



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

ALINE COSTA BASTOS

ANÁLISE DA AÇÃO CICATRIZANTE DOS EXTRATOS DA FOLHA, PECÍOLO E
CAULE DA *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott *IN VITRO*.

BELÉM - PA
2020

ALINE COSTA BASTOS

ANÁLISE DA AÇÃO CICATRIZANTE DOS EXTRATOS DA FOLHA, PECÍOLO E
CAULE DA *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott *IN VITRO*.

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular, da Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Belém, como requisito para obtenção do grau de mestre em Neurociência e Biologia Celular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos

Co-orientadora: Elizabeth Sumi Yamada.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

B327a Bastos, Aline Costa
Análise da ação cicatrizante dos extratos da folha, pecíolo e caule da *Montrichardia Linifera* (Arruda) Schott in vitro / Aline Costa Bastos. — 2020.
70 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos
Coorientação: Prof^a. Dra. Elizabeth Sumi Yamada
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

1. Cicatrização . 2. Lesão cutânea . 3. *Montrichardia linifera*. I. Título.

CDD 574.0724

ALINE COSTA BASTOS

ANÁLISE DA AÇÃO CICATRIZANTE DOS EXTRATOS DA FOLHA, PECÍOLO E
CAULE DA *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott *IN VITRO*.

Dissertação de mestrado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de mestre em neurociências e biologia celular. Sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos.

Banca Examinadora

Orientação: Prof^a. Dra. Gilmara De Nazareth Tavares Bastos

Co-Orientação: Prof^a. Dra. Elizabeth Sumi Yamada

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia

Avaliador Interno ao Programa

Profa. Dra. Veronica Regina Lobato de Oliveira-Bahia

Avaliadora Externo ao Programa

Profa. Dra. Cristine Bastos Do Amarante

Avaliadora Externo a Instituição

Prof. Dr. Paulo Eduardo Santos Ávila

Avaliador Externo ao Programa Suplente

Dedico esse trabalho aos meus pais, por serem incansáveis e nunca desistirem de me apoiar de todas as formas possíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me abençoar e iluminar, possibilitando eu concluir esse trabalho e a sua mãe, Nossa Senhora, que sempre intercedeu por mim, nos momentos bons e ruins.

Palavras não são suficientes para agradecer aos meus pais, Antonio e Antonia Bastos, que sempre deram o melhor de si, para tornar seus filhos pessoas sempre melhores, abdicando de suas vidas para abraçar para realizar os sonhos e desejos meus e de meus irmãos.

Aos meus irmãos, Antonio e Abel, que me apoiam e têm muita paciência, vocês dois sempre estarão em meu coração.

Ao meu amigo e companheiro, Kleber Sodré, que sempre me apoiou e incentivou a concluir esse trabalho e continuar a ir em busca dos meus sonhos.

À professora Dra. Gilmara Bastos, que me orienta desde o começo da minha caminhada acadêmica, que ao longo desses anos confiou em mim e me abriu portas para o conhecimento e várias oportunidades, e está sempre disposta a ajudar e compreender seus alunos, muito obrigada.

Agradeço a professora Dra. Elizabeth Yamada, que sempre foi muito solícita e abriu as portas de seu laboratório para nos receber e apoiar e colaborar com esse projeto.

Agradeço a professora Dra. Cristine Amarante, por doar os extratos para realização dessa pesquisa e por confiar no trabalho de nosso grupo.

Agradeço ao professor Dr. André Khayat e aos colegas do Núcleo de Pesquisa em Oncologia (NPO), do Hospital Universitário João Barros Barreto, por me acolherem tão bem e me permitirem desenvolver os testes *in vitro*. Em especial quero agradecer ao Eliel Barbosa, por ter paciência comigo e sempre estar disposto a me ajudar, mesmo com todas as atribuições.

Ao Mauricio Ferreira, que foi um grande parceiro desde a minha iniciação científica, e nunca mediu esforços para me ajudar e contribuir para minha jornada acadêmica.

Aos meus colegas do Laboratório de Neuropatologia Experimental (LANEX), que me acompanharam nesses dois anos de mestrado, Solimar, Anderson, Gabriel, Leonardo, Clarina, Natalia. Em especial a Solimar pelos companheirismo e conselhos preciosos de cultura de células.

Aos colegas do Laboratório de Neuroinflamação (LNI), Prof. Dr. Paulo, Rayan, Klinsmann, Marcos, Cassilene, Diandra, Ramon, Bruna.

Aos meus amigos que cultivo desde a graduação, e me apoiaram direta e/ou indiretamente a trilhar sempre o melhor caminho, Elizabeth Maués, Gustavo, Eduardo, Hermano, Nayara, Allan, Fabiane, Mateus e Mayumi.

Agradeço a Universidade Federal do Pará, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Acredito que sozinhos não chegamos muito longe e não existe pesquisa de qualidade sem se ter apoio de diversas formas. Então, também gostaria de agradecer a todos, que não citei neste documento, mas que contribuíram de forma direta e indireta para conclusão dessa pesquisa e do mestrado que me propus fazer.

“Deus dá o frio conforme o cobertor”
(Provérbio)

RESUMO

As lesões crônicas acometem uma grande parcela da sociedade, o tratamento para esses pacientes possui custos financeiros elevados e não se obtém um resultado tão satisfatório. Então, o objetivo desse trabalho foi investigar se os extratos etanólicos do caule, pecíolo e folha da *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott possuem atividade cicatrizante *in vitro*. Para isso, foi realizado a identificação de classes de substância dos extratos por HPTLC, também foi realizado as análises de: citotoxicidade, cicatrização *in vitro*, morfologia por hematoxilina e eosina e imunomarcção para BrdU. Com isso foi demonstrado a atividade antioxidante e a presença de terpenos nos três extratos e a presença de flavonoides e fenóis no extrato da folha. Também foi realizado uma curva seriada com concentrações de 100 a 0,19µg/ml dos extratos do caule, pecíolo e folha, nos tempos de 24, 48 e 72h, e não apresentaram citotoxicidade. A partir do teste de citotoxicidade foi escolhido para os próximos testes as concentrações de 0,78; 0,39; 0,19 µg/ml dos três extratos. Assim, o grupo controle no tempo de 6, 12 e 24h demonstrou área de lesão de 82,08±12,13, 56,14±15,75, 34,34±10,12%, respectivamente, enquanto que o extrato do caule apresentou área de lesão, no tempo de 6h, de 66,108±23,85, 66,10±13,13, 64,81±20,42%, respectivamente; no tempo de 12h, 38,86 ± 20,66, 40,45 ±14,64, 32,29±16,62, respectivamente; no tempo de 24h, 13,48±11,20, 10,67±7,94, 10,15±7,35%, respectivamente. O extrato do pecíolo apresentou área de lesão, no tempo de 6h, 74,02±15,16%, 80,32±22,50%, 75,56± 20,09%, respectivamente; no tempo de 12h, 38,86±20,66, 46,79±12,46, 40,98±5,45%, respectivamente; no tempo 24h, 13,48±11,21, 27,33 ± 13,86, 12,40±7,72%, respectivamente. Já o extrato da folha apresentou área de lesão, no tempo de 6h, 73,08±21,35, 72,91±18,19, 67,84±17,89%, respectivamente; no tempo de 12h, 48,76±21,17, 48,02±17,30, 44,54±18,70%, respectivamente, no tempo de 24h, 24,59 ± 14,58, 26,07 ± 16,73, 23,75 ± 15,76%, respectivamente. Na coloração por hematoxilina e eosina não houve mudança morfológica significativa. Na quantificação de células BrdU positivas, o grupo controle demonstrou uma média de 19,778 ± 3,80, enquanto os grupos tratados com os extratos nas concentrações de 0,78, 0,39, 0,19 µg/ml demonstraram, para o extrato do caule, média de 20,222±1,855, 37,889±7,407, 29,778±4,521 células BrdU positivas, respectivamente, para extrato do pecíolo, média de 20,222±2,587, 20,444±5,077, 24,889±3,551 células BrdU positivas, respectivamente; para o extrato da folha, média de 20,556±3,504, 23,778±5,974, 22,889±3,1798 células BrdU positivas, respectivamente. Portanto, o extrato do caule e pecíolo da *Montrichardia linifera*, em pequenas concentrações, demonstraram atividade cicatrizante *in vitro*.

Palavras- Chaves: Cicatrização, Lesão cutânea, *Montrichardia linifera*.

ABSTRACT

Chronic injuries affect a large portion of society, treatment for these patients has high financial costs and a result that is not satisfactory. Thus, the objective of this work was to investigate whether ethanolic extracts from the stem, petiole and leaf of *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott have healing activity in vitro. For that, the identification of substance classes of the extracts was carried out by HPTLC, the analyzes of: cytotoxicity, in vitro healing, hematoxylin and eosin morphology and immunomarking for BrdU was also performed. This demonstrated the antioxidant activity and the presence of terpenes in the three extracts, and the presence of flavonoids and phenols in the leaf extract. A serial curve was performed with concentrations of 100 to 0.19 $\mu\text{g} / \text{ml}$ of the extracts of the stem, petiole and leaf, in times of 24, 48 and 72h, and it didn't present cytotoxicity. From the cytotoxicity test, the concentrations of 0.78, 0.39; 0.19 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the three extracts were chosen for the next tests. Thus, the control group in 6, 12 and 24 hours showed a lesion area of 82.08 ± 12.13 , 56.14 ± 15.75 , $34.34 \pm 10.12\%$, respectively; while the extract of the stem showed lesion area, in the time of 6h, of 66.108 ± 23.85 , 66.10 ± 13.13 , $64.81 \pm 20.42\%$, respectively; in 12h, 38.86 ± 20.66 , 40.45 ± 14.64 , 32.29 ± 16.62 , respectively; in 24h, 13.48 ± 11.20 , 10.67 ± 7.94 , $10.15 \pm 7.35\%$, respectively. The petiole extract showed a lesion area, in 6h, $74.02 \pm 15.16\%$, $80.32 \pm 22.50\%$, $75.56 \pm 20.09\%$, respectively; at 12h, 38.86 ± 20.66 , 46.79 ± 12.46 , $40.98 \pm 5.45\%$, respectively; in 24h, 13.48 ± 11.21 , 27.33 ± 13.86 , $12.40 \pm 7.72\%$, respectively. The leaf extract, on the other hand, showed a lesion area, in the time of 6h, 73.08 ± 21.35 , 72.91 ± 18.19 , $67.84 \pm 17.89\%$, respectively; in 12h, 48.76 ± 21.17 , 48.02 ± 17.30 , $44.54 \pm 18.70\%$, respectively, in 24h, 24.59 ± 14.58 , 26.07 ± 16 , $23.75 \pm 15.76\%$, respectively. There was no significant morphological change in hematoxylin and eosin staining. In the quantification of positive BrdU cells, the control group showed an average of 19.778 ± 3.80 , while the groups treated with the extracts at concentrations of 0.78, 0.39, 0.19 $\mu\text{g}/\text{ml}$, for the extract of stem, demonstrated mean of 20.222 ± 1.855 , 37.889 ± 7.407 , 29.778 ± 4.521 positive BrdU cells, respectively, for petiole extract, mean of 20.222 ± 2.587 , 20.444 ± 5.077 , 24.889 ± 3.551 positive BrdU cells, respectively; for leaf extract, mean of $20,556 \pm 3,504$, $23,778 \pm 5,974$, $22,889 \pm 3,1798$ positive BrdU cells, respectively. Therefore, *Montrichardia linifera* stem and petiole extract, in small concentrations, demonstrated wound healing activity in vitro.

Keywords: Healing, Skin lesion, *Montrichardia linifera*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da pele dividida em camadas, epiderme, derme e hipoderme.	17
Figura 2: Epiderme.	17
Figura 3: Derme.	18
Figura 4: Pele em processo de cicatrização após lesão, dividida em 3 fases.	20
Figura 5: Processo inflamatório, primeira fase da cascata de cicatrização.	21
Figura 6: Processo de proliferação, segunda fase da cascata de cicatrização.	23
Figura 7: Processo de remodelação, segunda fase da cascata de cicatrização.	24
Figura 8: População de <i>M. linifera</i> (Arruda) Schott, conhecida como aningal.	27
Figura 9: Teste de seletividade dos solventes.	30
Figura 10: Desenvolvimento do perfil químico do sistema de eluição (DCM/MeOH/HFo).....	31
Figura 11: Perfil cromatográfico por HPTLC dos extratos etanólicos da folha (F), pecíolo (P) e caule (C) da <i>M. linifera</i>	37
Figura 12: Viabilidade celular em porcentagem depois de 24 horas, em diferentes concentrações dos extratos etanólicos da <i>M. linifera</i> , avaliado pelo ensaio de MTT.	39
Figura 13: Viabilidade celular em porcentagem depois de 48 horas, em diferentes concentrações dos extratos etanólicos da <i>M. linifera</i> , avaliado pelo ensaio de MTT.	41
Figura 14: Viabilidade celular em porcentagem depois de 72 horas, em diferentes concentrações dos extratos etanólicos da <i>M. linifera</i> , avaliado pelo ensaio de MTT.	42
Figura 15: Área da lesão em monocamadas de células L929, do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do caule.	44
Figura 16: Microfotografias das áreas da lesão em monocamadas de células L929. Do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do caule.	45
Figura 17: Área da lesão em monocamadas de células L929, do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do pecíolo.	45
Figura 18: Microfotografias das áreas da lesão em monocamadas de células L929. Do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do pecíolo.....	46
Figura 19: Área da lesão em monocamadas de células L929, do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato das folhas.....	46
Figura 20: Microfotografias das áreas da lesão em monocamadas de células L929. Do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do pecíolo.....	47
Figura 21: Microfotografias das áreas da lesão em monocamadas de células L929 coradas com H&E do extrato do caule.	48
Figura 22: Microfotografias das áreas da lesão em monocamadas de células L929 coradas com H&E, do extrato do pecíolo.....	49

Figura 23: Microfotografias das áreas da lesão em monocamadas de células L929 coradas com H&E, do extrato da folha..	50
Figura 24: Células positivas para BrdU do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do caule nas concentrações de 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml.	51
Figura 25: Células positivas para BrdU do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do pecíolo nas concentrações de 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml..	52
Figura 26: Células positivas para BrdU do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato da folha nas concentrações de 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml.	53

LISTA DE ABREVIATURA

µg - micrograma

µl – Microlitro

µm - Micrometro

BrdU- Bromodeoxyuridine

CBER - *Center for Biologics Evaluation and Research*

CD184- Cluster de diferenciação 184

CDER - *Center for Drug Evaluation and Research*

CDRH - *Center for Devices and Radiological Health*

DALY - Anos de vida ajustado por incapacidade

DCM – Diclorometano

DMEM – *Dulbeccos's Modified Eagle Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH- 2,2- difenil-1-picril-hidrazil

EGF- Fator de crescimento epidérmico

FBS – *Fast Bleu Salt*

FBS - soro bovino fetal

FDA - Food and Drug Administration

FGF – Fator de crescimento de fibroblasto

H&E – Hematoxilina & Eosina

H₂O – Água

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HCl – Ácido clorídrico

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HFo - Ácido fórmico

HPTLC - Cromatografia em camada delgada de alta eficiência

IHME - *The Institute for Health Metrics and Evaluation*

IL-1 – Interleucina 1

ISSO- Organização Internacional de Padronização

KOH – Hidróxido de potássio

L929 – Células de fibroblastos de tecido adiposo de camundongo

LAQGoeldi - Laboratório de Análises Químicas do Museu Paraense Emílio Goeldi

M. linifera – Montrichardia linifera

MEC – Matriz extracelular

MeOH – Metanol

ml – Mililitro

mM – Milimolar

MPP- Metaloproteinase de matriz

MTT- Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NaOH – Hidróxido de sódio

nm – nanômetro

NP – Difenilboriloxietilamina

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

PBS - Tampão Fosfato Salino

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PEG – Polietilenoglicol

TGF- α - Fator de crescimento transformador α

TGF- β - Fator de crescimento transformador β

UV – Ultravioleta

VAS - Vanilina em Ácido Sulfúrico

VEGF – Fator de Crescimento endotelial vascular

YLDs - *Years Lived with Disability*

YLLs - *Years of Life Lost to a Disease*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 PELE.....	16
1.2 LESÕES CUTÂNEAS	18
1.3 CICATRIZAÇÃO	19
1.3.1 Inflamação	20
1.3.2 Proliferação	22
1.3.3 Remodelação	23
1.4 TRATAMENTO.....	24
1.5 <i>MONTRICHARDIA LINIFERA</i> (ARRUDA) SCHOTT	25
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. METODOLOGIA	29
3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	29
3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR HPTLC	29
3.2.1. Revelador VAS (Vanilina em Ácido Sulfúrico)	31
3.2.2. Revelador NP/PEG (Difenilboriloxietilamina/ Polietilenoglicol)	32
3.2.3. Revelador KOH (Hidróxido de Potássio)	32
3.2.4. Revelador FBS (<i>Fast Blue Salt</i>)	32
3.2.5. Revelador <i>Dragendorff</i>	32
3.2.6. DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil)	33
3.3 CULTURA CELULAR.....	33
3.4 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE	33
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CICATRIZAÇÃO - <i>SCRATCH</i>	34
3.5 ANÁLISE MORFOLOGICA.....	34
3.6 AVALIAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	34
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4. RESULTADOS	36
4.1. CLASSES DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NOS EXTRATOS.....	36
4.2. CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DA <i>M.linifera</i>	38
4.3. AVALIAÇÃO DA DIMINUIÇÃO DA ÁREA DE LESÃO <i>IN VITRO</i>	43
4.5. PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA PELOS EXTRATOS DA <i>M. linifera</i>	50
5. DISCUSSÃO	55

6. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e possui funções importantes para a homeostase do organismo, como proteção mecânica, química, biológica, além de promover a regulação de temperatura e funcionar como barreira hídrica. A pele é dividida em 2 camadas principais: epiderme e derme; sendo a epiderme a camada mais externa ao corpo, derme a camada mais interna ao corpo (ZAIDI, LANIGAN, 2010).

