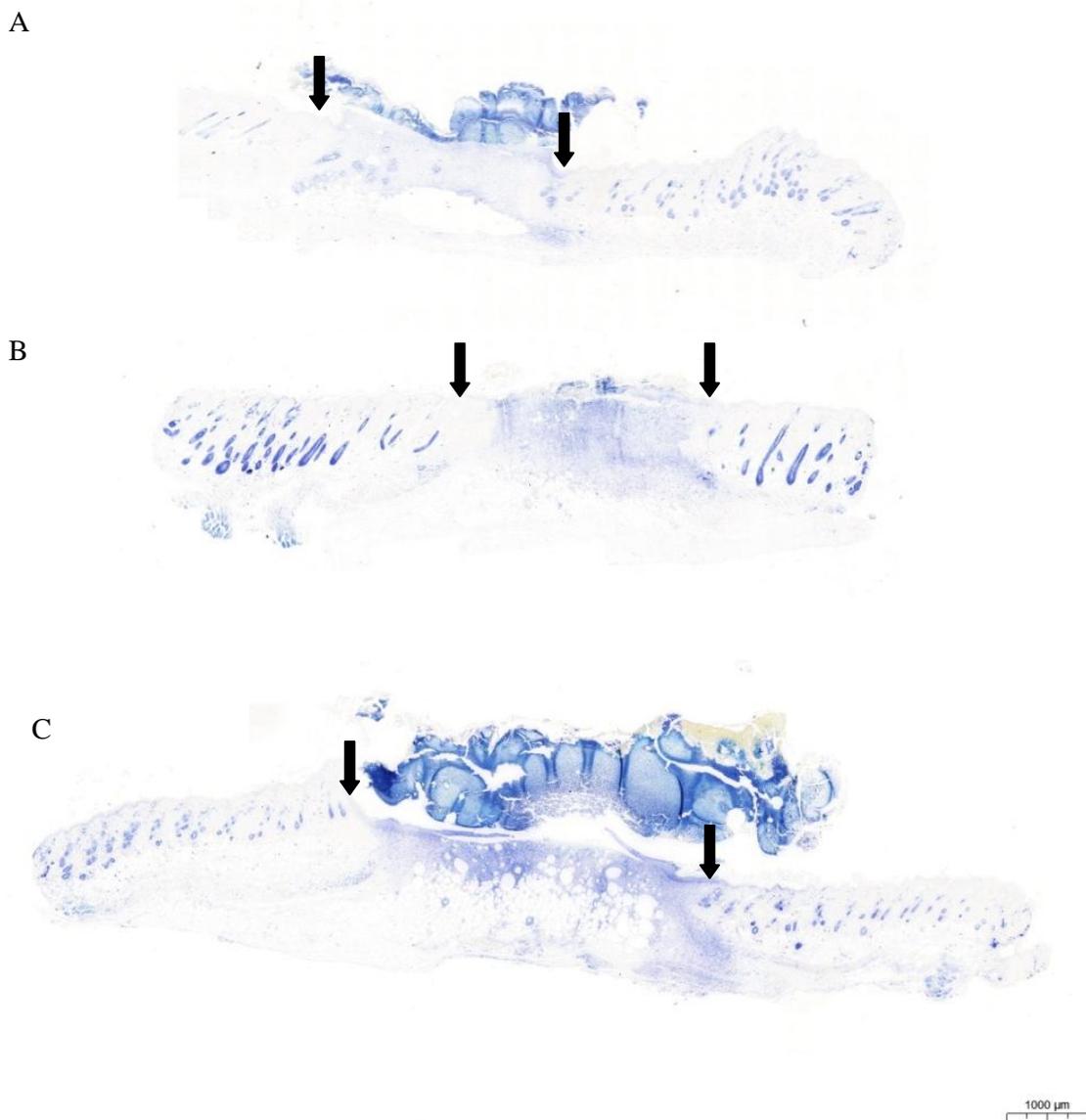


Figura 21: Fotomicrografias das lesões após sete dias de tratamento - coloração Azul de Toluidina. Nesse período foi observado poucos mastócitos nas áreas de lesão, sendo estes encontrados principalmente nas regiões adjacentes a ferida. Em A, ferida do grupo controle (salina), em B, ferida tratada com EESL e em C, ferida tratada com FHSL. Setas indicam início das áreas de lesão. Escala de barras 1000 μ m

5.2. 4. Avaliação histopatológica das lesões tratadas com EESL ou a FHSL por 21 dias:

Decorridos 21 dias após a confecção da lesão, as lâminas coradas em H&E foram analisadas quanto a reepitelização, depósito de matriz e presença de fibroblastos. Foi observado em todos os grupos a formação de tecido novo na área da lesão, configurando a cicatriz, com reepitelização completa em 4 animais do grupo controle, 5 animais do grupo

tratado com EESL e em 4 do grupo tratado com FHSL. O processo de remodelamento em todos os grupos ainda não encontrava-se concluído, com a presença de muitos leucócitos, principalmente mononucleares, vasos sanguíneos, fibrócitos e fibroblastos nas áreas da lesão (Figura 22).

No grupo controle, o novo tecido depositado possui espaços entre as fibras sendo encontradas entre estas principalmente fibroblastos, leucócitos, fragmentos celulares e vasos na região, bem como a presença de tecido adiposo. Na área da derme papilar ainda não é possível fazer a diferenciação em termos de disposição das fibras e presença de cristas epiteliais, no entanto é observada a disposição longitudinal de fibroblastos nesta região. O centro das lesões é o local onde se observa um depósito menos denso, as fibras estão dispostas longitudinalmente e com alguns espaços entre si. O novo epitélio é caracterizado por um maior número de camadas em relação ao tecido normal da lateral.

No grupo EESL, a região da derme apresenta depósito de fibras partindo das laterais com espaços entre si e com presença de leucócitos, fibroblastos e fibrócitos sendo a maioria dispostos na horizontal em regiões mais superficiais, além de fragmentos celulares e vasos sanguíneos na área de cicatriz. As fibras na área central da lesão são mais finas em relação às de depósito lateral, onde há um depósito levemente mais denso. Do mesmo modo, a região próxima ao epitélio apresenta um depósito mais longitudinal já regiões mais centrais o contrário ocorre com uma matriz mais densa. O novo epitélio possui número de camadas mais semelhante ao tecido normal. As áreas microscópicas das cicatrizes no grupo EESL se mostraram menores que dos grupos FHSL e controle pela avaliação qualitativa.

No grupo tratado com FHSL, a matriz já depositada na derme é relativamente mais densa do que a vista nos grupos tratado com EESL e controle, porém em menor quantidade e ainda com presença de tecido adiposo. Os fibroblastos e fibrócitos são vistos dispostos principalmente na horizontal na área superficial da derme e em número reduzido entre a massa tecidual depositada, na qual encontra-se também muitos leucócitos, vasos e restos celulares. O epitélio apresenta-se com um número um pouco maior de camadas que o controle na maioria dos animais, também não é possível detectar a presença de cristas e papilas dérmicas.

Não foi constatada a presença de novos nervos, folículos e glândulas em nenhum dos grupos. Sendo a cicatriz encontrada aos 21 dias no grupo EESL em estágio mais avançado embora todas se encontrem em processo de remodelamento.