Diversos processos patológicos podem prejudicar a homeostase da pele, podendo acarretar consequências graves para o indivíduo e sociedade. No *Global Burden of Disease 2013*, foi demonstrado um padrão de métrica para quantificar a incapacidade e mortalidade da população para várias doenças através de alguns fatores de risco das mais diversas regiões do mundo, algumas dessas doenças são as de pele. Essas doenças cutâneas foram estimadas usando a métrica do “Ano de Vida Ajustado à Incapacidade” (DALY - *Disability Adjusted Life Year*), sendo calculado pelos Anos de Vida Perdidos por uma Doença (YLLs - *Years of Life Lost to a Disease*) mais Anos Vividos com Deficiência (YLDs - *Years Lived with Disability*). Cada DALY corresponde a 1 ano de vida, e foi registrado 41 milhões de DALY correspondentes a doenças de pele, e as lesões na pele fazem parte desse registro (KARIMKHANI et al., 2017).

As lesões cutâneas ocorrem por diversos motivos, um dos tipos mais comuns são as feridas crônicas (BICKERS et al., 2006), que podem ocorrer ao longo da vida do indivíduo, no entanto, pessoas em condições de comorbidade e idosos são mais suscetíveis há essas lesões (ESCANDON et al., 2011; SERRA et al., 2017). A presença e o grau das lesões podem trazer complicações para os pacientes, como aumento da morbidade, baixa autoestima, infecções, amputação e, em alguns casos, óbito (SALOMÉ et al., 2016; CEFALU et al., 2016; KIM et al., 2018; WALSH et al., 2016).

A desregulação da cascata de cicatrização viabiliza a evolução do quadro de lesão aguda para a crônica ou gera cicatrizes anormais (KORTING et al., 2011). Essa cascata de cicatrização ocorre de forma natural no indivíduo e é didaticamente dividida em 3 fases: inflamação, proliferação e remodelação. É necessário modular essas fases, assim acelerando de forma organizada e controlada o processo de reparo tecidual (GURTNER et al., 2008).

Para isso, são utilizados métodos para prevenir e tratar as lesões cutâneas, como o reposicionamento dos pacientes acamados, assepsia da lesão, uso de anti-inflamatório, técnicas como desbridamento e uso de curativos e cicatrizantes locais (COWELL, 2013). Porém, o custo do tratamento dessas lesões é alto, prolongado e, dependendo do tipo e grau da lesão, é pouco eficiente (LINDHOLM, SEARLE, 2016). Por isso, novos estudos são de suma importância para

descrição de novos compostos que sejam mais eficientes e de baixo custo em relação aos que são utilizados comercialmente para o tratamento de lesões cutâneas.

A espécie *Montrichardia linifera* (*M.linifera*) é utilizada para tratamento de feridas e como antirreumático (PLOWMAN, 1969). Esta espécie é conhecida popularmente como aninga, e é encontrada em países tropicais, principalmente em lugares alagados (PLOWMAN, 1969; MACEDO, 2005; MAYO et al., 1997). Assim, investigamos o potencial cicatrizante dos extratos da folha, caule e pecíolo da *M. linifera*. Com o intuito de comparar e analisar as diferentes porções da referida espécie que possam ser eficazes para o tratamento de lesões na pele.

1.1 PELE

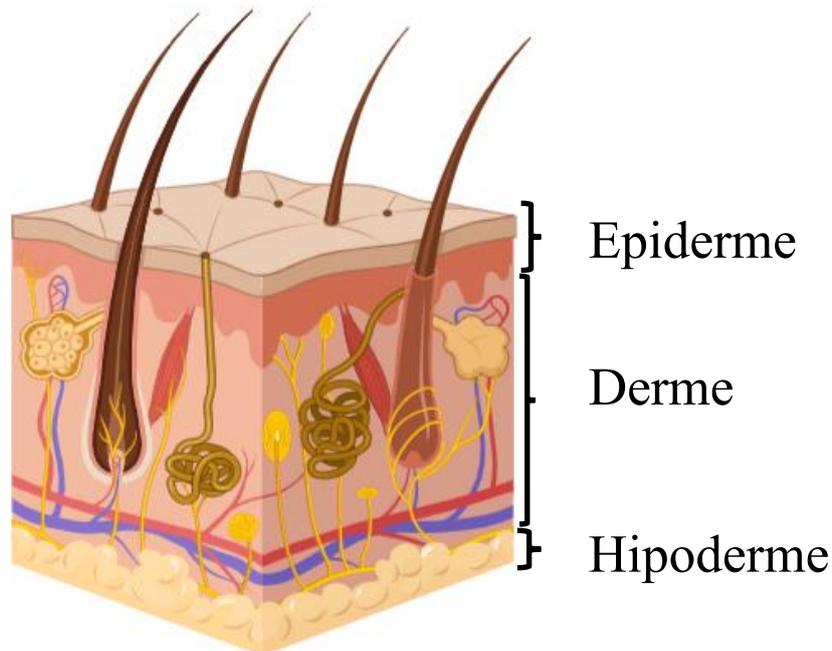
A pele é um órgão dinâmico com funções importantes para o bom funcionamento do organismo auxiliando na homeostase do corpo e possuindo a função de barreira mecânica e para patógenos. É termorreguladora; auxilia na regulação de água e traduz estímulos gerando sensações como prazer e dor, entre outros (BELKAID, SEGRE, 2014; GOULD, 2018; ZIMMERMAN et al., 2014). Além disso, pode-se perceber através da pele algumas alterações fisiológicas (rubor, secreção, ressecamento cutâneo etc.) (NIEMANN, HORSLEY, 2012; SAWKA et al., 2015) e patológicas (hepatite icterícia, herpes, psoríase, desregulação no sistema imune, entre outros) (BERETTA-PICCOLI et al., 2017; DONIGAN et al., 2015).

A pele é dividida em 2 camadas, a epiderme (primeira camada) e derme (segunda camada), além dessas duas regiões existe a região subcutânea, a hipoderme, que controla a temperatura corporal e conecta a derme com a camada muscular. Alguns autores consideram a hipoderme como uma terceira camada da pele (Figura 1) (GOULD, 2018).

A epiderme é constituída de várias subcamadas, também conhecidas como estratos, esses são diferenciados pela morfologia, tipo de maturação e profundidade que se encontram no tecido, o mais interno é o basal, que une os demais estratos da epiderme com a derme, além de ser responsável pela proliferação das células suprabasais. Nessa subcamada é encontrada um grande número de células germinativas, elas se diferenciam de acordo com a sua migração horizontal ou vertical pela epiderme, assim formando os estratos espinhosos, granuloso e córneo, os mesmos são renovados constantemente (Figura 2) (BLANPAIN, FUCHS, 2009).

Os queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans são os principais tipos celulares encontrados nos estratos espinhoso, granuloso e córneo; os queratinócitos são encontrados nessas regiões em maior quantidade em relação as demais células (HOATH, LEAHY, 2003).

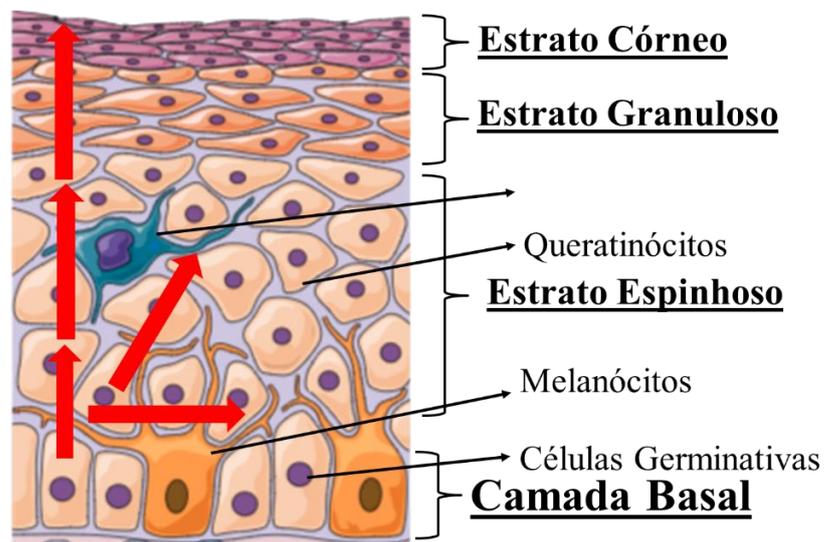
Figura 1: Estrutura da pele dividida em camadas, epiderme, derme e hipoderme.



Fonte: Adaptado da plataforma *BioRender* (versão livre - <https://biorender.com>)

Assim os queratinócitos se originam da camada basal e grande parte migram até a camada córnea e produzem queratina, formando assim uma barreira hídrica e para microrganismos, essa proteção é formada por queratina e células escamosas anucleadas, tendo espessura variada (MENON et al., 2012). Além das células citadas a epiderme é formada por glândulas, folículos, enzimas, fatores de crescimento, entre outros (ZAIDI, LANIGAN, 2010).

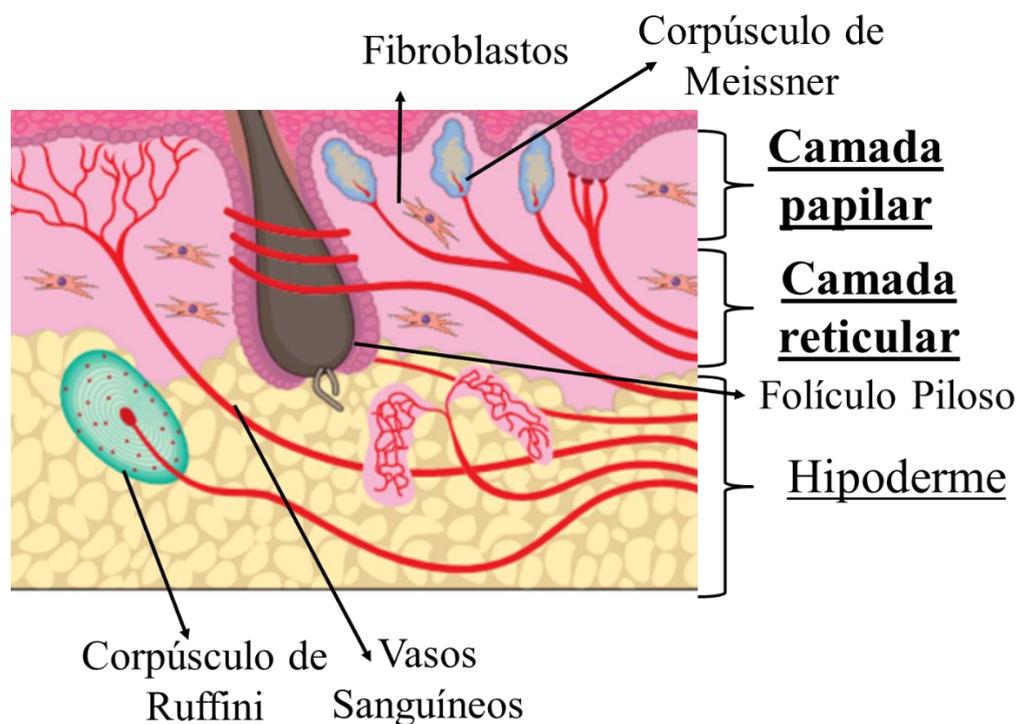
Figura 2: Epiderme. Divisão da epiderme em estratos córneo, granuloso, espinhoso e a camada basal, além da ilustração das células germinativas, melanócitos e queratinócitos. A seta vermelha indica a direção da migração das células germinativas pela epiderme.



Fonte: Adaptado da plataforma *Mind the Graph* (versão livre - <https://mindthegraph.com/>)

A derme fica abaixo da epiderme, localizada entre a camada basal e a hipoderme, e é dividida em duas subcamadas, a papilar e a reticular. A subcamada papilar é mais próxima da epiderme, possui papilas dérmicas, corpúsculos de Meissner encapsulados e é altamente vascularizada, principalmente próxima as células epiteliais, assim nutrindo e sustentando as mesmas. Já a subcamada reticular possui fibras elásticas espessas, além de glândulas, vasos sanguíneos, folículos e receptores sensoriais. As principais células da derme são fibroblastos, assim produzindo e depositando fibras de colágeno na matriz dérmica (Figura 3) (ARDDA et al., 2014).

Figura 3: Derme. Divisão da derme em camada papilar e reticular, além da ilustração das células de fibroblastos, hipoderme e alguns anexos da derme.



Fonte: Adaptado da plataforma *Mind the Graph* (versão livre - <https://mindthegraph.com/>)

1.2 LESÕES CUTÂNEAS

As lesões cutâneas representam alterações da fisiologia normal da pele. A homeostasia dos tecidos é mantida quando todos os componentes da pele estão em sintonia e funcionando adequadamente, uma das formas de perda da homeostasia é a ocorrência de lesões cutâneas.

Existem vários tipos de lesões cutâneas, aquelas que causam a perda da continuidade do tecido epidermal e/ou dermal são conhecidas como feridas, as mesmas podem ser causadas por diversos motivos e possuem características diferentes. A sua classificação dá-se a partir da

duração da lesão, contaminação, profundidade e o agente causador (TAZIMA et al., 2008). Um exemplo são as lesões ou feridas crônicas, elas não avançam de forma ordenada e em velocidade adequada pelo processo de reparo tecidual, geralmente estão infeccionadas, possuem um exacerbado processo inflamatório, além de haver morte celular anormal no local lesionado (MORTON, PHILLIPS, 2016).