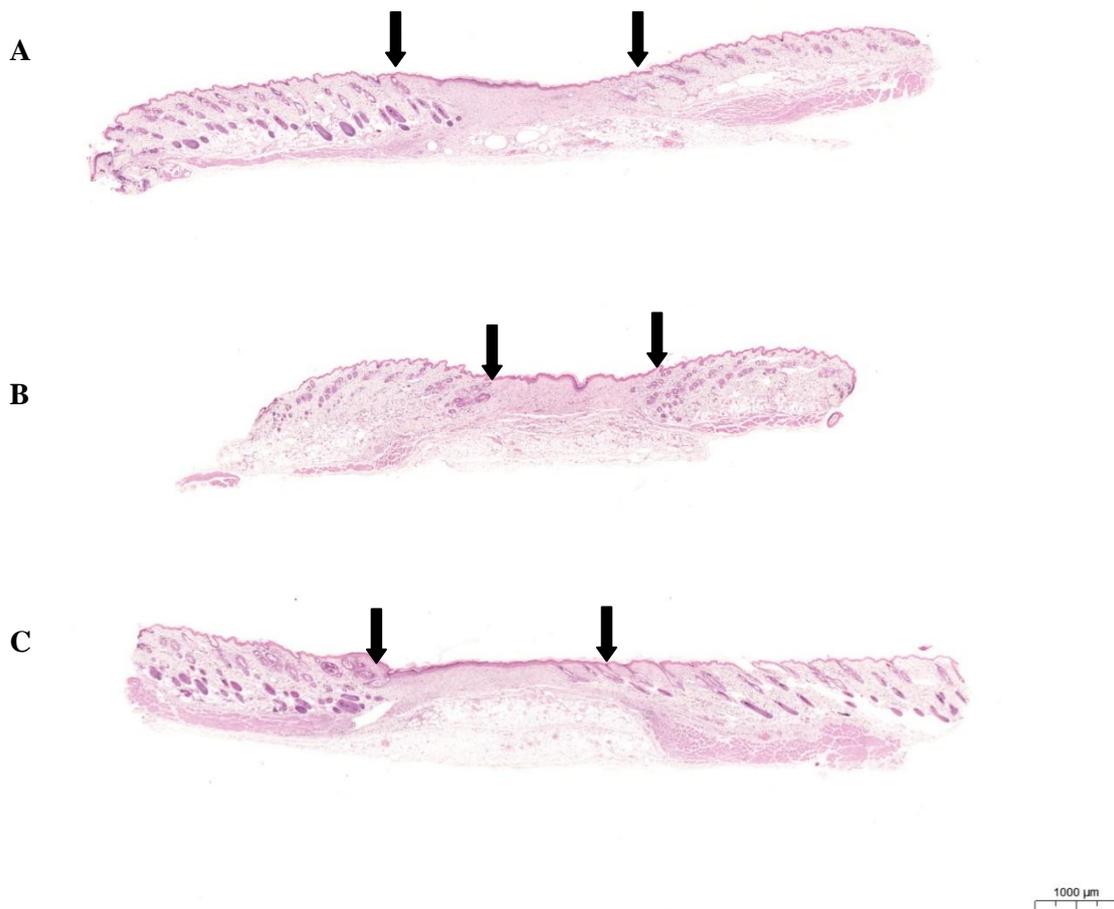


Figura 22: Fotomicrografias das lesões após vinte e um dias de tratamento – coloração Hematoxilina e Eosina. Observa-se em A,B e C as áreas de lesões com depósito de nova matriz em fase de remodelamento, o epitélio encontra-se restaurado sendo mais semelhante ao normal no grupo EESL. Em A, grupo controle (salina), em B, grupo tratado com EESL e em C grupo tratado com FHSL. Setas indicam início das áreas de lesão. Escala de barras 1000µm.

A análise morfológica de fibroblastos não identificou diferença significativa entre os grupos, sendo que, o grupo controle apresentou $0,837 \pm 0,1521/\mu\text{m}^2$, o grupo EESL $0,792 \pm 0,0466/\mu\text{m}^2$ e o grupo FHSL $0,610 \pm 0,1823/\mu\text{m}^2$ conforme a figura 23.

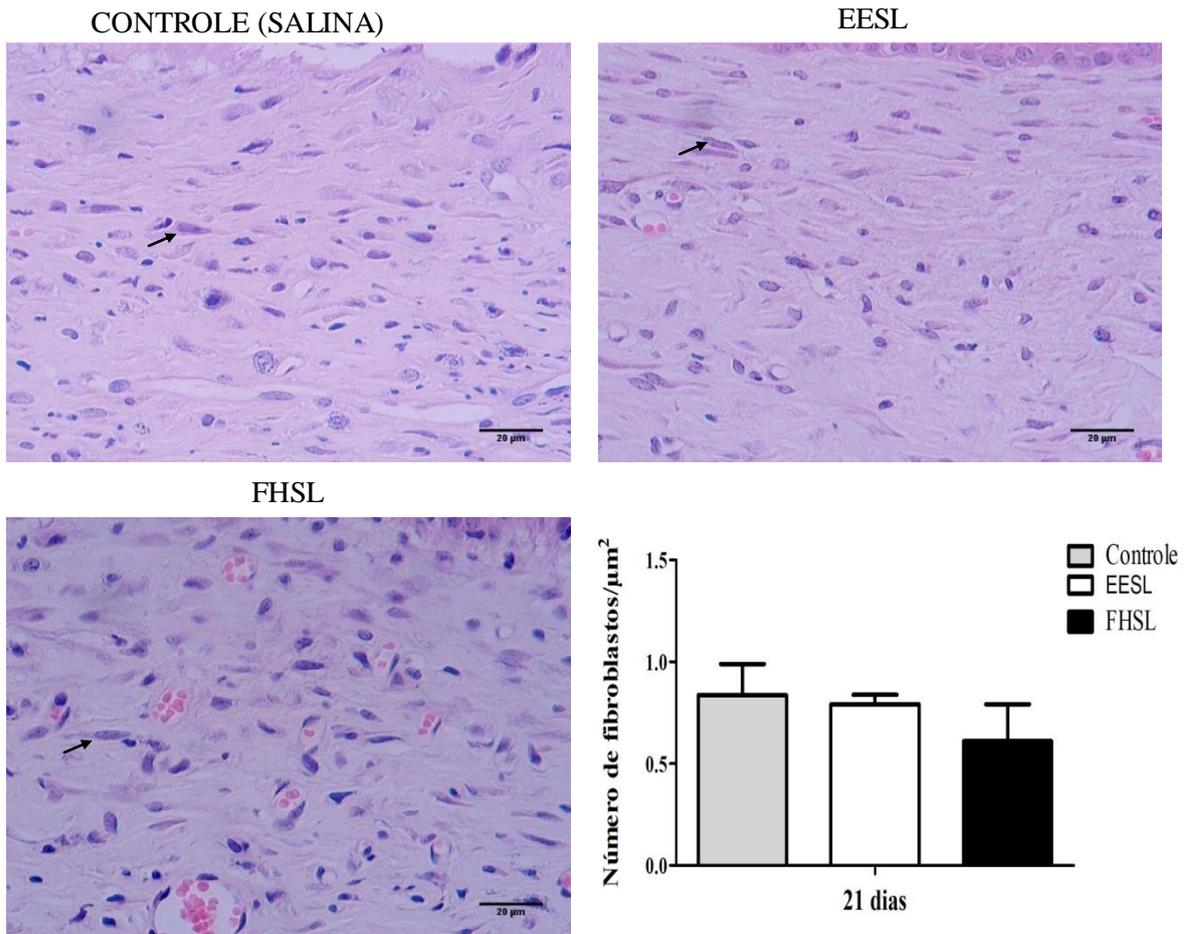


Figura 23: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* e da fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* não altera o número de fibroblastos aos 21 dias. Fotomicrografias representativas das áreas de lesões excisionais coradas em H&E dos grupos que receberam Solução salina (Controle), extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (EESL) e fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (FHSL) por 21 dias. As setas pretas indicam fibroblastos. Aumento de 400x. Escala de barras de 20 µm. Avaliação morfométrica de fibroblastos sem diferenças significativas entre os grupos. Valores expressos como média ± SEM, com n=6, teste ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental, seguido por pós -teste Newman-Keuls.