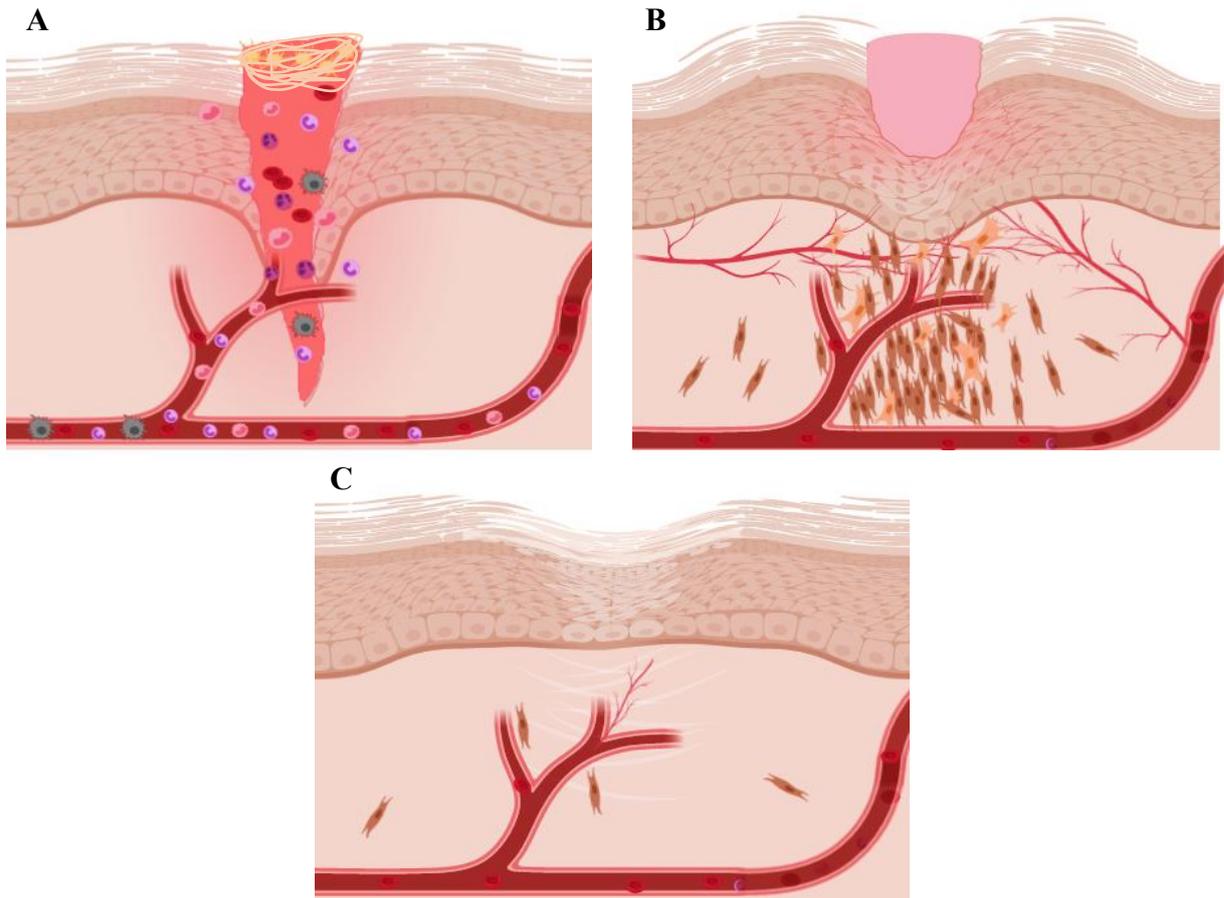
As feridas crônicas mais comuns são causadas por pressão dos vasos (decúbito) e disfunção diabética (MARTINENGO et al., 2018). Esses tipos de lesões causam prejuízos financeiros para o Estado e para o paciente, além dos indivíduos estarem propícios a infecções, perda parcial ou total da mobilidade, a perda de membros ou até mesmo levando ao falecimento em casos mais graves (KAPP, SANTAMARIA, 2017; GBD, 2018; SERRA et al., 2015). Segundo o estudo *Global Burden of Diseases 2017* (dados obtidos de 2007 até 2017), realizado pelo *The Institute for Health Metrics and Evaluation* (IHME), o número de mortes devido doenças na pele aumentou nos últimos anos. Entre as patologias citadas está a úlcera de decúbito, também conhecida como úlcera ou lesão por pressão (GBD, 2018). Por isso, é importante mecanismos para estabelecer uma cicatrização normal e/ou mais eficiente da ferida, assim revertendo o quadro da lesão e restabelecendo a homeostasia da pele.

1.3 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização de uma ferida se inicia no momento que o dano tecidual ocorre, com o intuito de reverter o processo lesivo do tecido. Esse reparo tecidual é dividido em três etapas, inflamação, proliferação e remodelação, respectivamente (Figura 4); esses eventos são complexos, dinâmicos e organizados, tendo participação de fenômenos fisiológicos e bioquímicos.

Quando essas etapas conseguem promover um feedback positivo, e há o restabelecimento da integridade tecidual, com o passar dos dias as fases da cascata de cicatrização são finalizadas e tanto o processo de cura, quanto o de dano da pele são encerrados (CHILDS, MURTHY, 2017).

Figura 4: Pele em processo de cicatrização após lesão, dividida em 3 fases. A) Fase de Inflamação. B) Fase de Proliferação. C) Fase de Remodelação.



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado da plataforma *BioRender* (versão livre - <https://biorender.com>)

1.3.1 Inflamação

A inflamação é a primeira fase da cicatrização e se inicia logo após o dano tecidual, nessa fase ocorre a ativação da cascata de coagulação, devido ao extravasamento sanguíneo, além da ativação do sistema imunológico (Figura 5). Logo, é uma etapa importante para a prevenção e combate de infecções no leito da ferida, porém deve ser de forma equilibrada, caso seja de maneira exacerbada e/ou prolongada pode torna-se crônica (OPNEJA et al.,2019).

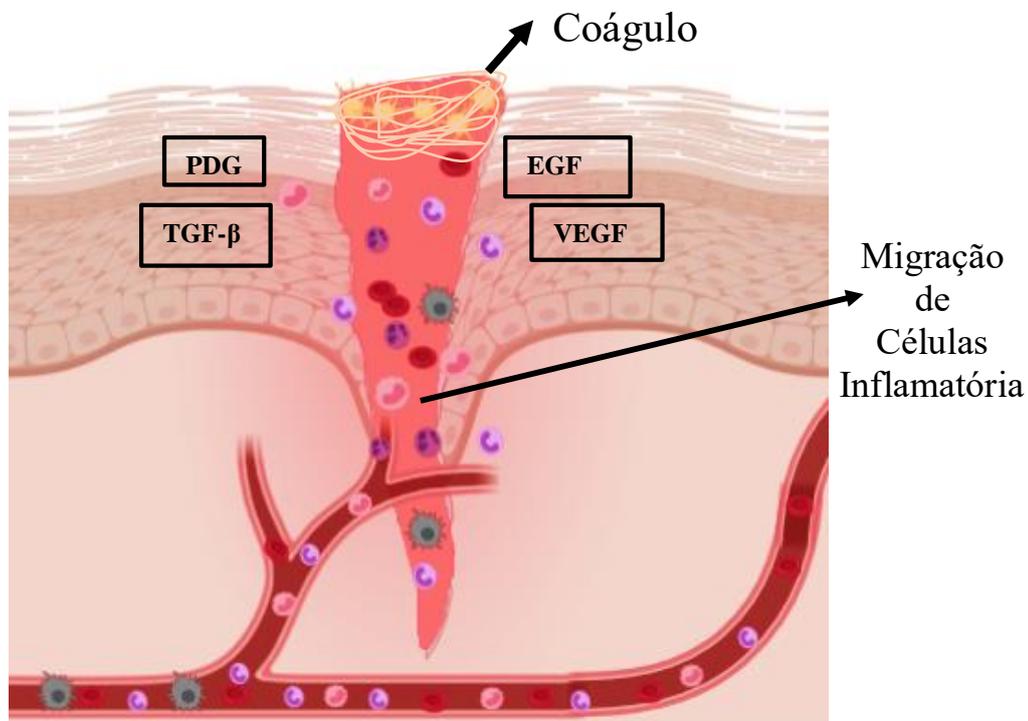
O processo inflamatório realiza algumas alterações na fisiologia normal da pele, como na estrutura e calibre vascular, migração de leucócitos da microvasculatura, acúmulo e ativação dos mesmos na lesão. Assim, o local poderá apresentar rubor, mudança de temperatura, edema, dor e perde de função (ROBBINS, COTRAN, 2010)

Quando o dano no tecido causa perda de sangue, há a formação de coágulo, para ser uma barreira provisória, evitando a saída de sangue do vaso. Esse coágulo é formado por plaquetas junto com uma rede de fibras de fibrina, fibronectina plasmática, vitronectina e

trombospondina. Por outro lado, o coágulo libera por meio de plaquetas ativadas, as citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador β (TGF- β), cluster de diferenciação 184 (CD184), entre outras. Todas essas substâncias possuem participação importante em algum estágio do reparo tecidual (Figura 5) (OPNEJA et al.,2019).

Poucos instantes após o início desse processo há o recrutamento de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, monócitos e, posteriormente, macrófagos. Essas células interagem com os produtos das plaquetas e das células endoteliais. Uma das suas funções é fazer a limpeza do leito da ferida, eliminando microrganismos, restos de células e da rede de fibrina, além de que os macrófagos fazem liberação de citocinas e fatores de crescimento (TGF- β , TGF- α , VEGF, FGF etc) que sinalizam a ativação dos fibroblastos e queratinócitos e o início da próxima fase (Figura 5) (REINKE, SORG, 2012).

Figura 5: Processo inflamatório, primeira fase da cascata de cicatrização.



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado da plataforma *BioRender* (versão livre - <https://biorender.com>)

1.3.2 Proliferação

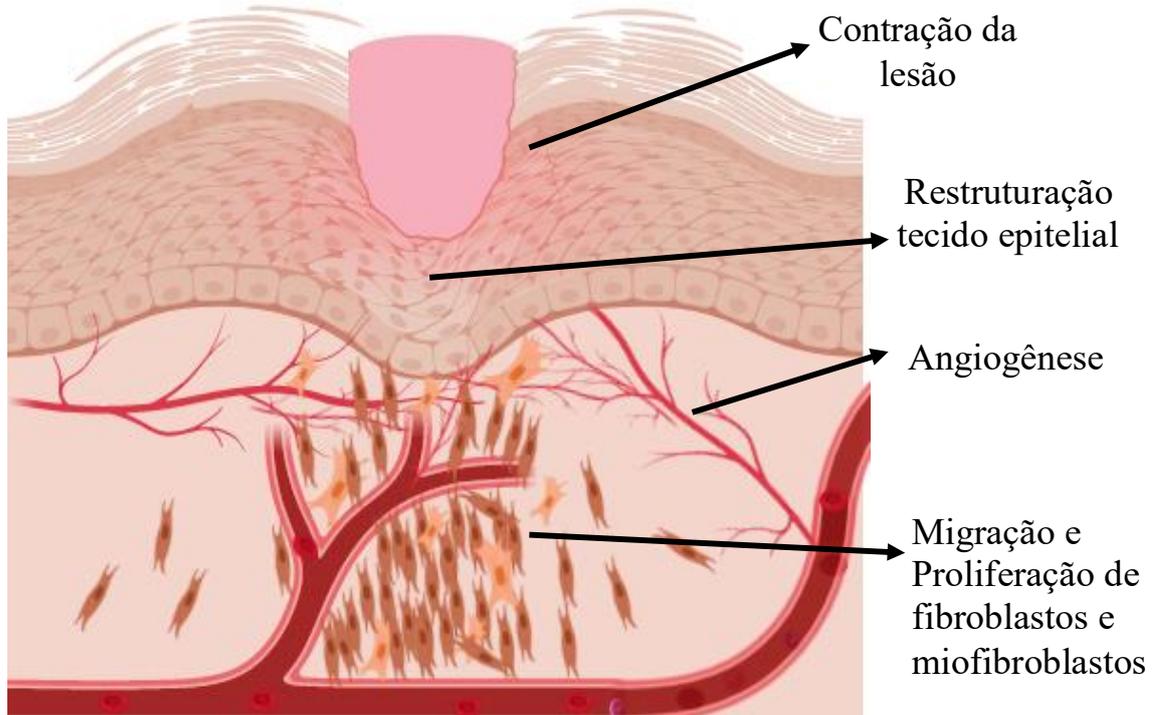
A segunda fase da cicatrização é a proliferação, onde ocorre principalmente a reepitelização, a formação de matriz extracelular (MEC) e de novos vasos próximos ao local com dano. Esses eventos ocorrem em sincronia e simultaneamente (GURTNER et al., 2008).

Nessa fase existe a migração de vários tipos celulares, devido a ativação de células-tronco do folículo piloso, glândulas e queratinócitos presentes na borda da ferida, com isso, os queratinócitos migram sobre a derme lesionada, e essa migração é de acordo com o gradiente quimiotático que é mediado por Interleucinas- 1 (IL-1) e por meio da rede de fibronectina que foi anteriormente formada no centro da lesão. A quimiotaxia das células epiteliais dá-se pela polimerização das fibras de actina do citoesqueleto celular. Primeiramente as fibras passam por uma nucleação e começam a se organizar gerando uma polaridade, então são adicionados monômeros no filamento de actina tanto na extremidade positiva, quanto na negativa, porém na extremidade positiva a velocidade de adição é maior. Assim as células se movimentam através do substrato (a derme), e esse mecanismo se encerra quando as células das duas margens opostas da lesão se tocam, conseqüentemente o tecido epitelial é formado (REINKE, SORG, 2012).

Na derme os fibroblastos migram e se diferenciam, afim de restabelecer essa camada, que serve de substrato para epiderme e proporciona firmeza à pele. Diversos fatores de crescimento, principalmente PDGF-BB, FGF-2 e TGF- β , interagindo com componentes da cascata de coagulação, como fibronectina, trombina e fibrinogênio induzem a migração e proliferação dos fibroblastos pela MEC danificada. Uma vez presentes nessa matriz, essas células começam a formar uma nova MEC, sintetizando e depositando fibras de colágeno, deixando assim o tecido mais elástico e resistente. Quando parte dos fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, esse novo tipo celular faz com que a pele em cicatrização adquira mais tensão e as bordas da ferida contraíam (Figura 6), promovendo juntamente com a migração celular o fechamento da lesão (GREAVES et al. 2013).

Para que a MEC passe por todas essas modificações é necessária a formação de novos vasos adjacente a lesão (angiogênese), que são mantidos total ou parcialmente por tempo e espaço determinado. Esses vasos nutrem a lesão, assim, promovendo a migração celular e reconstituição do tecido (Figura 6). Algumas substâncias como VEGF, colágeno, fibrinogênio, induz a migração, proliferação e sobrevivência de células endoteliais. Após o período de cura da ferida, essas células entram em apoptose e os vasos remanescentes se reorganizam (REINKE, SORG, 2012).

Figura 6: Processo de proliferação, segunda fase da cascata de cicatrização.



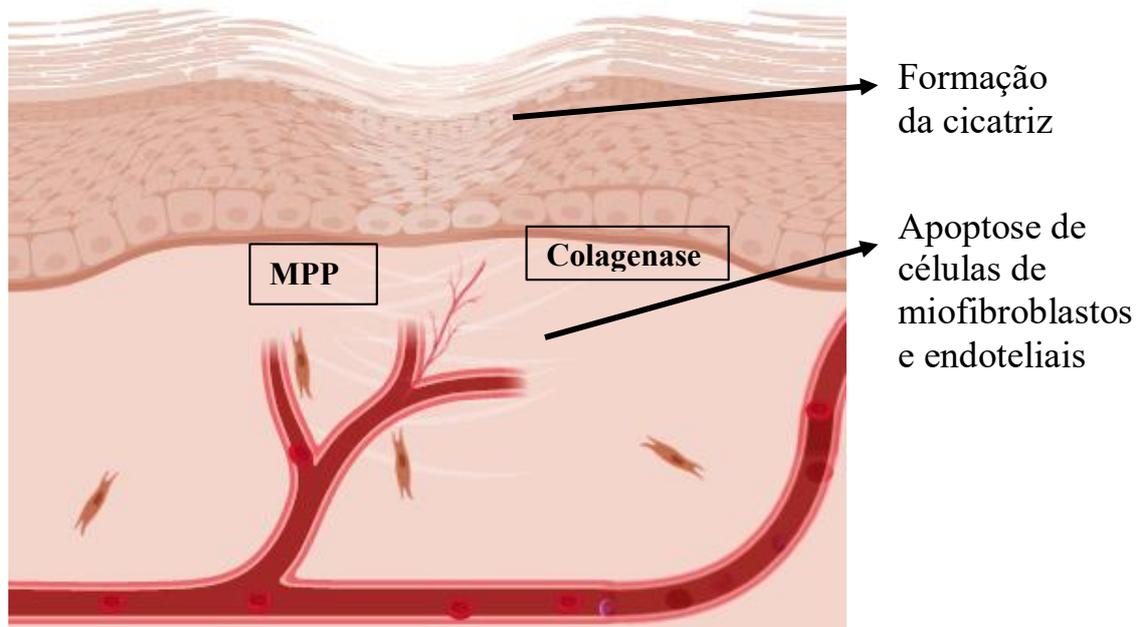
Fonte: Elaborado pela autora, adaptado da plataforma *BioRender* (versão livre - <https://biorender.com>)

1.3.3 Remodelação

A terceira e última fase da cicatrização é a remodelação, ela é a etapa que tem papel fundamental no resultado final da cicatriz. Qualquer desequilíbrio poderá formar uma cicatriz esteticamente desagradável ou até mesmo patológica (GANTWERKER, HOM, 2012). A principal função dessa fase é do remodelamento das fibras de colágeno, com o passar do tempo as fibras de colágeno tipo III são degradadas e reabsorvidas e são substituídas pelas do tipo I, que em uma pele saudável é presente em maior quantidade (SMITH et al., 2012; GURTNER et al., 2008).