5.2.5. Análise qualitativa da deposição de colágeno nas áreas das lesões após 21 dias de tratamento

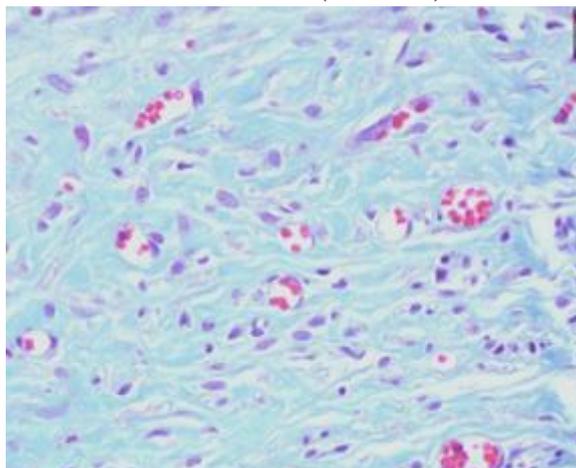
Após 21 dias, secções histológicas contendo as feridas de todos os grupos foram coradas pelo Tricrômico de Gomori e as fibras colágenas da região da lesão foram avaliadas qualitativamente quanto à sua disposição e similaridade à pele intacta (Figura 24).

No grupo controle, as fibras encontram-se dispostas de modo mais alinhado na superfície e denso nas áreas abaixo, embora menos espessas que no grupo FHSL, seguido pelo EESL e apresentam pouco entrelaçamento. No grupo EESL o depósito dessas fibras também se fez presente sendo visto de forma mais alinhada próximo a epiderme e mais entrelaçado nas áreas abaixo, o posicionamento de células como fibrócitos na maioria dos

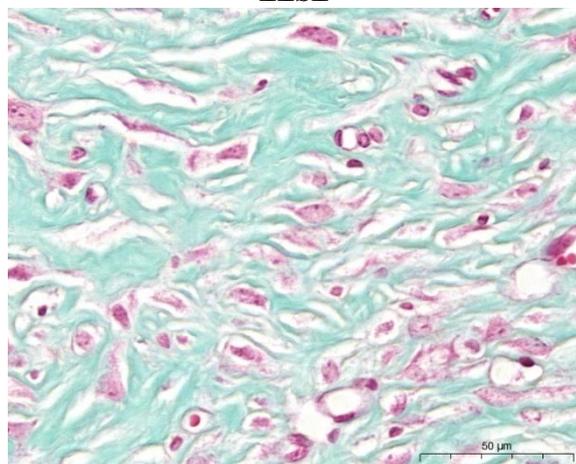
animais encontrava-se na posição mais horizontal e rica vascularização. O depósito de colágeno no grupo EESL é menor que os demais grupos no entanto preenche a área de cicatriz, as áreas finais da derme apresentam características mais similares aos tecidos não feridos adjacentes, embora o panículo carnoso esteja ausente em todos grupos e não há presença de nervos, glândulas e folículos nas áreas da ferida. O controle assemelha-se mais ao grupo EESL, no entanto o depósito não apresenta muitas diferenças entre as regiões da derme, com depósito homogêneo como no grupo FHSL embora com fibras mais finas que este.

Foi visto que os animais tratados com a fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* apresentaram fibras na área de lesão já depositadas na maioria dos animais com aspecto mais espesso, sendo visto nesse grupo fragmentos celulares dispostos na horizontal e presença de vasos e outras células entremeadas a densa matriz. No grupo FHSL além da maior celularidade que nas regiões adjacentes o depósito é mais homogêneo em toda área da derme com poucas diferenças entre a região onde seria a derme papilar e as áreas mais centrais. Nota-se, portanto que em todos os grupos o processo de remodelamento está em andamento.

CONTROLE (SALINA)



EESL



FHSL

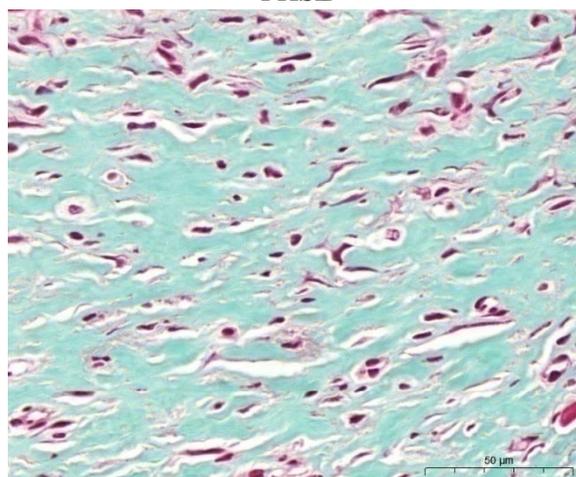


Figura 24: A aplicação tópica de extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* e da fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* altera a disposição de fibras e células aos 21 dias. Fotomicrografias representativas das áreas de lesões excisionais coradas em Tricrômico de Gomori dos grupos que receberam Solução salina (Controle), extrato etanólico do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (EESL) e fração hidroetanólica do fruto maduro de *Solanum lycocarpum* (FHSL) duas vezes ao dia por 21 dias. Aumento de 400x. Escala de barras de 20 e 50 µm.

6. DISCUSSÃO

Este estudo avalia os efeitos de *S. lycocarpum* A. St. Hil. sobre a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos. O processo de cicatrização engloba quatro fases com eventos celulares e moleculares sequenciais que ocorrem de maneira sobreposta e com sincronia de diferentes células de modo complexo. Após um dano inicia-se a fase de hemostasia, seguida pelas etapas inflamatória, proliferativa e finalizando com o remodelamento da nova matriz depositada (GANTWERKER, & HOM, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2019).

São relatados na literatura efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos importantes para diversas espécies do gênero *Solanum*, sendo de grande relevância estudos que investigam as propriedades químicas e terapêuticas envolvendo suas espécies (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). A inibição de radicais livres por substâncias antioxidantes e o controle de microrganismos são estratégias para a melhoria do reparo tecidual (ALI *et al.*, 2020). Diante dessas motivações, o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do uso tópico do extrato etanólico e da fração hidroetanólica do fruto maduro do *S. lycocarpum* no processo de cicatrização de feridas cutâneas induzidas experimentalmente em camundongos. Os resultados obtidos no presente estudo indicam possível atuação do extrato etanólico do fruto maduro de *S. lycocarpum* e sua fração hidroetanólica nas fases inflamatória e proliferativa do processo de cicatrização de lesões cutâneas.

O modelo de lesão excisional utilizado permite o acompanhamento do fechamento de feridas e o monitoramento do tecido através de análises histopatológicas e moleculares (MOREIRA *et al.*, 2015). Um dia após os tratamentos tópicos as lesões se mostraram com a presença de tampão hemostático rico em fibrina e restos celulares. Nesse período é iniciada a etapa inflamatória, com importância para remoção de patógenos e restos celulares, mas que também caso seja desregulada pode levar, por exemplo, a formação de cicatrizes patológicas e até mesmo a interrupção da arquitetura e função do tecido, além da cronificação da doença (EMING, WYNN & MARTIN, 2017).

A análise morfométrica dos leucócitos, após um dia de tratamento tópico com EESL e FHSL, revelou uma redução significativa dessas células em relação ao grupo controle, com predomínio de neutrófilos. O pico de neutrófilos ocorre em torno de 24 horas após a lesão, visando principalmente a proteção contra microorganismos, através da fagocitose. No entanto, esse processo pode gerar o ataque aos tecidos adjacentes à lesão devido à liberação de

proteases, radicais livres e espécies reativas de oxigênio que ocorre para a eliminação de patógenos (MARTIN, LEIBOVICH, 2005).

A exacerbação do estágio inflamatório pode prejudicar o andamento da cicatrização e até mesmo tornar a ferida crônica (LAROUCHE *et al.*, 2018). É provável, diante de nossas análises, que o EESL e a FHSL tenham reduzido de alguma forma o recrutamento de leucócitos para o local de lesão. Do mesmo modo, a depleção de neutrófilos por injeção de soro policlonal em camundongos foi capaz de melhorar a cicatrização de feridas, com aceleração do processo de fechamento das lesões, indicando que essas células podem ter importantes efeitos ao retardar o fechamento das lesões, embora tenha importância na proteção contra infecções (DOVI, HE & DIPIETRO, 2003).

Podemos apontar, que a utilização de substâncias que atuem na modulação da atividade de neutrófilos ou ainda de outros tipos de leucócitos podem interferir beneficemente em outras etapas do processo de cicatrização, como observado no estudo de Ahmad e colaboradores (2021), no qual a aplicação tópica de pomadas contendo o extrato de *Marantodes pumilum* (Blume) Kuntze em modelo de ferida excisional em ratos Sprague-Dawley foi capaz de melhorar a resolução da inflamação e em consequência acelerar o processo de cicatrização, juntamente com sua capacidade antioxidante. Interessantemente, os autores propuseram que tais efeitos podem estar correlacionados aos fitoquímicos presentes em tal espécie como ácido gálico, ácido elágico e ácido cafeico (AHMAD *et al.*, 2021).

Ao analisar o potencial antioxidante, antibacteriano e citotóxico do extrato dos frutos maduros de SL e suas frações, Morais e colaboradores (2015) encontraram compostos fenólicos como principais componentes dos extratos, principalmente ácidos cinâmicos, como o cafeico e o clorogênico. Evidenciaram ainda, o alto potencial antibacteriano seletivo do extrato e suas frações, para bactérias gram-positivas, tais como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes* e outras cepas de importância médica. Estas propriedades são importantes para a evolução/modulação do reparo de feridas na pele, uma vez que podem favorecer a manutenção da homeostase tecidual e celular, ao longo das etapas de recuperação da arquitetura tecidual.

No estudo de Izundu e colaboradores (2021), foi detectada atividade antimicrobiana com a utilização de extrato etanólico de *Azadirachta indica* para *E. coli*, o qual apresentou também efeitos positivos após uso tópico sobre a cicatrização de feridas cutâneas, tanto em ratos saudáveis quanto em diabéticos infectados, destacando o fato de que aplicações tópicas de extratos tem boa disponibilidade e podem se apresentar como métodos terapêuticos

eficientes para eliminação de microorganismos. Este fator contribui para a cicatrização e está relacionado com a presença de substâncias bioativas na espécie tais como flavonoides. Embora não trabalhemos neste estudo com feridas potencialmente contaminadas, destacamos a necessidade de mais estudos para verificação de tais efeitos.

Cinco dias após o tratamento tópico com EESL e FHSL, todas as lesões já possuíam crostas formadas, quebradiças e se desprendendo em alguns animais. Além das crostas, que podem ser responsáveis por reduzir a força tênsil de contração (SCHIRATO *et al.*, 2006), não foram observados macroscopicamente outros fatores que pudessem interferir no fechamento das feridas. Nesse período, é normal que as crostas comecem a se desprender indicando avanço da re-epitelização (AHMAD *et al.*, 2021). Microscopicamente, a análise histopatológica após cinco dias demonstrou que todas as feridas apresentavam crostas com material fibrinoso e eosinofílico. Esse tampão de fibrina superficial representa o resultado da fase de hemostasia com a finalidade de preencher e vedar a área removida (GARROS *et al.*, 2006).

Schirato e colaboradores (2006) ao estudarem o efeito do polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. em lesões cutâneas, demonstraram que animais tratados com o polissacarídeo apresentaram no 5º dia de lesão a redução de sinais macroscópicos de edema e hiperemia, sem diferenças significativas nas áreas e contração das feridas, mas já apresentaram neovascularização e fibroblastos na derme. Foi verificada nesse mesmo estudo no 2º e 3º pós lesão, que as áreas de todos os grupos se mostraram maiores que da lesão inicial, fator esse correlacionado a crosta e edema nas feridas nesse período, as diferenças não significativas até então encontradas assim como neste estudo podem se relacionar ao fato de que durante etapa inflamatória, não há redução significativa das áreas devido ao baixo número de miofibroblastos (SCHIRATO *et al.*, 2006; GUO & DI PIETRO, 2010).

Quanto à morfometria dos leucócitos, após cinco dias de tratamento, a tendência de redução observada foi mantida. Observa-se uma redução significativa do infiltrado inflamatório nos grupos tratados com SL, em relação ao grupo controle, com predomínio de células mononucleares, como os linfócitos. A reação inflamatória como visto dura em média de três a sete dias com papéis importantes no andamento do reparo, nota-se em relação aos grupos controle 5 dias uma tendência de redução no número de leucócitos ao longo do tempo pelos tratamentos.

A análise morfométrica dos vasos sanguíneos, nos grupos tratados por cinco dias, não demonstrou diferenças significativas, embora na análise qualitativa pode-se notar uma

presença discretamente maior de neovasos nos grupos tratados. Quanto ao número de fibroblastos foi percebido um aumento numérico discreto dessas células no grupo tratado com extrato etanólico de SL pela análise histopatológica e nenhuma diferença significativa na análise estatística. A fase proliferativa é caracterizada pela proliferação de vasos, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos e depósito de tecido de granulação (VELNAR, BAILEY & SMRKOL, 2009). No presente estudo, aos cinco dias de tratamento, pôde-se observar o início dessa etapa em todos os grupos.

Através da avaliação macroscópica após 7 dias dos tratamentos, foi possível verificar uma crosta de tamanho exacerbado no grupo tratado com FHSL, com maiores áreas de ferida durante a planimetria. De acordo com Ansell e colaboradores (2014), a planimetria de feridas excisionais fornece dados satisfatórios, entretanto, nesse tipo de lesão a correlação entre parâmetros planimétricos e histológicos é menos fidedigna que em lesões incisionais e reiteram ainda que em análises que se utilizam medições histológicas a variabilidade dos achados é substancialmente menor. Diante disso, pode-se inferir que as crostas grandes apresentadas pelo grupo possam ter obscurecido em parte o real tamanho das lesões, sendo visto posteriormente na avaliação microscópica, uma reepitelização em fase inicial abaixo das crostas.

A avaliação microscópica, após sete dias, demonstrou ainda que os animais dos grupos controle e EESL apresentaram crostas relativamente menores, parcialmente desprendidas, com maior tecido de granulação depositado, com presença de fibroblastos e leucócitos, principalmente nas bordas da lesão e reepitelização mais avançada. No grupo FHSL, além da presença de crostas grandes sobre as lesões, foi visto um depósito de menor tecido de granulação e a presença de mais focos inflamatórios. A taxa de fechamento e a reepitelização, na avaliação da cicatrização, é o primeiro parâmetro e mais intuitivo para mostrar a velocidade de cicatrização de feridas (LIANG *et al.*, 2021). Aqui, tomando como base tal parâmetro, a cicatrização encontra-se em estágio mais avançado no grupo EESL.

Na análise morfométrica de leucócitos, após sete dias de tratamento, foi visto uma redução significativa do infiltrado inflamatório no grupo tratado com EESL em relação aos outros grupos. Nas análises é possível notar um declínio dessas células em comparação aos grupos estudados, indicando que o tratamento com extrato etanólico de *S. lycocarpum* pode ter afetado a dinâmica dos leucócitos no local da ferida, tendo talvez um efeito anti-inflamatório ao longo dos períodos de 1, 5 e 7 dias de tratamento. A análise morfométrica dos

vasos e dos fibroblastos, após sete dias de tratamento, não demonstrou diferenças significativas entre os grupos.