Essa degradação da matriz antiga, para substituição por uma matriz nova mais resistente e com maior tração é feita por algumas enzimas como colagenase e metaloproteinase de matriz (MPP). Também há apoptose dos vários tipos celulares da fase inflamatória e proliferativa, por exemplo, os miofibroblastos que sintetizam e depositavam intensamente fibras de colágeno tipo III na matriz são substituídos por fibroblastos que não possuem a mesma intensidade de síntese e depósito; uma parcela das células endoteliais entram em morte celular, logo a quantidade de vasos sanguíneos que proliferaram anteriormente diminui e são reorganizados (Figura 7) (SMITH et al., 2012). Assim, a cascata de cicatrização é finalizada sem percalços.

Figura 7: Processo de remodelação, segunda fase da cascara de cicatrização.



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado da plataforma *BioRender* (versão livre - <https://biorender.com>)

1.4 TRATAMENTO

A cicatrização ocorre naturalmente, porém em algumas lesões existem complicações nesse processo, então para que o reparo se desenvolva de forma acelerada, organizada e sem uma evolução desfavorável é necessário fazer uso de fármacos e técnicas para não comprometer de forma drástica o bem-estar do indivíduo, pois dependendo do tipo de ferida poderá se tornar crônica. Também é necessário observar se existem problemas sistêmicos que prejudiquem a lesão, como doenças hormonais, diabetes, obesidade e influência ambiental como pressão, cesalhamento e aumento de temperatura, logo é importante associar o tratamento local, sistêmico e fazer o manejo adequado do indivíduo (HAN, CEILLEY, 2017).

O *U.S. Department of Health and Human Services Food* junto com o *Food and Drug Administration (FDA)*, o *Center for Drug Evaluation and Research (CDER)*, o *Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)* e o *Center for Devices and Radiological Health (CDRH)*, em 2006, propuseram um guia de diretrizes para avaliar e testar a qualidade de drogas, produtos biológicos e dispositivos para promover o processo de fechamento de feridas crônicas. Em testes clínicos, além da administração do produto, são adotados alguns procedimentos para o cuidado da úlcera crônica, como: desbridamento, reestabelecimento do fluxo sanguíneo de forma adequada, cuidado com infecções, auxílio nutricional, controle de glicemia (em pacientes

diabéticos), compressão para úlceras venosas, entre outros (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2006).

Esses métodos são comumente usados nos cuidados de pessoas com a patologia estudada nesse trabalho. Além desses são utilizados curativos, antibióticos (para caso de infecções), anti-inflamatórios, antissépticos, substâncias para promoção da restauração da MEC (colágeno, elastina, gelatina e algumas enzimas) (GUPTA et al., 2017; HAN, CEILLEY, 2017; ZIELINS et al., 2015).

A utilização de todos esses recursos acaba se tornando muito dispendioso e dependendo do estágio da úlcera e o quadro clínico do indivíduo, o tratamento não consegue reverter os danos do tecido, algumas vezes precisando amputar o membro (ZAYAN et al., 2019). OLSSON e colaboradores, verificaram que pacientes diabéticos hospitalizados que sofreram amputação tem um custo de aproximadamente UU\$ 12,8 dólares, sendo que as úlceras diabéticas são apenas um dos grupos de lesões cutâneas (OLSSON, 2018).

Então, para o tratamento de pessoas que sofrem com as lesões na pele, principalmente úlceras crônicas, são realizadas pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos, técnicas e dispositivos para promover a cicatrização de forma mais eficiente e rápida. Estudos recentes demonstram o desenvolvimento de materiais sintéticos e biomateriais que induzem a restauração do tecido (SUN et al., 2018; GASPAR-PINTILIESCU et al., 2019; PATIL et al., 2019; BALLESTEROS-CILLERO et al., 2019)

A investigação de produtos naturais é difundida pelo mundo, através do estudo da farmacologia das mais diversas plantas, houve o desenvolvimento de drogas conhecidas comercialmente como a aspirina, que foi desenvolvida utilizando o Salgueiro (LE'VESQUE, LAFONT, 2000). Além disso, grande parte de espécies vegetais possuem potencial farmacológico, podendo ser mais eficiente que os tratamentos já utilizados, além de ter a preferência de uma parcela da população (MSOMI, SIMELANE, 2018). A descoberta de novas biomoléculas com atividade cicatrizante proporciona o desenvolvimento de tratamentos mais rápidos, eficazes e com grande aceitação no mercado. Assim, é de fundamental importância a pesquisa para elucidar a ação farmacológica de novas substâncias.

1.5 *MONTRICHARDIA LINIFERA* (ARRUDA) SCHOTT

A. M. linifera, de nome popular aninga (Figura 8), da família da Areaceae é comumente encontrada em lugares alagados, próximo de rios, igarapés e lagos; podendo chegar até 6 metros de altura (MAYO et al., 1997; FREITAS et al., 2015). Essa espécie é predominante em lugares

de climas tropicais, devido sua localização em área de várzeas, ricas em matéria orgânica, a mesma serve de abrigo para alguns peixes e pequenos animais aquáticos, a também para a desova de jacarés (PANTOJA, 2011). Também é capaz de formar grandes populações, chamadas de aningais, que evitam o processo erosivo das margens dos rios, e assim ajudam a preservar a mata ciliar e manter a biodiversidade do local (TEXEIRA et al., 2014).

Em estudos anteriores foi demonstrado que a *M. linifera* apresenta altas concentrações de magnésio e manganês, se considerado tóxica, e inapropriada para ingestão por animais (AMARANTE et al., 2010). Também foram encontrados teores consideráveis de minerais nessa planta, como cálcio, ferro, cobre e zinco (AMARANTE et al., 2009; AMARANTE et al., 2017). Há relatos de comunidades ribeirinhas amazônicas de que a seiva desse vegetal causa queimaduras e danos oculares, quando em contato com a pele e os olhos, respectivamente (AMARANTE et al., 2009).

Mas apesar dessa toxicidade é descrito na literatura que a população utiliza a *M. linifera* para fins medicinais (SARQUIS et al., 2019). As folhas são utilizadas como antirreumáticos e para tratamento de úlceras cutâneas, também são usadas as raízes como diurética, apesar de serem tóxicas (PLOWMAN, 1969). COSTA e colaboradores (2008) demonstraram que o extrato etanólico da folha de *M. linifera* possui baixa toxicidade em contato com *Artemia Salina*, porém no trabalho de AMARANTE et al., (2011a) demonstrou-se que frações do extrato diclorometano da folha da mesma espécie possui alta toxicidade quando em contato com *Artemia Salina*.

Foi descrito que o extrato hexano da folha da *M. linifera* possui baixa ação antimalárica (SILVA et al, 2011), entretanto o extrato metanólico e etanólico da folha possui atividade antibacteriana (MIRANDA et al., 2015), já a fração diclorometânica e metanólica do extrato etanólico do caule desse vegetal possui atividade antiplasmódica (AMARANTE et al., 2011b), além dos extratos da folha e caule apresentarem atividade antioxidante e inseticida (SANTOS et al., 2014). Também foram encontrados compostos fenólicos, como os flavonoides nas folhas da *M.linifera*, assim demonstrando potencial farmacológico (AMARANTE et al., 2015).

Porém, muito pouco se sabe sobre a atividade farmacológica da *M. linifera*, e não foram encontrados trabalhos na literatura que demonstrem a ação cicatrizante dessa espécie, mesmo se sabendo que a população utiliza a mesma para tratar lesões na pele e que possui compostos biologicamente ativos. Então, iniciamos a investigação das propriedades cicatrizantes da *M. linifera*, utilizando extrato do caule, pecíolo e folha dessa espécie.

Figura 8: População de *M. linifera* (Arruda) Schott, conhecida como aningal.



Fonte: Acervo do Autor.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade cicatrizante dos extratos etanólicos do caule, pecíolo e folhas da *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a classe de substância presente nos extratos etanólicos do caule, pecíolo e folhas da *M. linifera*
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos etanólicos do caule, pecíolo e folhas da *M. linifera*
- Analisar a cicatrização *in vitro* induzida pelos extratos etanólicos do caule, pecíolo e folhas da *M. linifera*
- Avaliar a proliferação celular induzida pelos extratos etanólicos do caule, pecíolo e folhas da *M. linifera*
- Comparar qual extrato testado será mais eficaz no reparo tecidual.

3. METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos etanólicos do caule, pecíolo e folhas foram doados gentilmente para realização dos testes, pela professora Dra. Cristine Bastos do Amarante, coordenadora do Laboratório de Análises Químicas do Museu Paraense Emílio Goeldi (LAQGoeldi), do grupo de pesquisa do Museu Paraense Emilio Goeldi.

3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR HPTLC

Foi realizado no LAQGoeldi, através da colaboração com a professora Dra. Cristine Bastos do Amarante, a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) nos extratos etanólicos da folha, caule e pecíolo da *M. linifera*, para identificação de classes de substâncias e atividade antioxidante presentes nos mesmos. Foi utilizado uma substância padrão com comparação das classes esperadas para serem encontradas (terpenos, flavonoides, alcaloides, cumarinas e fenóis).

A classe de substância, a substância padrão, a concentração e o revelador utilizado estão representados no quadro 1.

Com o teste de seletividade dos solventes, foi possível determinar o melhor sistema de eluição para os extratos. Os solventes testados foram: hexano, tolueno, acetato de etila, diclorometano, éter etílico, etanol, acetona e metanol. Os testes foram feitos com o extrato etanólico da folha da *M. linifera*.

O sistema de eluição selecionado foi diclorometano:metanol:ácido fórmico (DCM/MeOH/HFo) a 2% (97:2:1) para o teste para identificação de terpenos e 15% (84:15:1) para os demais testes.

Após o teste de seletividade dos solventes no extrato etanol das folhas de *M. linifera* (E), foi escolhido o perfil cromatográfico do sistema de eluição (Figura 9). Também foi demonstrado o desenvolvimento do perfil químico do sistema de eluição (DCM/MeOH/HFo) a 2 % e 15 % sob luz UV 254 nm e UV 366 nm, VAS e NP/PEG no etanol das folhas de *M. linifera* (E) (Figura 10).

O método DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil) foi utilizado para verificar atividade antioxidante dos extratos, será utilizado o padrão rutina como comparação.

Quadro 1: Parâmetros utilizados para HPTLC

Classe de Substâncias	Padrão	Concentração	Volume aplicado	Massa Inoculo	Revelador
Terpenos (roxa)	β -Amirina	20 ng μL^{-1}	5,0 μL	0,1 μg	VAS
Flavonoides (Amerela)	Rutina	200 ng μL^{-1}	5,0 μL	1,0 μg	NP/PEG
Composto Fenólico (Avermelhada)	Rutina	200 ng μL^{-1}	5,0 μL	1,0 μg	FBS
Alcalóides (Laranja)	Brucina	200 ng μL^{-1}	5,0 μL	1,0 μg	Dragendorff
Cumarinas (Azul)	Esculina	200 ng μL^{-1}	5,0 μL	1,0 μg	KOH

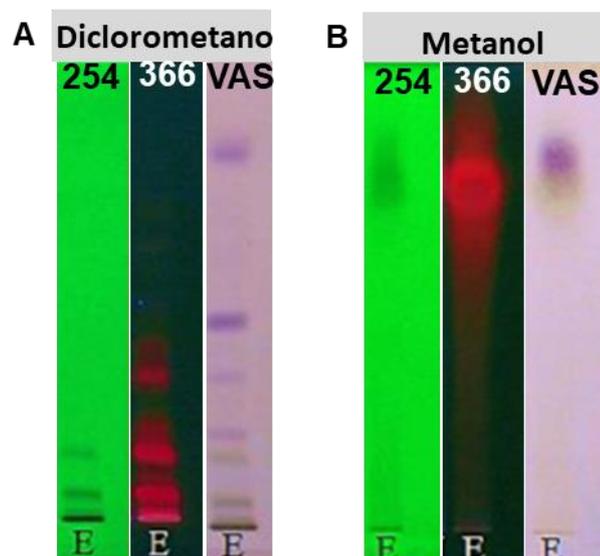
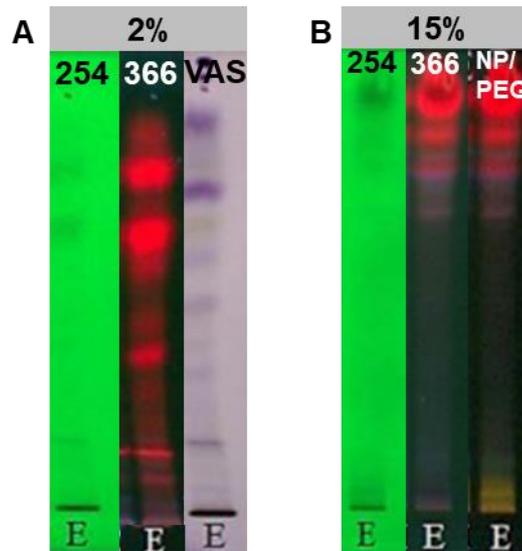
Figura 9: Teste de seletividade dos solventes A) Diclorometano e B) Metanol dos extratos etanólicos das folhas de *M. linifera*.

Figura 10: Desenvolvimento do perfil químico do sistema de eluição (DCM/MeOH/HFo). Sistema à: A) 2 % sob luz UV 254 e 366, VAS; B) 15 % sob luz UV 254 e 366 e NP/PEG, no extrato etanólico das folhas da *M. linifera*.



O procedimento cromatográfico foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Wagner & Bladt (2001). Foi utilizado 0,01 g dos extratos da folha, caule e pecíolo da *M. linifera*, os mesmos foram diluídos em 2 ml de etanol. Cada solução dos extratos foi aplicada em uma concentração de 25 µg/inóculo com o aplicador automático Módulo ATS4 – CAMAG em cromatoplasas de sílica gel TLC alumínio F254 60A – Silicycle e após cada teste, as placas foram registradas em fotodocumentador Módulo TLC Visualizer sob luz UV 254 nm e UV 366 nm.

Foi utilizado para a revelação das placas cromatográficas as metodologias descritas abaixo para cada revelador:

3.2.1. Revelador VAS (Vanilina em Ácido Sulfúrico)

Foi adicionado 5ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado em 100ml de etanol gelado (0° C), em seguida foi acrescentado 1 g de vanilina e a solução foi homogeneizada. Após a solução foi aplicada na placa cromatográfica, e foi aquecido em chapa e visualizado em luz visível. O teste positivo foi para o aparecimento de bandas roxas.

3.2.2. Revelador NP/PEG (Difenilboriloxietilamina/ Polietilenoglicol)

Foi adicionado 1g de difenilboriloxietilamina em 100 ml de metanol fazendo a solução NP, separadamente adicionar 5,0 g de polietilenoglicol em 100 ml de metanol, assim fazendo a solução PEG. Aplicar primeiro a solução NP sobre a placa e em seguida a solução de PEG. Visualizar em luz UV 366 nm. O teste positivo para o aparecimento de bandas amareladas.

3.2.3. Revelador KOH (Hidróxido de Potássio)

Foi adicionado 5,0 g de KOH em 100 ml de etanol gelado (0° C) e homogeneizado. Em seguida, foi aplicado sobre a placa cromatográfica e visualizado em luz UV 366 nm. O teste positivo para o aparecimento de bandas azul fluorescente.

3.2.4. Revelador FBS (*Fast Blue Salt*)

Foi solubilizado 0,5 g de FBS em 100 ml de água deionizada. Adicionalmente, foi preparado uma solução a 10 % em etanol de hidróxido de sódio (NaOH). Após aplicação da solução de FBS na placa cromatográfica, foi aplicado a solução de NaOH e visualizada em luz visível. O teste positivo para o aparecimento de bandas avermelhadas.

3.2.5. Revelador *Dragendorff*

Foi preparado a solução A, dissolvendo 0,85 g de nitrato de bismuto básico em 10 ml de ácido acético glacial e 40 ml de água deionizada. E separadamente foi preparado a solução B, dissolvendo 16 g de iodeto de potássio em 60 ml de água deionizada. Também foi preparado uma solução a 10 % de H₂SO₄ em etanol. Foi misturado as soluções A e B na proporção 1:1 (2 ml de cada) e diluído esta mistura em 4 ml de ácido acético glacial e 20 ml de água deionizada para o preparo do spray.

Logo após foi aplicado este spray na placa cromatográfica e em seguida a solução a 10% de H₂SO₄. A placa foi aquecida sutilmente e visualizada na luz visível. O teste positivo para o aparecimento de bandas alaranjadas.

3.2.6. DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil)

Foi dissolvido 45 mg de DPPH em 50 ml de metanol. Essa solução foi aplicada na placa cromatográfica e protegida da luz por 30 minutos e, após esse período, foi visualizada na luz visível. O teste positivo para o aparecimento de bandas amareladas.

3.3 CULTURA CELULAR

Foi utilizada as células de L929 (fibroblastos de tecido adiposo de camundongo). As células serão cultivadas em DMEM alta glicose, suplementado com soro bovino fetal (FBS) 10%, HEPES 10 mM, L-Glutamina 2mM, 1% Aminoácidos não essenciais MEM, estreptomicina 100 U / mL e penicilina 100 U / mL, amphotericina B 1 ml/L. As células serão mantidas a 37°C com 5 % de CO₂ em uma estufa humidificada, a passagem para os experimentos será feito quando as células atingiram 80% de confluência.

3.4 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

As células foram plaqueadas separadamente sobre placas de 96 poços concentração de $2,5 \times 10^4$, após serem contadas com azul de tripan em câmera de Neubauer.

A viabilidade celular foi estimada pelo ensaio baseado no método proposto por TIM MOSMANN (1983) com modificações, que consiste na conversão do cromógeno solúvel, brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), pela ação de desidrogenases presentes em células viáveis, em formazan pouco solúvel em H₂O, o qual forma precipitado escuro no interior das células.

Os grupos foram: (1) controle, sem a presença dos extratos, (2) caule, (3) pecíolo, (4) folha. Será realizado uma curva de concentração seriada (100 µg/ml até 0,19 µg/ml) de cada extrato e a partir dos resultados obtido nesse teste foram escolhidas 3 concentrações de cada extrato para realização dos testes posteriores. O teste foi feito em triplicata (n=8) em placa de 96 poços em um período de incubação de 24h, 48h e 72h. Para a solubilização do formazan foi utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO) que foi adicionado após a retirada do meio de cultura do poço para fazer a leitura em uma leitora de microplacas digital modelo Polaris - Celer Biotecnologia S.A. em comprimento de onda de $\lambda = 570$ nm.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CICATRIZAÇÃO - *SCRATCH*

As linhagens de células cresceram na placa de 12 poços, foi utilizado 29×10^4 células/poço, obtendo uma confluência de aproximadamente 90%, formando uma monocamada, após foi feito uma "ferida" com a ponteira de 10µl atravessando o poço. Em seguida, foi feito o tratamento com os extratos e retirado microfotografias nos tempos 0h, 12h, 24h, 48h, utilizando o software STEREOLOGER (Stereology Resource Center, Inc., version 11.0) acoplado ao microscópio invertido medilux - TCM400. O grupo sem tratamento foi usado como controle. Foi utilizado o programa ImageJ® para a análise quantitativa das microfotografias. A área de lesão foi calculada em porcentagem, considerando que os grupos do tempo 0h obtiveram área lesionada de 100%, as áreas de lesão dos demais tempo foram calculadas da seguinte forma:

$$\text{Área de lesão grupo y no tx (\%)} = \frac{(100\%) \text{ área de lesão do grupo y t0(pixel)}}{\text{Área de lesão do grupo y no tx (pixel)}}$$

3.5 ANÁLISE MORFOLOGICA

Após tratadas, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, em seguida foram lavadas com PBS e corados com Hematoxilina, novamente foram lavados os poços e adicionado eosina, depois da última lavagem com PBS foram fotografados todos os poços para a análise qualitativa, utilizando o software STEREOLOGER (Stereology Resource Center, Inc., version 11.0) acoplado ao microscópio invertido medilux - TCM400. Nos tempos 0h e 24h do ensaio de cicatrização foi realizado a coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) das células, afim de verificar se houve modificação morfológica nas células e observar com mais clareza a área de lesão no tempo de 24 horas.

3.6 AVALIAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para realizar a imunofluorescência foram plaqueadas as células em placa de 24 poço com confluência de 50-70%, usando 8×10^4 células/poço. Todos os grupos foram incubados com BrdU (Bromodeoxyuridine) a 10µM por 2horas, após o tratamento de 24 horas. Em seguida, as células foram fixadas paraformaldeído 4%, em seguida foram permeabilizadas com 2N HCl por 15 min a 37°C, e lavado com ácido bórico 0,15M por 15 min, depois incubado por 2 horas em solução bloqueio (PBS-donkey e Triton-X 100), em seguida incubado *overnight* com anti-BrdU mouse (1:1000, Sigma Aldrich®). Depois foi removido a solução com anticorpo primário e

adicionado o anticorpo Cy3 donkey anti-mouse (1:500) por 2 horas, após lavado os poços com PBS foi adicionado DAPI (1:100 000), em seguida os poços foram lavados com PBS e as lamínulas com as células coradas foram montadas, mantendo-as protegidas da luz. As imagens fluorescentes foram obtidas em um microscópio fluorescente Axio Imager.M2 (ZEISS). O número de células positivas para BrdU foram quantificadas pelo programa ImageJ®.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA *One-Way* e como *post-test* Bonferroni para o ensaio de citotoxicidade; o teste ANOVA *Two-Way* com *post-test* Turkey para a análise de cicatrização *in vitro*; e para a avaliação de proliferação celular foi utilizado ANOVA *One-Way* e como *post-test* Turkey. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do *software* Graphpad Prism. O valor considerado significativo foi de $p < 0,05$ nos testes aplicados.

4. RESULTADOS

4.1. CLASSES DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NOS EXTRATOS

A prospecção fitoquímica foi realizada nos extratos brutos etanólicos do caule, pecíolo e folha de *M. linifera* com o intuito de identificação da atividade antioxidante e classes de substâncias presentes nos extratos, para posteriormente identificar possíveis substâncias responsáveis pela atividade biológica que os extratos possam ter.

Então, o extrato da folha demonstrou a atividade antioxidante e a presença de terpenos, flavonoides, fenóis; já o extrato do pecíolo demonstrou a presença de terpenos e o extrato do caule demonstrou atividade antioxidante e a presença de terpenos (Quadro 2). Onde pode ser demonstrado através dos perfis cromatográficos específicos para cada classe de substâncias (Figura 11)

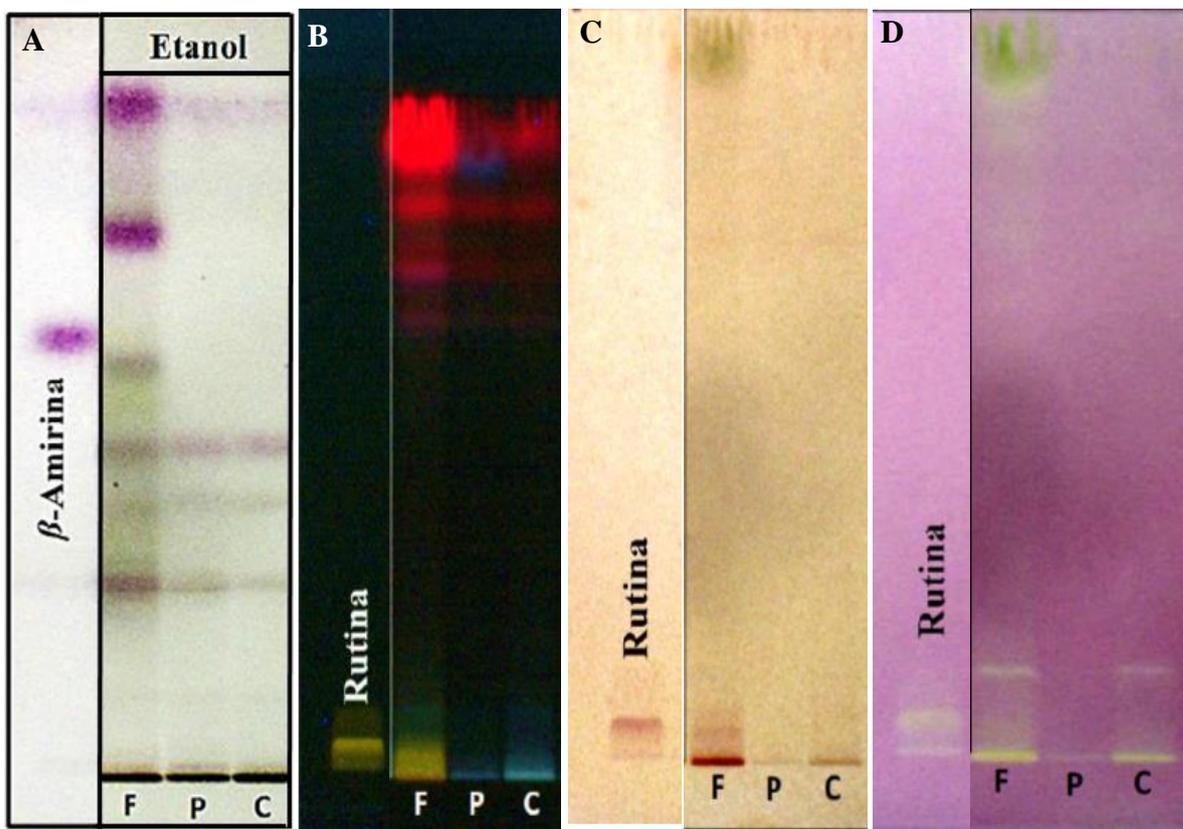
Quadro 2: Prospecção fitoquímica nos extratos da folha, pecíolo e caule de *M. linifera*, para presença de atividade antioxidante e as classes de substâncias: terpenos, flavonoides, fenóis, alcalóides e cumarina.

Classe de substâncias	Folha	Pecíolo	Caule
Terpenos	+	+	+
Flavonoides	+	-	-
Fenóis	+	-	-
Alcalóides	-	-	-
Cumarina	-	-	-
Atividade antioxidante	+	-	+

O perfil cromatográfico para os extratos etanólicos da folha, pecíolo e caule, para identificação de terpenos, foi revelado com VAS e utilizado β -Amirina como padrão de referência, demonstrou resultado positivo para os três extratos, sendo que o extrato da folha pode-se observar bandas roxas mais acentuadas que os demais extratos (Figura 11A).

O sistema de eluição utilizado no teste de terpenos foi DCM/MeOH/HFo a 2 % para a visualização dos compostos de baixa polaridade, no qual os resultados demonstraram que a planta é rica nestes compostos.

Figura 11: Perfil cromatográfico por HPTLC dos extratos etanólicos da folha (F), pecíolo (P) e caule (C) da *M. linifera*. A) Para identificação de terpenos por VAS (2%); B) para identificação de flavonoides por NP/PEG; C) para identificação de compostos fenólicos por FBS; D) para identificação por atividade antioxidante por DPPH.



Foi demonstrado a presença de flavonoides apenas no extrato da folha, banda amarela, ausente nos demais extratos (Figura 11B). Para o perfil cromatográfico para flavonoides foi utilizado o sistema de eluição com DCM/MeOH/HFo a 15 % e o padrão rutina como referência.

O perfil cromatográfico para compostos fenólicos utilizando o sistema de eluição utilizado foi DCM/MeOH/HFo a 15 % e o padrão rutina como referência, detectou a presença de compostos no extrato da folha, banda avermelhada (Figura 11C).

Para o teste fitoquímico para determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH foi utilizado o sistema de eluição com DCM/MeOH/HFo a 15 % e padrão rutina como referência. E foi demonstrado a presença de antioxidantes nos extratos da folha e caule, bandas amareladas (Figura 11D).

4.2. CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DA *M.linifera*

Após a avaliação fitoquímica dos extratos etanólicos do caule, pecíolo e folha da *M.linifera* foi verificado a citotoxicidade dos mesmos, através do ensaio de MTT, quando colocados em contato por diferentes intervalos de tempo e concentração com as células L929.

Foi demonstrado que nenhuma concentração da curva seriada feita com os três extratos usados nesse trabalho foi citotóxica nos tempos de 24, 48 e 72 horas, pois todos os grupos quando expostos as diferentes concentrações dos extratos e diferente intervalo de tempo demonstraram viabilidade celular maior que 80% em relação ao controle. Foi considerado o grupo controle com 100% de viabilidade celular (Figura 12,13 e 14).

Para o tempo de 24horas, foi possível observar que as concentrações de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml do extrato do caule, demonstraram uma viabilidade celular de $102 \pm 7,819 \%$, $100,80 \pm 9,462 \%$, $101,50 \pm 9,076 \%$, $106,90 \pm 9,938 \%$, $107,30 \pm 8,016\%$, $109,60 \pm 8,223\%$, $111,60 \pm 9,517 \%$, $111,80 \pm 10,64 \%$, $114,50 \pm 12,11\%$, $120,50 \pm 12,79\%$, respectivamente. Com aumento significativo na viabilidade celular nas concentrações de 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml em relação ao controle (Figura 12A).

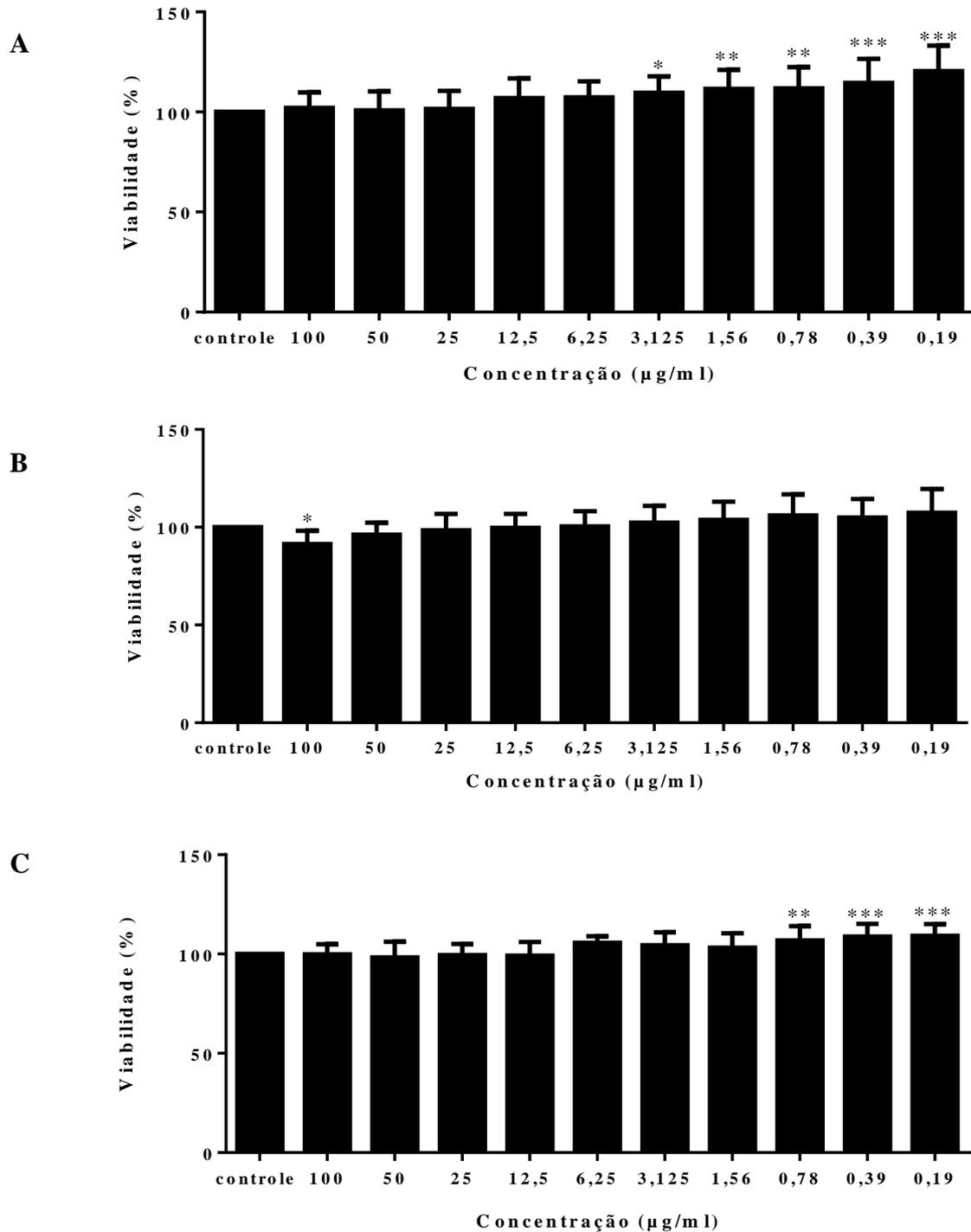
Para o tempo de 24horas, as concentrações de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml do extrato do pecíolo foi demonstrado viabilidade celular de $91,39 \pm 6,111\%$, $96,21 \pm 88,336\%$, $98,49 \pm 7,091\%$, $99,70 \pm 7,755\%$, $100,40 \pm 8,536\%$, $102,4 \pm 9,197\%$, $103,90 \pm 10,76\%$, $106 \pm 9,512\%$, $104,90 \pm 12,22\%$, respectivamente (Figura 12B).