No presente estudo, foi verificada a redução de leucócitos nas etapas iniciais do reparo de feridas, após a administração tópica do EESL e FHSL. Benvenuti e colaboradores (2021), ao estudarem a atividade anti-inflamatória e cicatrizante da espécie brasileira *S. diploconos* (Mart.) Bohs, observaram que o extrato hidroalcoólico dessa planta foi capaz de reduzir significativamente os níveis de secreção de óxido nítrico e citocinas pró inflamatórias tais como TNF α , IL1- β e IL-6 por neutrófilos, bem como ser capaz de alterar a quimiotaxia e recrutamento desses leucócitos ao impedir a clivagem de I-selectina, além de ser capaz de reduzir o número de macrófagos, possuindo assim uma atividade anti-inflamatória. Paralelo a isso, demonstraram sua capacidade em induzir a proliferação de fibroblastos *in vitro* e atividade cicatrizante *in vivo*, correlacionando tais efeitos de resolução da inflamação à presença de ácidos fenólicos, como o ácido cafeico, ferúlico e cumarico no extrato dos quais alguns podem ser também encontrados no fruto maduro de *S. lycocarpum* e estarem correlacionados com os resultados aqui obtidos.

Wang e colaboradores (2014), ao estudar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto e frações obtidas dos frutos verdes de *S. integrifolium* Poir., apontam novamente os compostos fenólicos como responsáveis pela atividade ali verificada para a espécie, como capacidade de reduzir a produção de NO, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Essas substâncias também são apontadas no estudo como potenciais inibidores de COX-2 e nesse sentido, como potenciais no tratamento e prevenção de doenças, como em casos de inflamações crônicas podendo modular a inflamação, ainda nesse contexto é válido ressaltar que algumas abordagens utilizando inibidores de COX-2 a curto prazo, podem se mostrar benéficas no tratamento de feridas (SHUKLA *et al.*, 2019).

Ao avaliar os efeitos de uma pomada de *S. tuberosum* L., em lesões incisionais de camundongos Balb/ c, Rosas-Cruz e colaboradores (2020) detectaram uma maior taxa de contração das lesões após aplicação diária das pomadas por um período de sete dias, parâmetro este utilizado no sentido de avaliar a evolução do processo de cicatrização. Em suas análises histopatológicas foram verificados efeitos benéficos sobre a re-epitelização, aumento de fibroblastos com disposição na horizontal e do padrão de depósito de fibras colágenas. Neste mesmo estudo, discute-se os efeitos da sinalização redox sobre a cicatrização na qual o peróxido de hidrogênio e o superóxido são apontados como mensageiros intracelulares importantes para estimular as fases principais da cicatrização de feridas, bem como o

recrutamento de células, produção de citocinas e angiogênese. Os fitoconstituintes de *S. tuberosum* tais como ácidos fenólicos, flavonoides, polifenóis e ácido clorogênico, apresentam diversos relatos de atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antibacterianas, sendo associados na melhoria da cicatrização de feridas, e nesse estudo, os autores apontam um possível efeito sinérgico sobre o reparo.

A espécie *S. lycocarpum* aqui estudada possui uma gama de efeitos já elucidados na literatura como já mencionado anteriormente. Vieira Junior e colaboradores (2003) demonstraram em estudo, que a fração alcaloide de frutos de *S. lycocarpum* reduziu de modo dose dependente a formação de edema e a migração leucocitária, sugerindo como responsáveis por tais efeitos os compostos alcaloides esteroidais do extrato. Morais e colaboradores (2020), relataram o efeito anti-inflamatório, antioxidante e antinociceptiva do extrato etanólico do fruto maduro de *S. lycocarpum*, apontando como responsáveis por tais efeitos o sinergismo entre os vários compostos ativos presentes, como os alcaloides solasodina e peiminina, e os ácidos fenólicos. Do mesmo modo, Costa e colaboradores (2015), detectaram a presença de flavonoides como apigenina e kaempferol, e associaram a atividade anti-inflamatória, antioxidante e antibacteriana do extrato e suas frações obtidas através de folhas de SL a tais constituintes fenólicos. Diante disso, é possível sugerir que o efeito aqui observado sobre o número de leucócitos durante a etapa inflamatória da cicatrização de feridas, tenha relação com os efeitos sinérgicos de tais constituintes do fruto maduro.

Mastócitos são células que possuem diferentes papéis sobre os eventos da cicatrização, aqui analisamos a presença dessas células aos 5 e 7 dias. Sabe-se que tais células são recrutadas rapidamente em situações danosas por já estarem presente na derme, estão envolvidos no recrutamento de neutrófilos e liberação de mediadores participantes no aumento da permeabilidade vascular (EGOZI *et al.*, 2003), são também relacionados ao processo de proliferação e remodelamento da matriz celular e correlacionados ao desenvolvimento de cicatrizes hipertróficas (NG, 2010). Em nossas análises, não encontramos diferenças estatisticamente significativas nas comparações entre os grupos, embora os grupos tratados apresentassem um número menor dessas células em ambos os períodos.

À medida que o processo de cura avança é notado o aumento da concentração de colágeno nas áreas de granulação (YARISWAMY, *et al.*, 2013). Após 21 dias de tratamento, foi feita uma avaliação da deposição de colágeno ao longo da cicatrização das feridas. Foi constatada uma melhoria do aspecto da cicatriz e período de fechamento pelos tratamentos,

destacando-se o EESL que promoveu uma reepitelização mais eficiente e com aspecto mais semelhante ao tecido normal, com depósito entrelaçado, com fibras relativamente maiores que no grupo controle e organização melhor que no tratado com fração hidroetanólica de *S. lycocarpum*.

Alguns estudos demonstram que o processo de cicatrização é proporcional a biossíntese de colágeno, Parmar e colaboradores (2018), ao avaliarem o processo de cicatrização a partir da utilização de *S. xantocarpum* em tratamento tópico e oral num modelo animal diabético, relatam que o aumento do conteúdo de colágeno na área de lesão tenha correlação com o aumento da resistência à ruptura observada nos animais que receberam tratamento. Da mesma forma, apontam que a redução da alta quantidade de óxido nítrico e demais atividades antioxidantes promovidas pelos tratamentos possam ser responsáveis pelo aumento da deposição de colágeno e, conseqüentemente, da taxa de cicatrização. A atividade antioxidante de tal espécie é atribuída ao seu conteúdo de flavonoides e compostos fenólicos, que possuem também potencial em estimular a síntese de colágeno e proliferação celular. Assim, os autores apontam tais fitoconstituintes como capazes de atuar em diferentes níveis do processo cicatricial. Outro composto apontado com tais atividades é o ácido clorogênico também presente nesta espécie (PARMAR *et al.*, 2018).

Em paralelo, no estudo de Moraes e colaboradores (2015), uma avaliação pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência indicou que o extrato etanólico de frutos maduros de *S. lycocarpum* apresenta como principais componentes fenólicos, o ácido clorogênico e o ácido cafeico. Neste estudo, o depósito avançado de tecido de granulação observado aos sete dias, juntamente com um processo cicatricial seguindo um percurso melhor após 21 dias de tratamento, pode ser em parte atrelado a presença de tais fitoconstituinte no EESL, além do potencial anti-inflamatório observado nas etapas iniciais no modelo estudado.

O colágeno apresenta importância estrutural e pode ser utilizado na determinação da função tecidual, anormalidades morfológicas nas fibrilas de colágeno são evidenciadas em vários tipos de displasias (COSTA *et al.*, 2019). No processo cicatricial estudado, a deposição mais semelhante as áreas sem lesão representa melhoria no depósito e síntese de tais fibrilas. Destaca-se também a redução da área de cicatriz pelo extrato etanólico de SL, resultando em tecido não funcional menor.

No estudo de Moraes e colaboradores (2020), que avaliaram a fase aguda do processo inflamatório após tratamento por via intraperitoneal com EESL, os autores apontam como responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios observados a presença de alcaloides e ácido

cafeico no extrato. Na fração hidroetanólica é verificado um teor maior de flavonoides que no extrato etanólico (MORAIS, 2018), fator este que pode ser correlacionado ao efeito de FHSL sobre a deposição de colágeno neste estudo, embora tenha-se observado atraso em parâmetros inflamatórios, talvez pela menor quantidade de compostos fenólicos e taninos em relação ao EESL.

A atividade anti-inflamatória de alguns fenóis com ação antioxidante parece estar relacionada ao bloqueio ou inibição do fator de transcrição NF-KB, a via em que este atua como regulador é importante na sinalização para transcrição de genes inflamatórios (YANG *et al.*, 1998). A supressão da resposta inflamatória em terapêuticas empregadas para a cura de feridas apresenta-se nesse sentido como uma alternativa importante, sendo tal via apontada com um potencial alvo para regulação da inflamação (MA *et al.*, 2021). Antioxidantes tais como os polifenóis são bem caracterizados na cicatrização de feridas, com ações importantes nas fases de inflamação, proliferação, migração e angiogênese. Além disso, são também utilizados em formulações cosmecêuticas (VIANÃ-MENDIETA, SÁNCHEZ & BENAVIDES, 2021). A combinação dos efeitos de fitocompostos vegetais mostra-se promissora e tal qual neste estudo se apresenta como uma fonte alternativa para o desenvolvimento de novas formulações.

Em resumo, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a espécie *S. lycocarpum* pode apresentar efeitos benéficos sobre a cicatrização de feridas em camundongos, com efeitos modulatórios benéficos sobre a inflamação e proliferação tecidual após a aplicação tópica de extrato etanólico ressuspenso em salina. Nesse sentido, mais estudos sobre os efeitos dessa espécie como alternativa adicional em tratamentos de feridas se fazem necessários. Caso seja confirmado tal potencial a partir de novos estudos, a utilização dessa espécie pode abrir novas perspectivas em termos de formulações fitoterápicas para tratamento de feridas cutâneas.

7. CONCLUSÃO

Nesse estudo foi verificado que o extrato etanólico de *S. lycocarpum* e sua fração hidroetanólica podem atuar sobre a dinâmica de células inflamatórias no processo de cicatrização de feridas em camundongos. Além disso, o extrato etanólico se mostrou com um melhor efeito anti-inflamatório nos períodos iniciais e sobre o processo de cicatrização como um todo, uma vez que contribuiu para uma melhor e mais rápida reepitelização, melhor depósito de tecido de granulação e menor área de cicatriz. Esse estudo é o primeiro a avaliar os efeitos do extrato etanólico e da fração hidroetanólica de tal espécie sobre a cicatrização de ferida. Os resultados alcançados abrem perspectivas para a realização de estudos adicionais, a fim explicar os mecanismos que possam estar envolvidos nos efeitos observados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AHMAD, Shihab Uddin *et al.* Evaluation of wound-healing and antioxidant effects of *Marantodes pumilum* (Blume) Kuntze in an excision wound model. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 228, 2021.
- AKITA, Sadanori; AKINO, Kozo; HIRANO, Akiyoshi. Basic fibroblast growth factor in scarless wound healing. **Advances in wound care**, v. 2, n. 2, p. 44-49, 2013.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. Fitoterapia: Uma alternativa para quem? **Cadernos de extensão**. [S. l.], v.1, n.1, p.41-50, 1998.
- ALI, Aaliya *et al.* A novel herbal hydrogel formulation of moringa oleifera for wound healing. **Plants**, v. 10, n. 1, p. 25, 2020.
- ALVES, Amanda Almirão *et al.* Medicina Popular e Diabetes Melito Tipo 1: uma Perspectiva de Tratamento Através da Fruta da Lobeira. *Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde*, v. 20, n. 1, 2016.
- ANDRADES, Patricio; BENÍTEZ, Susana; PRADO, Arturo. Recomendaciones para el manejo de cicatrices hipertróficas y queloides. **Revista chilena de cirugía**, v. 58, n. 2, p. 78-88, 2006.
- ANSELL, David M. *et al.* A statistical analysis of murine incisional and excisional acute wound models. **Wound repair and regeneration**, v. 22, n. 2, p. 281-287, 2014.
- AOKI, Hitomi *et al.* Two distinct types of mouse melanocyte: differential signaling requirement for the maintenance of non-cutaneous and dermal versus epidermal melanocytes. 2009.
- BARKER, Jonathan NWN *et al.* Keratinocytes as initiators of inflammation. **The Lancet**, v. 337, n. 8735, p. 211-214, 1991.
- BATISTA, E. K. F. *et al.* Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 433-441, 2016.
- BEANES, Steven R. *et al.* Confocal microscopic analysis of scarless repair in the fetal rat: defining the transition. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 109, n. 1, p. 160-170, 2002.
- BEANES, Steven R. *et al.* Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . **Expert reviews in molecular medicine**, v. 5, n. 8, p. 1-22, 2003.
- BENKHALED, A. *et al.* Phytochemical profile, antioxidant activity and wound healing properties of *Artemisia absinthium* essential oil. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 10, n. 11, p. 496, 2020.

BENVENUTTI, Larissa *et al.* Anti-inflammatory and healing activity of the hydroalcoholic fruit extract of solanum diploconos (Mart.) Bohs. **Journal of Immunology Research**, v. 2021, 2021.

BLANPAIN, Cédric; FUCHS, Elaine. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 10, n. 3, p. 207-217, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 jun.2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília, 2006.

BRITO, Patrícia Alves; DE VASCONCELOS GENEROSO, Simone; CORREIA, Maria Isabel Toulson Davisson. Prevalence of pressure ulcers in hospitals in Brazil and association with nutritional status—a multicenter, cross-sectional study. **Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 646-649, 2013.

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

BUZZI, Marcelo; FREITAS, Franciele de; WINTER, Marcos de Barros. Cicatrização de úlceras por pressão com extrato Plenusdermax® de Calendula officinalis L. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 69, p. 250-257, 2016.

CHEIKHYOUSSEF, A.; SHAPI, M.; MATENGU, K.; ASHEKELLE, H. M. Ethnobotanical study of indigenous knowledge on medical plant use by tradition alhealers in Oshikoto region, Namibia. **Journal of Ethnobiology and Etnomedicine**, v. 7, n.10, p. 1-11, mar. 2011.

CLARK, Richard AF. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. **Journal of the American academy of Dermatology**, v. 13, n. 5, p. 701-725, 1985.

CRISTÓBAL, Lara *et al.* Local growth hormone therapy for pressure ulcer healing on a human skin mouse model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 4157, 2019.

COSTA, Guilherme Augusto Ferreira *et al.* Antioxidant, antibacterial, cytotoxic, and anti-inflammatory potential of the leaves of Solanum lycocarpum A. St.

Hil.(Solanaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

COSTA, Glícia Meneses *et al.* Picrosirius red e tricrômico de masson como ferramentas para detecção de fibras colágenas em pele de cães com dermatopatologias endócrinas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, 2019.

DALL'AGNOL, Rodrigo; VON POSER, Gilsane Lino. O uso de polissacarídeos complexos no manejo de doenças metabólicas: o caso de frutos de *Solanum lycocarpum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, pág. 337-341, 2000.

DE OLIVEIRA, Maria de Lurdes Bezerra *et al.* Uso, classificação e diversidade de *solanum L.*(solanaceae). **Biodiversidade**, v. 19, n. 3, 2020.

DENNIS, Christopher *et al.* Suture materials—Current and emerging trends. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 104, n. 6, p. 1544-1559, 2016.

DIAS, K. S. Efeitos do uso de extrato etanólico de *Ocimum basilicum* no processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos. 2020. 86 p. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais)- Universidade Federal de São João del Rei, São João Del-Rei, 2020.

DÖNMEZ, Ceylan *et al.* From nutrition to medicine: Assessing hemorrhoid healing activity of *Solanum melongena L.* via in vivo experimental models and its major chemicals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 261, p. 113143, 2020.

DOVI, Julia V.; HE, Li-Ke; DIPIETRO, Luisa A. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **Journal of leukocyte biology**, v. 73, n. 4, p. 448-455, 2003.