Para o tempo de 24horas, as concentrações de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml do extrato da folha foi demonstrado viabilidade celular de $99,79 \pm 5,160\%$, $98,31 \pm 7,828\%$, $99,45 \pm 5,557\%$, $99,20 \pm 6,811\%$, $105,70 \pm 3,248\%$, $104,40 \pm 6,562\%$, $103,20 \pm 7,254\%$, $106,80 \pm 6,485\%$, $108,80 \pm 6,485\%$, $109,20 \pm 5,921\%$, respectivamente. Sendo que as concentrações de 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml apresentaram um aumento significativo na viabilidade celular em relação ao controle (Figura 12C).

Enquanto para o tempo de 48 horas, as concentrações de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml do extrato do caule, apresentaram uma viabilidade celular de $93,14 \pm 5,412\%$, $96,43 \pm 5,733\%$, $99,29 \pm 7,532\%$, $98,47 \pm 5,337\%$, $99,79 \pm 6,675\%$, $100,90 \pm 8,154\%$, $100,30 \pm 6,284\%$, $100,60 \pm 6,745\%$, $102 \pm 7,192\%$, $107,40 \pm 7,862\%$, respectivamente. Sendo que a concentração de 0,19

$\mu\text{g/ml}$ apresentou um aumento significativo na viabilidade celular em relação ao controle (Figura 13A).

Figura 12: Viabilidade celular em porcentagem depois de 24 horas, em diferentes concentrações dos extratos etanólicos da *M. linifera*, avaliado pelo ensaio de MTT. A) Extrato do caule; B) extrato do pecíolo; C) extrato da folha. Com significância de * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. controle, representados sobre as barras de erro dos grupos. Esses resultados são representativos de três experimentos independentes e são apresentados como média \pm desvio padrão.



As concentrações de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml do extrato do pecíolo, no tempo de 48 horas, apresentaram uma viabilidade celular de $96,43 \pm 10,16\%$, $96,19 \pm 9,931\%$, $100,20 \pm 8,583\%$, $101,10 \pm 8,021\%$, $99,86 \pm 10,11\%$, $99,91 \pm 8,230\%$, $100,80 \pm 9,185\%$, $100,60 \pm 9,465\%$, $105 \pm 9,239\%$, $111,70 \pm 8,011\%$, respectivamente. Sendo que a concentração de 0,19 µg/ml, , do extrato do caule nesse tempo, apresentou um aumento significativo na viabilidade celular em relação ao controle (Figura 13B).

No tempo de 48 horas, as concentrações de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml do extrato da folha, apresentaram uma viabilidade celular de $100,4 \pm 14,77\%$, $101,1 \pm 14,57\%$, $105 \pm 9,021\%$, $113,7 \pm 9,908\%$, $119,3 \pm 12,32\%$, $127,8 \pm 15,13\%$, $126,6 \pm 15,55\%$, $130,7 \pm 14,71\%$, $136,3 \pm 14,85\%$, $111,70 \pm 8,011\%$, respectivamente. E as concentrações de 12,5 µg/ml, 6,25µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml, do extrato da folha nesse tempo, apresentaram um aumento significativo na viabilidade celular em relação ao controle (Figura 13C).

Já para o tempo de 72 horas, as concentrações de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml do extrato do caule, apresentaram uma viabilidade celular de $84,81 \pm 11,83\%$, $81,74 \pm 14,33\%$, $89,6 \pm 11,37\%$, $91,66 \pm 9,854\%$, $96,36 \pm 11,69\%$, $96,83 \pm 9,006\%$, $98,68 \pm 7,81\%$, $98,94 \pm 9,099\%$, $106,8 \pm 6,054\%$, $113,6 \pm 6,053\%$, respectivamente. A concentração de 0,19 µg/ml, do extrato do caule nesse tempo, demonstrou um aumento significativo na viabilidade celular em relação ao controle (Figura 14A).

As concentrações de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml do extrato do pecíolo, no tempo de 72 horas, apresentaram uma viabilidade celular de $89,87 \pm 9,279\%$, $94,69 \pm 13,04\%$, $95,18 \pm 12,18\%$, $98,72 \pm 14,28\%$, $98,73 \pm 13,89\%$, $95,41 \pm 15,24\%$, $98,03 \pm 15,25\%$, $100,2 \pm 11,95\%$, $104,6 \pm 9,618\%$, $104 \pm 9,367\%$, respectivamente (Figura 14B).

As concentrações de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml do extrato da folha, no tempo de 72 horas, apresentaram uma viabilidade celular de $104,10 \pm 13,14\%$, $110,1 \pm 15,64\%$, $114,5 \pm 20,92\%$, $125,5 \pm 20,35\%$, $127,7 \pm 25,69\%$, $131,1 \pm 25,07\%$, $132,6 \pm 22,74\%$, $134,8 \pm 24,84\%$, $137,8 \pm 20,83\%$, $149,8 \pm 20,91\%$, respectivamente. E as concentrações de 12,5 µg/ml, 6,25µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml , do extrato do caule nesse tempo, apresentaram um aumento significativo na viabilidade celular em relação ao controle (Figura 14C).

Figura 13: Viabilidade celular em porcentagem depois de 48 horas, em diferentes concentrações dos extratos etanólicos da *M. linifera*, avaliado pelo ensaio de MTT. A) Extrato do caule; B) extrato do pecíolo; C) extrato da folha. Com significância de * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. controle, representados sobre as barras de erro dos grupos. Esses resultados são representativos de três experimentos independentes e são apresentados como média \pm desvio padrão.

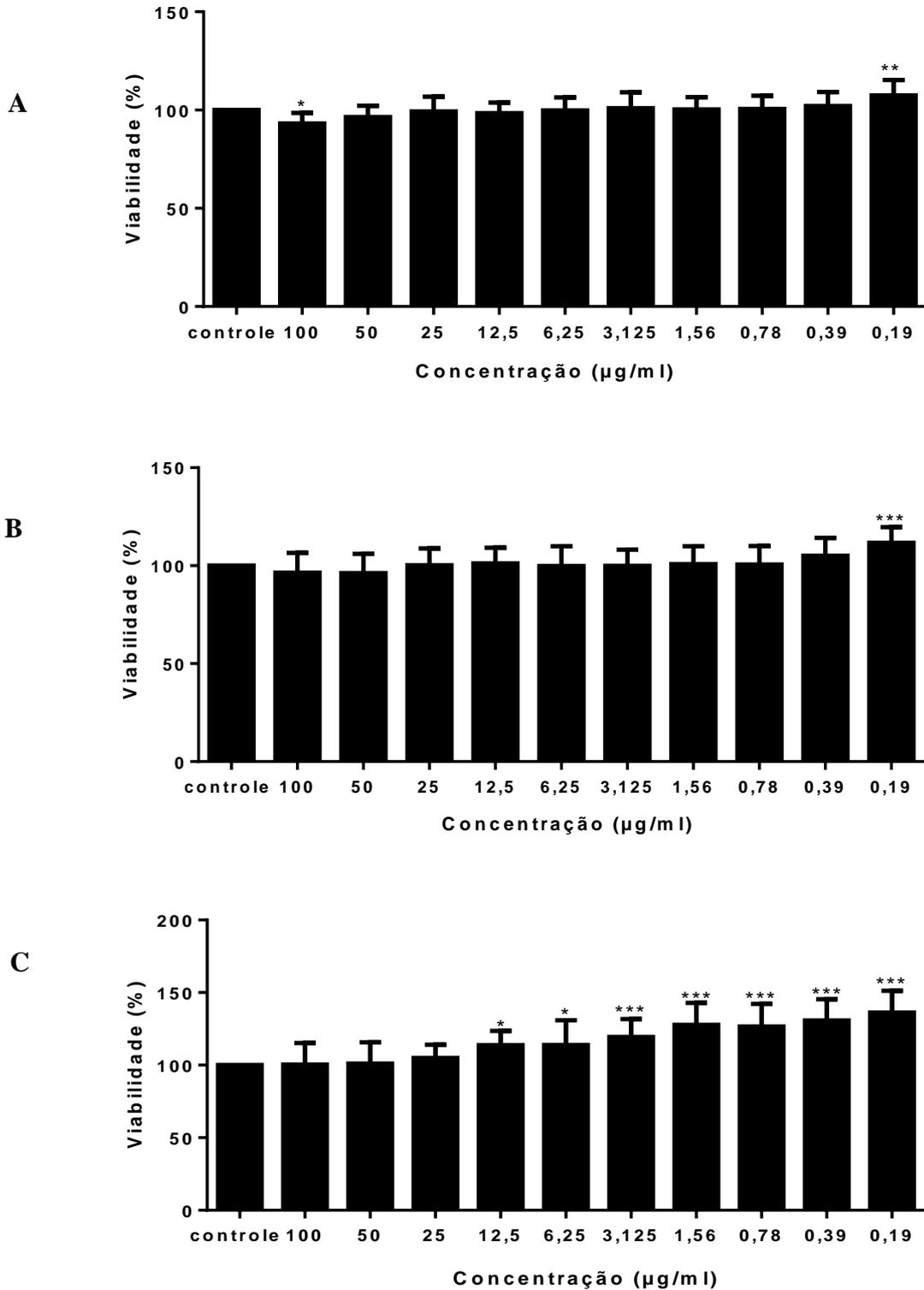
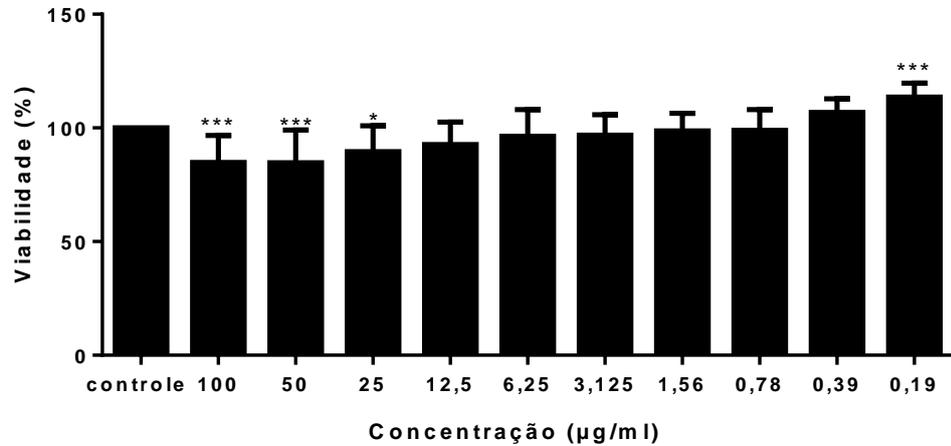
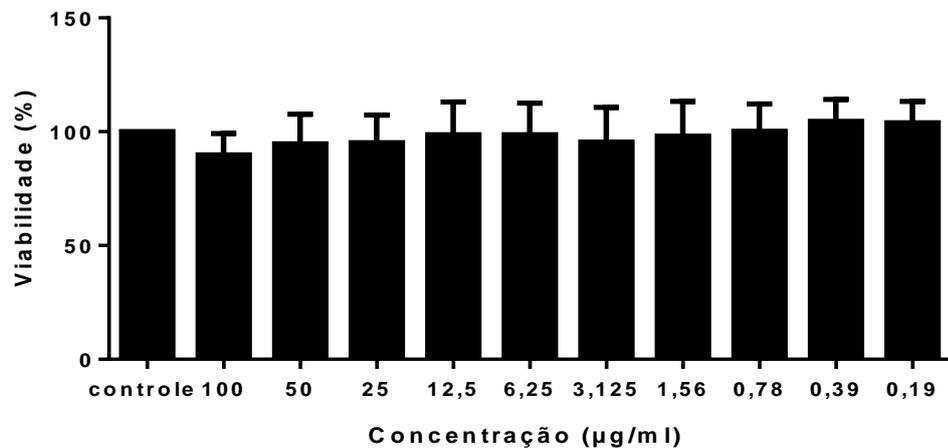


Figura 14: Viabilidade celular em porcentagem depois de 72 horas, em diferentes concentrações dos extratos etanólicos da *M. linifera*, avaliado pelo ensaio de MTT. A) Extrato do caule; B) extrato do pecíolo; C) extrato da folha. Com significância de * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. controle, representados sobre as barras de erro dos grupos. Esses resultados são representativos de três experimentos independentes e são apresentados como média \pm desvio padrão.

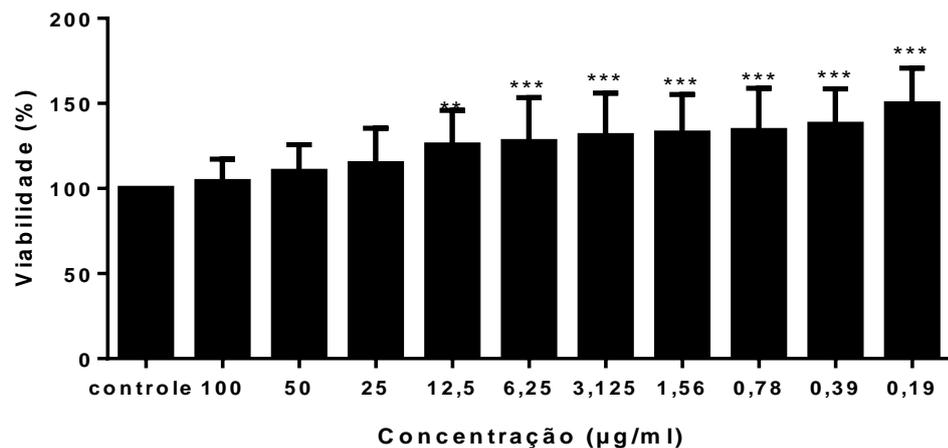
A



B



C



A partir das curvas de concentração e tempo dos extratos testados nesse trabalho foi escolhido as três menores concentrações (0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml) de cada extrato para realizar as próximas análises, devido as menores concentrações apresentarem maior viabilidade celular em relação ao controle, com exceção da curva do extrato do pecíolo nos tempos de 24 horas e 72 horas.

4.3. AVALIAÇÃO DA DIMINUIÇÃO DA ÁREA DE LESÃO *IN VITRO*

Foi realizado o teste *scratch*, onde foi feito uma lesão (risco) com uma ponteira de 10µl em uma monocamada de células, depois foi verificado se os tratamentos de até 24 horas após a lesão promovem migração significativa das células, com as concentrações escolhidas dos extratos, assim diminuindo a área do risco significativamente.