EGOZI EI, FERREIRA AM, BURNS AL, GAMELLI RL, DIPIETRO LA (2003) Mast cell modulate the inflammatory but not the proliferative in healing wound **Wound Rep Reg** 11, 46-54.

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

EMING, Sabine A.; MARTIN, Paul; TOMIC-CANIC, Marjana. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Science translational medicine**, v. 6, n. 265, p. 265sr6-265sr6, 2014.

EMING, Sabine A.; WYNN, Thomas A.; MARTIN, Paul. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. **Science**, v. 356, n. 6342, p. 1026-1030, 2017.

FALANGA, Vincent. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **The Lancet**, v. 366, n. 9498, p. 1736-1743, 2005.

FALEIRO, Clarissa C. *et al.* O extrato das folhas de babosa, Aloe vera na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo. **CEP**, v. 29102, p. 770, 2009.

FREITAS, Kátia M. *et al.* P1G10, the Proteolytic Fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis*, Stimulates Tissue Repair after Acute Exposure to Ultraviolet B Radiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4373, 2019.

GANTWERKER, Eric A.; HOM, David B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Clinics in plastic surgery**, v. 39, n. 1, p. 85-97, 2012.

GARCIA-ORUE, Itxaso *et al.* Novel nanofibrous dressings containing rhEGF and Aloe vera for wound healing applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 523, n. 2, p. 556-566, 2017.

GARROS, Inaldo de Castro *et al.* Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 55-65, 2006.

GEORGE BROUGHTON, I. I.; JANIS, Jeffrey E.; ATTINGER, Christopher E. The basic science of wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 117, n. 7S, p. 12S-34S, 2006.

GHOSH, Prasanta Kumar; GABA, Anjali. Phyto-extracts in wound healing. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 5, p. 760-820, 2013.

GONZALES, Kevin Andrew Uy; FUCHS, Elaine. Skin and its regenerative powers: an alliance between stem cells and their niche. **Developmental cell**, v. 43, n. 4, p. 387-401, 2017.

GONZALEZ, Ana Cristina de Oliveira *et al.* Wound healing-A literature review. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 91, p. 614-620, 2016

GRÖNE, A. Keratinocytes and cytokines. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 88, n. 1-2, p. 1-12, 2002.

GUO, S. al; DIPIETRO, Luisa A. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

GURTNER, Geoffrey C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-321, 2008.

HESKETH, Mark *et al.* Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1545, 2017.

HU, Michael Sung-Min *et al.* The role of stem cells during scarless skin wound healing. **Advances in wound care**, v. 3, n. 4, p. 304-314, 2014.

HUSSAIN, Khalid *et al.* Traditional and complementary medicines: quality assessment strategies and safe usage. **Southern med review**, v. 2, n. 1, p. 19, 2009.

IZUNDU, I. M. *et al.* Wound Healing and Antimicrobial Effects of Azadrachita indica Leaves Extracts on Escherichia coli Infected Diabetic Wounds using Albino Rat Model.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, José. Histologia Básica. 12a. Rio de Janeiro, RJ, 2013.

KANT, Vinay *et al.* Curcumin-induced angiogenesis hastens wound healing in diabetic rats. **Journal of Surgical Research**, v. 193, n. 2, p. 978-988, 2015.

KASOUNI, Athanasia I. *et al.* The Unexplored Wound Healing Activity of Urtica dioica L. Extract: An In Vitro and In Vivo Study. *Molecules*, v. 26, n. 20, p. 6248, 2021.

KIM, Min-Ho *et al.* Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 7, p. 1812-1820, 2008.

KRAFTS, Kristine P. Tissue repair: The hidden drama. **Organogenesis**, v. 6, n. 4, p. 225-233, 2010.

LAI-CHEONG, Joey E.; MCGRATH, John A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**, v. 49, n. 6, p. 337-342, 2021.

LAROUCHE, Jacqueline *et al.* Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets. **Advances in wound care**, v. 7, n. 7, p. 209-231, 2018.

LI, Jie; CHEN, Juan; KIRSNER, Robert. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9-18, 2007.

LI, Yuanyuan *et al.* Epidermal stem cells in skin wound healing. **Advances in Wound Care**, v. 6, n. 9, p. 297-307, 2017.

LIANG, Yongping; HE, Jiahui; GUO, Baolin. Functional hydrogels as wound dressing to enhance wound healing. **ACS nano**, v. 15, n. 8, p. 12687-12722, 2021.

LOMBARDI, J. A.; JUNIOR, MOTTA. Seed dispersal of Solanum lycocarpum St. Hil.(Solanaceae) by the maned wolf, Chrysocyon brachyurus Illiger(Mammalia, Canidae). **Ciencia e cultura**(Sao Paulo), v. 45, n. 2, p. 126-127, 1993.

LOOTS, Miriam AM *et al.* Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 111, n. 5, p. 850-857, 1998.

LORENZI, H. Weeds plants of Brazil: terrestrial, aquatic, parasitic and toxic, fourth ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, **Nova Odessa**. 2008.

MA H, LAM PK, SIU WS, TONG CSW, LO KKY, KOON CM, WU XX, LI X, CHENG W, SHUM WT, LEUNG PC. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells (ADMSCs) and ADMSC-Derived Secretome Expedited Wound Healing in a Rodent Model - A Preliminary Study. **Clin Cosmet Investig Dermatol**. 2021 Jun 30;14:753-764.

MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTIN, Paul; LEIBOVICH, S. Joseph. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in cell biology**, v. 15, n. 11, p. 599-607, 2005.

MARTINS, Nelson Lúcio Parada *et al.* Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 66-75, 2006.

MEIZARINI, Asti *et al.* Effectivity of zinc oxide-turmeric extract dressing in stimulating the reepithelization phase of wound healing. **Veterinary World**, v. 13, n. 10, p. 2221, 2020.

MELGUIZO-RODRÍGUEZ, Lucia *et al.* Antimicrobial properties of olive oil phenolic compounds and their regenerative capacity towards fibroblast cells. **Journal of Tissue Viability**, v. 30, n. 3, p. 372-378, 2021.

MELGUIZO-RODRÍGUEZ, Lucia *et al.* Potential Effects of Phenolic Compounds That Can Be Found in Olive Oil on Wound Healing. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1642, 2021.

MENDONÇA, Ricardo José de; COUTINHO-NETTO, Joaquim. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, p. 257-262, 2009.

MENON, Gopinathan K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, p. S3-S17, 2002.

MICHAEL, Stefanie *et al.* Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e57741, 2013.

MOORE, Alessandra L. *et al.* Scarless wound healing: transitioning from fetal research to regenerative healing. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 7, n. 2, p. e309, 2018.

MORAIS, M. G. Avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva dos frutos maduros de *Solanum lycocarpum* A. ST. HIL. (Solanaceae). 2018. 116 p. Tese (Doutorado) -

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São João del Rei, Divinópolis, 2018.

MORAIS, Melissa Grazielle. *et al.* Antioxidant, antibacterial and cytotoxic potential of the ripe fruits of *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. (Solanaceae). **Natural Product Research**. 29, nº 5, 480-483. 2015.

MORAIS, Melissa Grazielle *et al.* Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanol extract of ripe fruits of *Solanum lycocarpum* St. Hil.(Solanaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 262, p. 113125, 2020.

MORAIS, Ricardo R. *et al.* Bioethanol production from *Solanum lycocarpum* starch: A sustainable non-food energy source for biofuels. **Renewable Energy**, v. 140, p. 361-366, 2019.

MOREIRA, Camila Francisco *et al.* Skin wound healing model-excisional wounding and assessment of lesion area. **Bio-protocol**, v. 5, n. 22, p. e1661-e1661, 2015.

MULLER, Marie *et al.* Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. **Diabetic Medicine**, v. 25, n. 4, p. 419-426, 2008.