Todos grupos do tempo 0 foram considerados 100%, pois foi o momento que ocorreu a lesão e não houve tempo hábil para ocorrer migração celular. O grupo controle nos tempos de 6 horas, 12 horas e 24 horas demonstraram áreas de lesões de $82,08 \pm 12,13\%$, $56,14 \pm 15,75\%$, $34,34 \pm 10,12\%$, respectivamente.

Já os grupos tratados com extrato do caule das concentrações 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml demonstraram as áreas de lesões, no tempo de 6 horas, de $66,108 \pm 23,85\%$, $66,10 \pm 13,13\%$, $64,81 \pm 20,42\%$, respectivamente. Já no tempo de 12 horas, para as mesmas concentrações respectivas desse extrato as áreas de lesões foram de $38,86 \pm 20,66\%$, $40,45 \pm 14,64\%$, $32,29 \pm 16,62\%$, respectivamente. Para o tempo de 24 horas, para as mesmas concentrações respectivas desse extrato as áreas de lesões foram de $13,48 \pm 11,20\%$, $10,67 \pm 7,94\%$, $10,15 \pm 7,35\%$, respectivamente. Sendo que na concentração de 0,39 µg/ml no tempo de 24 horas demonstrou uma diminuição da área significativa em relação ao grupo controle do tempo de 24 horas; e a concentração de 0,19 µg/ml também demonstrou uma diminuição significativa da área de lesão nos tempos de 12 horas e 24 horas em relação ao grupo controle dos respectivos tempos (Figura 15). Esses dados quantitativos são possíveis observar qualitativamente através das microfotográficas de cada grupo e tempo (Figura 16)

Os grupos tratados com extrato do pecíolo nas concentrações 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml demonstraram áreas de lesão, no tempo de 6 horas, de $74,02 \pm 15,16\%$, $80,32 \pm 22,50\%$, $75,56 \pm 20,09\%$, respectivamente. Já no tempo de 12 horas, para as mesmas concentrações do mesmo extrato a áreas de lesões foram de $38,86 \pm 20,66\%$, $46,79 \pm 12,46\%$, $40,98 \pm 5,45\%$, respectivamente. Para o tempo de 24 horas, as respectivas concentrações do mesmo extrato a áreas de lesões foram de $13,48 \pm 11,21\%$, $27,33 \pm 13,86\%$, $12,40 \pm 7,72\%$,

respectivamente. Sendo que na concentração de 0,19 $\mu\text{g/ml}$, no tempo de 24 horas, demonstrou uma diminuição significativa em relação ao grupo controle do mesmo tempo (Figura 17). Esses dados quantitativos são possíveis observar qualitativamente através das microfotográficas de cada grupo e tempo (Figura 18).

Os grupos tratados com extrato da folha nas concentrações 0,78 $\mu\text{g/ml}$, 0,39 $\mu\text{g/ml}$, 0,19 $\mu\text{g/ml}$ demonstraram áreas de lesão, no tempo de 6 horas, de $73,08 \pm 21,35\%$, $72,91 \pm 18,19\%$, $67,84 \pm 17,89\%$, respectivamente. Já no tempo de 12 horas, para as mesmas concentrações desse extrato as áreas de lesões foram de $48,76 \pm 21,17\%$, $48,02 \pm 17,30\%$, $44,54 \pm 18,70\%$, respectivamente. Para o tempo de 24 horas, para as respectivas concentrações desse extrato as áreas de lesões foram de $24,59 \pm 14,58\%$, $26,07 \pm 16,73\%$, $23,75 \pm 15,76\%$, respectivamente (Figura 19). Esses dados quantitativos são possíveis de se observar qualitativamente através das microfotográficas de cada grupo e tempo (Figura 20).

Figura 15: Área da lesão em monocamadas de células L929, do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do caule nas concentrações de 0,78 $\mu\text{g/ml}$, 0,39 $\mu\text{g/ml}$, 0,19 $\mu\text{g/ml}$, nos tempos 0h, 6h, 12h 24h após a lesão. Com significância de $*P < 0,05$ vs. controle, representados sobre as barras de erro dos grupos. Esses resultados são representativos de três experimentos independentes e são apresentados como média \pm desvio padrão.

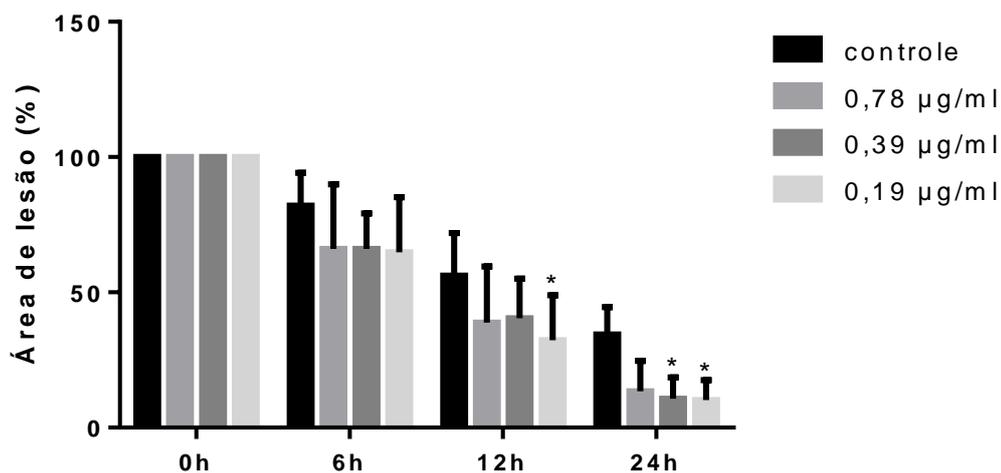


Figura 16: Microfotografias das áreas da lesão em monocamadas de células L929. Do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do caule nas concentrações de 0,78 $\mu\text{g/ml}$, 0,39 $\mu\text{g/ml}$, 0,19 $\mu\text{g/ml}$, nos tempos 0h, 6h, 12h 24h após a lesão. Barra de escala = 500 μm .

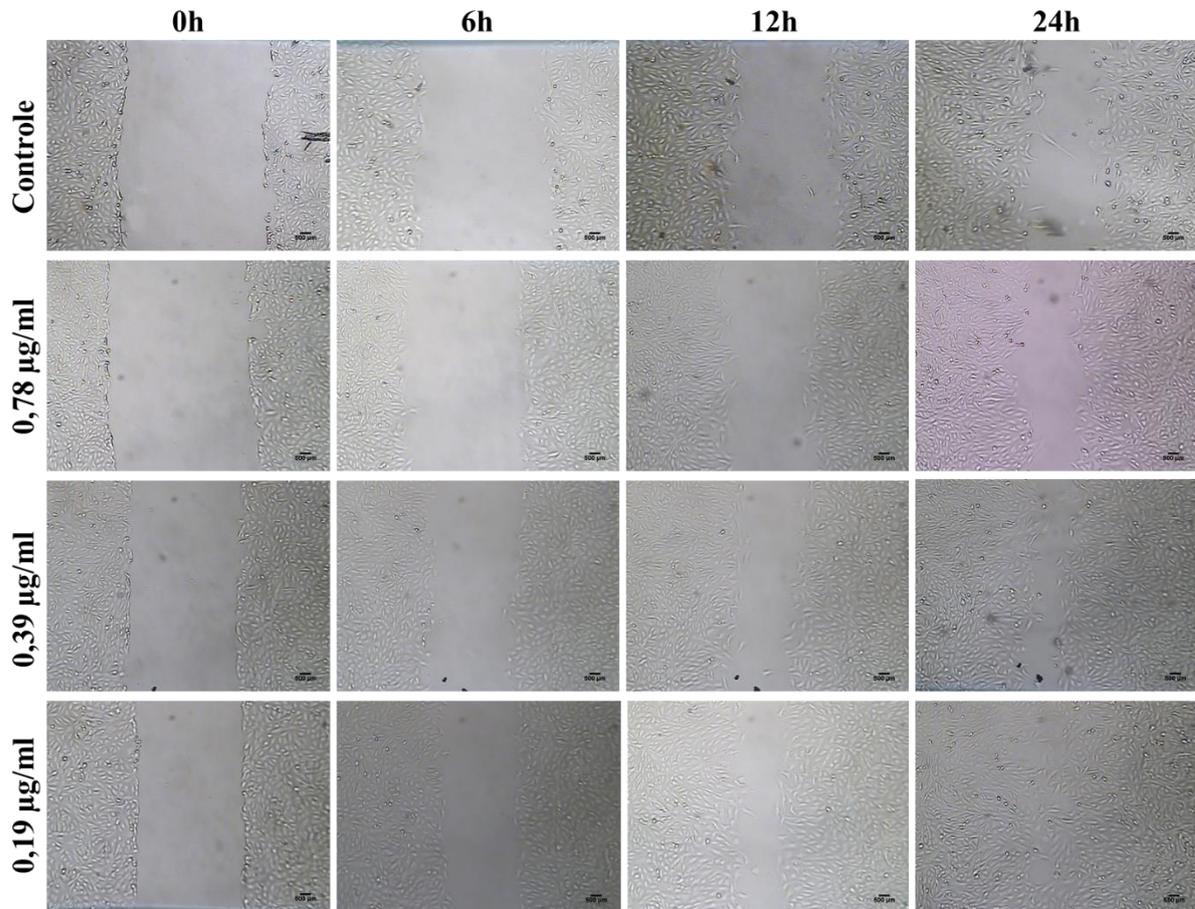


Figura 17: Área da lesão em monocamadas de células L929, do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do pecíolo nas concentrações de 0,78 $\mu\text{g/ml}$, 0,39 $\mu\text{g/ml}$, 0,19 $\mu\text{g/ml}$, nos tempos 0h, 6h, 12h 24h após a lesão. Com significância de $*P < 0,05$ vs. controle, representados sobre as barras de erro dos grupos. Esses resultados são representativos de três experimentos independentes e são apresentados como média \pm desvio padrão.

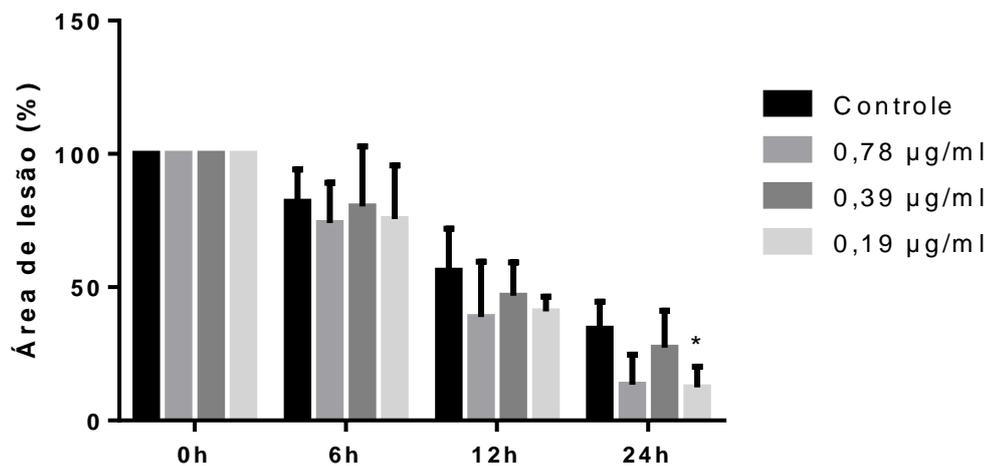


Figura 18: Microfotografias das áreas da lesão em monocamadas de células L929. Do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do pecíolo nas concentrações de 0,78 $\mu\text{g/ml}$, 0,39 $\mu\text{g/ml}$, 0,19 $\mu\text{g/ml}$, nos tempos 0h, 6h, 12h 24h após a lesão. Barra de escala = 500 μm .

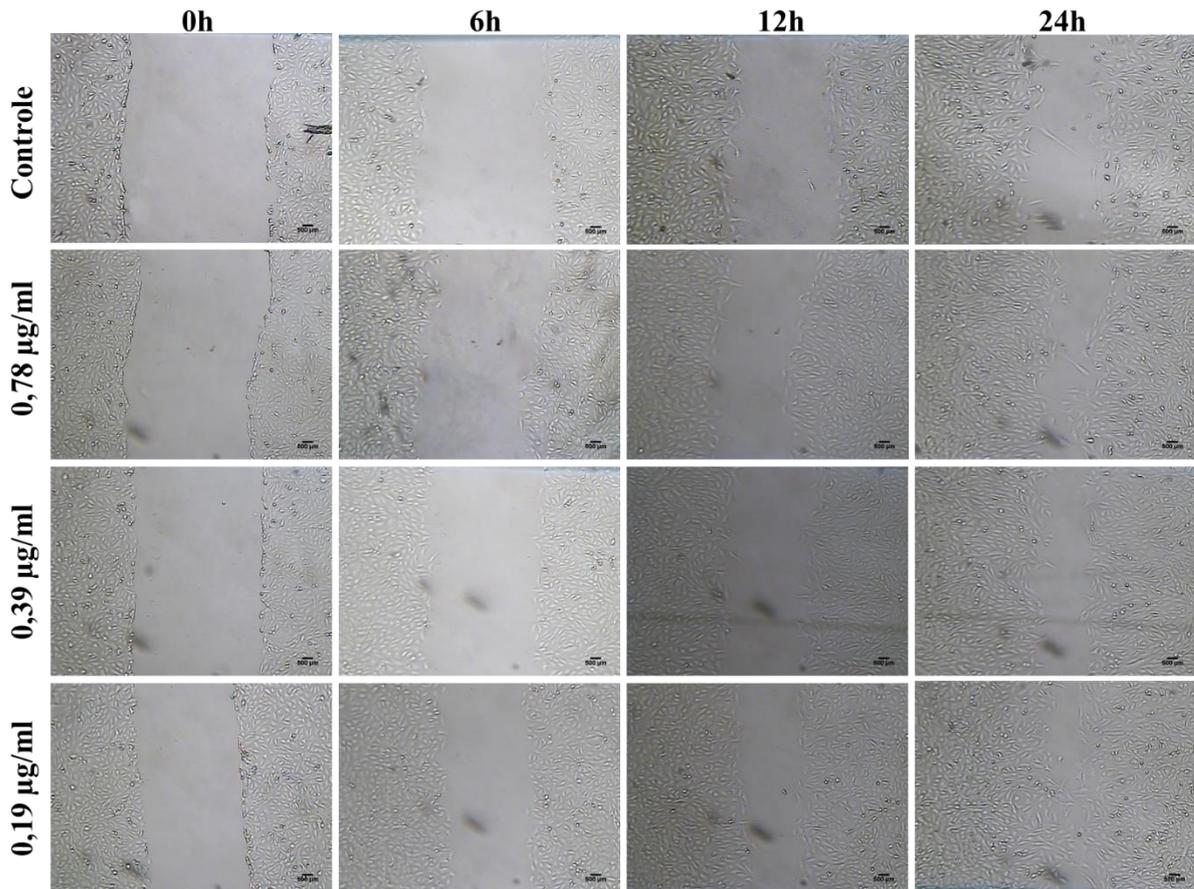


Figura 19: Área da lesão em monocamadas de células L929, do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato das folhas nas concentrações de 0,78 $\mu\text{g/ml}$, 0,39 $\mu\text{g/ml}$, 0,19 $\mu\text{g/ml}$, nos tempos 0h, 6h, 12h 24h após a lesão. Com significância de $*P < 0,05$ vs. controle, representados sobre as barras de erro dos grupos. Esses resultados são representativos de três experimentos independentes e são apresentados como média \pm desvio padrão.