MUNARI, Carla Carolina *et al.* Antiproliferative activity of *Solanum lycocarpum* alkaloidic extract and their constituents, solamargine and solasonine, in tumor cell lines. **Journal of natural medicines**, v. 68, n. 1, p. 236-241, 2014.

NG, Michael FY. The role of mast cells in wound healing. *International wound journal*, v. 7, n. 1, p. 55-61, 2010.

OKUMA, Cindy Hana *et al.* Development of lamellar gel phase emulsion containing marigold oil (*Calendula officinalis*) as a potential modern wound dressing. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, p. 62-72, 2015.

OLIVEIRA JUNIOR, Enio Nazaré de *et al.* Análise nutricional da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) durante o amadurecimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 4, p. 846-851, 2003.

PARENTE, Leila Maria Leal *et al.* Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, p. 383-391, 2009.

PARMAR, Komal M. *et al.* Wound healing potential of *Solanum xanthocarpum* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 10, p. 1389-1400, 2018.

PEREZ, A. C. *et al.* Effect of Solanum lycocarpum St. Hill on various haematological parameters in diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 442-444, 2006.

PÉREZ-SÁNCHEZ, Almudena *et al.* Nutraceuticals for skin care: A comprehensive review of human clinical studies. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 403, 2018.

PHAN, Toan-Thang *et al.* 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.

PIIPPONEN, Minna; LI, Dongqing; LANDÉN, Ning Xu. The immune functions of keratinocytes in skin wound healing. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, p. 8790, 2020.

QURESHI, Zainab *et al.* Solanum incanum extract enhances wound healing and tissue regeneration in burn mice model. ||| **Bangladesh Journal of Pharmacology** |||, v. 14, n. 2, p. 101-106, 2019.

RACHMIN, Inbal *et al.* Topical treatment strategies to manipulate human skin pigmentation. **Advanced drug delivery reviews**, v. 153, p. 65-71, 2020.

RIVERA-GONZALEZ, Guillermo; SHOOK, Brett; HORSLEY, Valerie. Adipocytes in skin health and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 3, p. a015271, 2014.

ROCHA, D. A. *et al.* Avaliação preliminar in vivo do efeito hipocolesterolêmico do polvilho da fruta-de-lobo (Solanum lycocarpum A. St.-Hil.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 362-369, 2012.

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

RODRIGUES M, KOSARIC N, BONHAM CA, GURTNER GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiol Rev.** 99(1):665-706. 2019.

RODRIGUES, VALÉRIA EVANGELISTA GOMES; CARVALHO, DA de. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

ROMANA-SOUZA, Bruna; DOS SANTOS, Jeanine Salles; MONTE-ALTO-COSTA, Andréa. Caffeic acid phenethyl ester promotes wound healing of mice pressure ulcers affecting NF- κ B, NOS2 and NRF2 expression. **Life sciences**, v. 207, p. 158-165, 2018.

ROSAS-CRUZ, Galy P. *et al.* Wound Healing Activity of an Ointment from Solanum tuberosum L. "Tumbay Yellow Potato" on Mus musculus Balb/c. **Pharmacognosy Journal**, v. 12, n. 6, 2020.

RUSSO, Barbara; BREMBILLA, Nicolò C.; CHIZZOLINI, Carlo. Interplay between keratinocytes and fibroblasts: A systematic review providing a new angle for understanding skin fibrotic disorders. **Frontiers in Immunology**, p. 648, 2020.

SAHLE, Fitsum F. *et al.* Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy. **Skin pharmacology and physiology**, v. 28, n. 1, p. 42-55, 2015.

SANTOS, Manoel Francisco da Silva *et al.* Avaliação do uso do extrato bruto de Jatropha gossypifolia L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 2-7, 2006.

SCHIRATO, Giuliana Viegas *et al.* O polissacarídeo do Anacardium occidentale L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v. 36, p. 149-154, 2006.

SCHREML, Stephan *et al.* Wound healing in the 21st century. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 5, p. 866-881, 2010

SEIRINGER, Peter *et al.* Keratinocytes regulate the threshold of inflammation by inhibiting T cell effector functions. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1606, 2021.

SHEDOEVA, Aleksandra *et al.* Wound healing and the use of medicinal plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

SHUKLA, Sandeep Kumar *et al.* Pharmacological control of inflammation in wound healing. **Journal of tissue viability**, v. 28, n. 4, p. 218-222, 2019

SIMPSON, Cory L.; PATEL, Dipal M.; GREEN, Kathleen J. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 9, p. 565-580, 2011.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de nutrição*, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOARES-MOTA, Milena Rodrigues *et al.* Toxicological evaluation of 10% Solanum lycocarpum St. Hill fruit consumption in the diet of growing rats: Hematological, biochemical and histopathological effects. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, n. 5, p. 549-553, 2010.

SOLLER, Eric C. *et al.* Common features of optimal collagen scaffolds that disrupt wound contraction and enhance regeneration both in peripheral nerves and in skin. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4783-4791, 2012.

SÜNTAR, Ipek *et al.* Wound healing and antioxidant properties: do they coexist in plants?. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 2, p. 1-7, 2012.

TAI, Cheng-Jeng *et al.* Aqueous extract of Solanum nigrum leaf activates autophagic cell death and enhances docetaxel-induced cytotoxicity in human endometrial carcinoma cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

TORRALBO, D. F. *et al.* Extraction and partial characterization of Solanum lycocarpum pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 378-383, 2012.

UD-DIN, Sara; WILGUS, Traci A.; BAYAT, Ardeshir. Mast cells in skin scarring: A review of animal and human research. **Frontiers in immunology**, p. 2373, 2020.

VAALAMO, Maarit *et al.* Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normally healing human cutaneous wounds. **British journal of dermatology**, v. 135, n. 1, p. 52-59, 1996.

VEIGA, V. F. J.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**. v. 28, n. 3, p. 519- 28, 2005.

VELNAR, Tomaz; BAILEY, Tracey; SMRKOLJ, Vladimir. 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.

VIAÑA-MENDIETA, Pamela; SÁNCHEZ, Mirna Lorena; BENAVIDES, Jorge. Rational selection of bioactive principles for wound healing applications: Growth factors and antioxidants. **International Wound Journal**, v. 19, n. 1, p. 100-113, 2022.

VIEIRA JR, G. *et al.* Anti-inflammatory effect of Solanum lycocarpum fruits. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 17, n. 8, p. 892-896, 2003.

WANG, Lisu *et al.* Anti-inflammatory effect and mechanism of the green fruit extract of Solanum integrifolium Poir. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

WERNER, Sabine; GROSE, Richard. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.

WHO. Regulatory situation of herbal medicines. **A Worldwide Review**, Geneva: WHO, 1998. 45 p.

WILGUS, Traci A. *et al.* The impact of cyclooxygenase-2 mediated inflammation on scarless fetal wound healing. **The American journal of pathology**, v. 165, n. 3, p. 753-761, 2004.

WITKOWSKI, Joseph A.; PARISH, Lawrence Charles. Histopathology of the decubitus ulcer. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 6, n. 6, p. 1014-1021, 1982.

WULFF, Brian C. *et al.* Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 2, p. 458-465, 2012.

XIE, Xiaodong *et al.* Solamargine inhibits the migration and invasion of HepG2 cells by blocking epithelial-to-mesenchymal transition. **Oncology Letters**, v. 14, n. 1, p. 447-452, 2017.

YANG, Fajun *et al.* Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. **The Journal of nutrition**, v. 128, n. 12, p. 2334-2340, 1998.

YAMAGUCHI, Y., HEARING, V. J. Melanocytes and their diseases. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2014 May 1;4(5):a017046.

YARISWAMY, M. *et al.* Topical application of serine proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br.(Apocyanaceae) látex augments healing of experimentally induced excision wound in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 149, p. 377–383, 2013.

ZAHARA, Kulsoom *et al.* An insight to therapeutic potential and phytochemical profile of *Solanum villosum* (L). **Medicine in Drug Discovery**, v. 2, p. 100007, 2019.