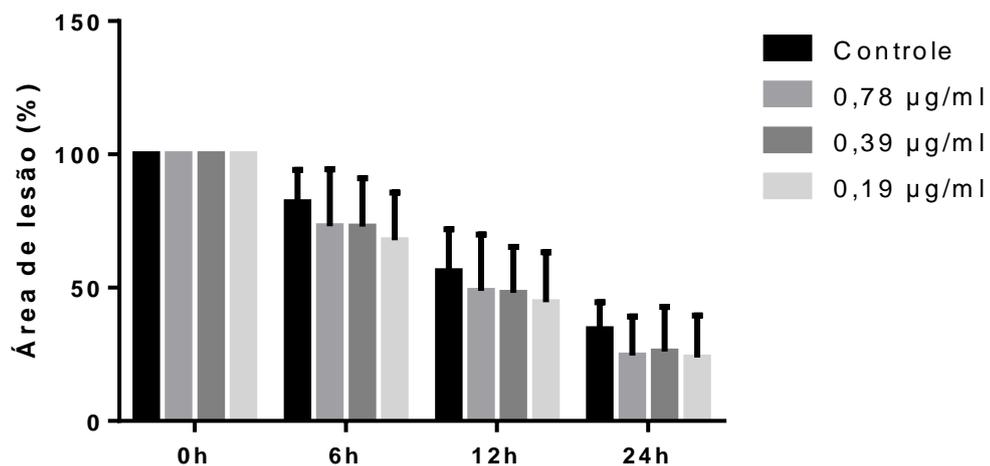
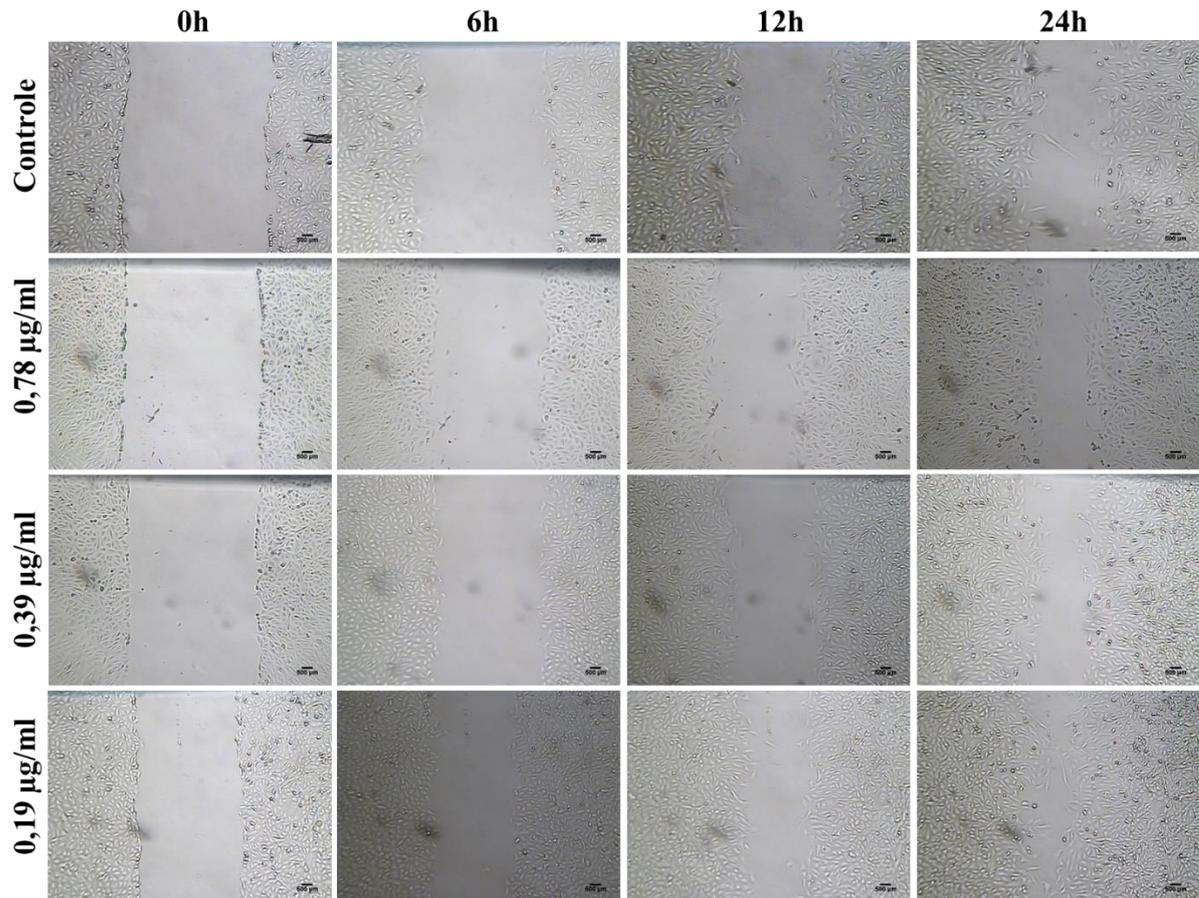


Figura 20: Microfotografias das áreas da lesão em monocamadas de células L929. Do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do pecíolo nas concentrações de 0,78 $\mu\text{g/ml}$, 0,39 $\mu\text{g/ml}$, 0,19 $\mu\text{g/ml}$, nos tempos 0h, 6h, 12h 24h após a lesão. Barra de escala = 500 μm .



4.4. MORFOLOGIA E ÁREA DE LESÃO

A partir da coloração de H&E realizada nas células que sofreram lesão em sua monocamada, no tempo 0 e 24 horas após a lesão, foi possível demonstrar que não houve mudança morfológicas em nenhum grupo, devido ao estresse causado com o risco na monocamada celular e tratamento das células com o extrato, também é pode-se observar com nitidez a diminuição da área de lesão no tempo de 24 horas. Então, nos grupos tratados com extrato do caule foi demonstrado uma diminuição significativa da área de lesão nas concentrações 0,39 $\mu\text{g/ml}$, 0,19 $\mu\text{g/ml}$, no tempo de 24horas, em relação ao grupo controle do mesmo tempo (Figura 21). Já nos grupos tratados com extrato do pecíolo foi demonstrado uma diminuição significativa da área de lesão na concentração de 0,19 $\mu\text{g/ml}$, no tempo de 24horas, em relação ao grupo controle do mesmo tempo (Figura 22). Os grupos tratados com extrato da

folha não houve diminuição significativa em relação ao grupo controle, no tempo de 24 horas (Figura 23).

Figura 21: Microfotografias das áreas da lesão em monocamadas de células L929 coradas com H&E dos grupos do extrato do caule. A) grupo 0h após a lesão; B) grupo controle 24h após a lesão; C) grupo 24horas após a lesão e tratamento com extrato de caule na concentração de 0,78 $\mu\text{g/ml}$; D) grupo 24horas após a lesão e tratamento com extrato de caule na concentração de 0,39 $\mu\text{g/ml}$; E) grupo 24horas após a lesão e tratamento com extrato de caule na concentração de 0,19 $\mu\text{g/ml}$. Barra de escala = 500 μm .

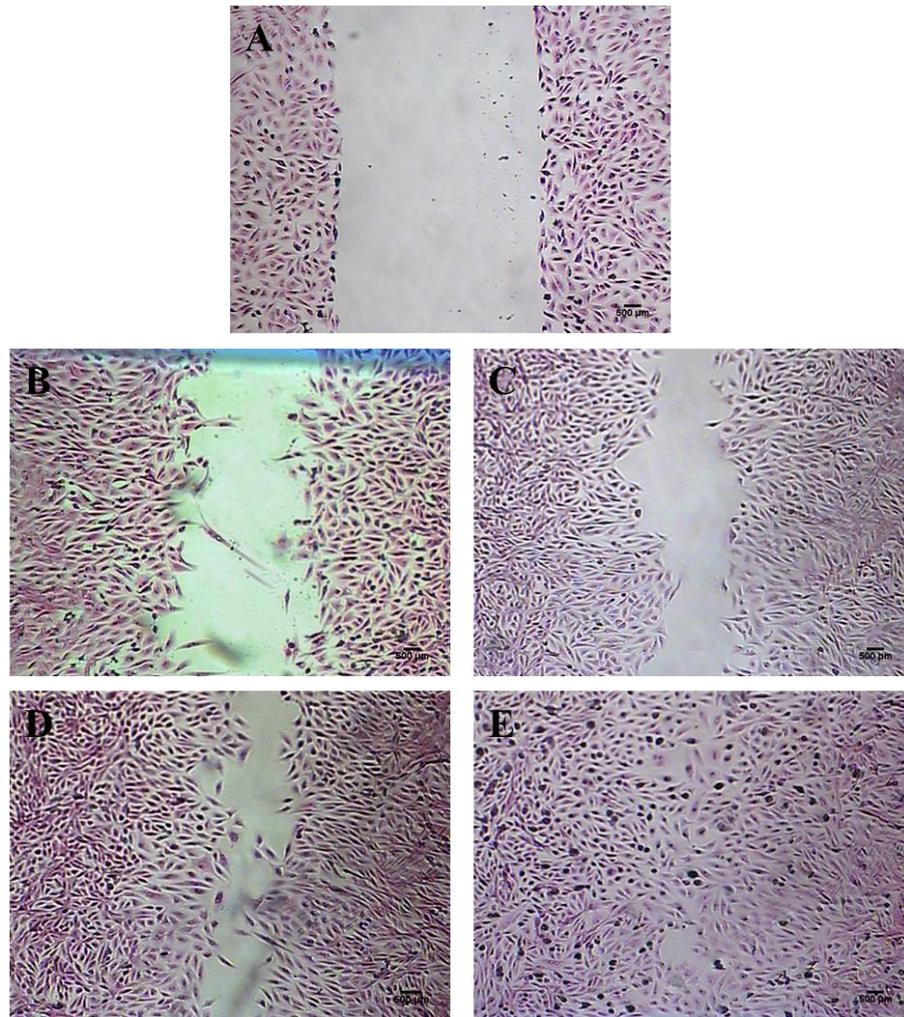


Figura 22: Microfotografias das áreas da lesão em monocamadas de células L929 coradas com H&E dos grupos do extrato do pecíolo. A) grupo 0h após a lesão; B) grupo controle 24h após a lesão; C) grupo 24horas após a lesão e tratamento com extrato do pecíolo na concentração de 0,78 $\mu\text{g/ml}$; D) grupo 24horas após a lesão e tratamento com extrato do pecíolo na concentração de 0,39 $\mu\text{g/ml}$; E) grupo 24horas após a lesão e tratamento com extrato do pecíolo na concentração de 0,19 $\mu\text{g/ml}$. Barra de escala = 500 μm .

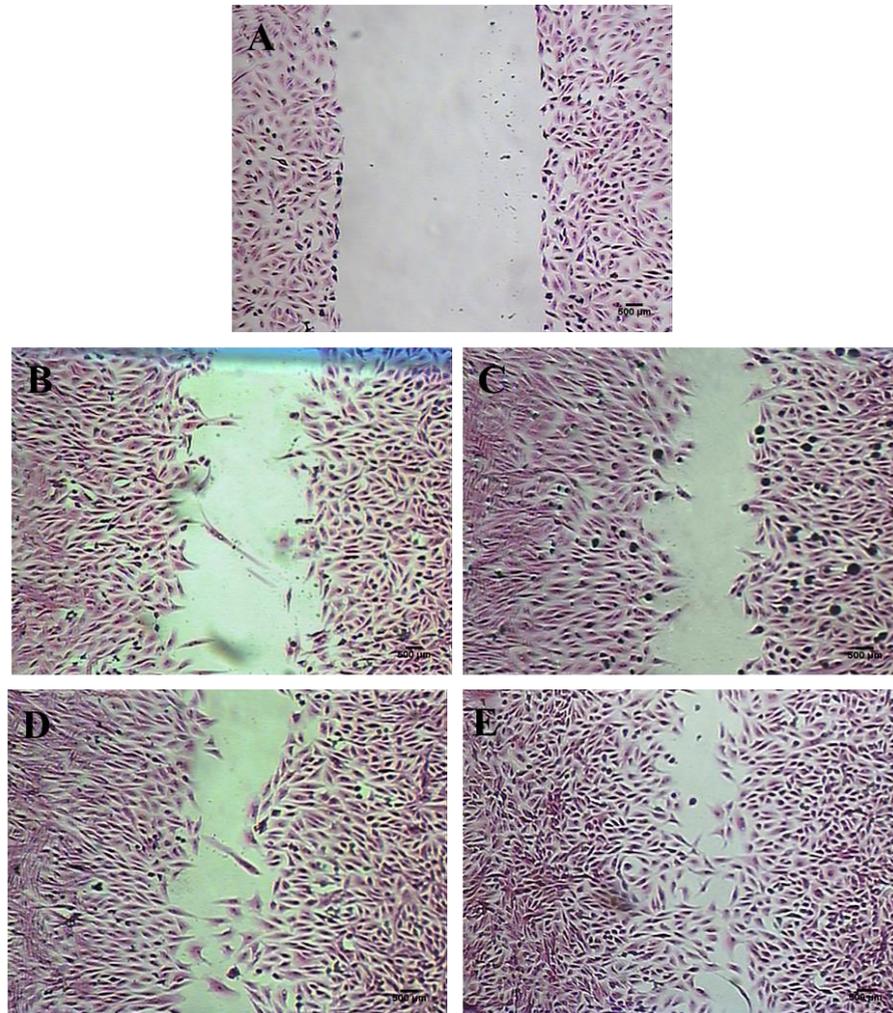
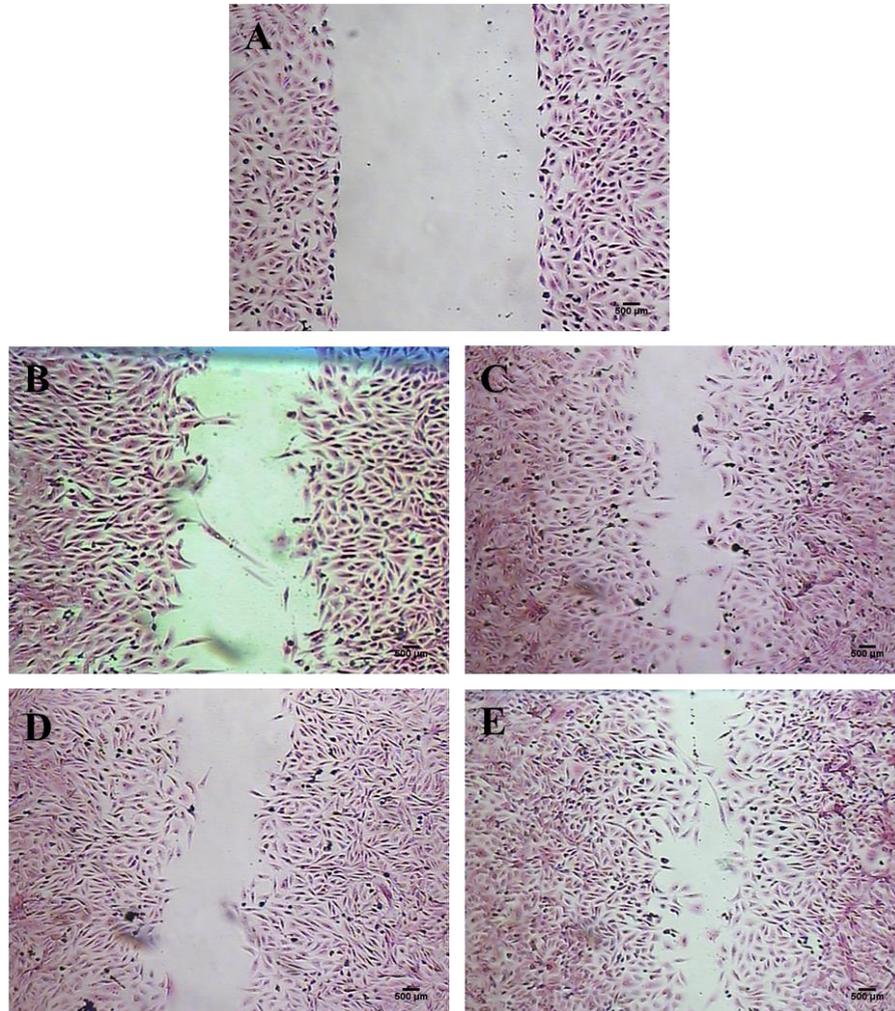


Figura 23: Microfotografias das áreas da lesão em monocamadas de células L929 coradas com H&E dos grupos do extrato da folha. A) grupo 0h após a lesão; B) grupo controle 24h após a lesão; C) grupo 24horas após a lesão e tratamento com extrato da folha na concentração de 0,78 µg/ml; D) grupo 24horas após a lesão e tratamento com extrato da folha na concentração de 0,39 µg/ml; E) grupo 24horas após a lesão e tratamento com extrato da folha na concentração de 0,19 µg/ml. Barra de escala = 500 µm.



4.5. PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA PELOS EXTRATOS DA *M. linifera*

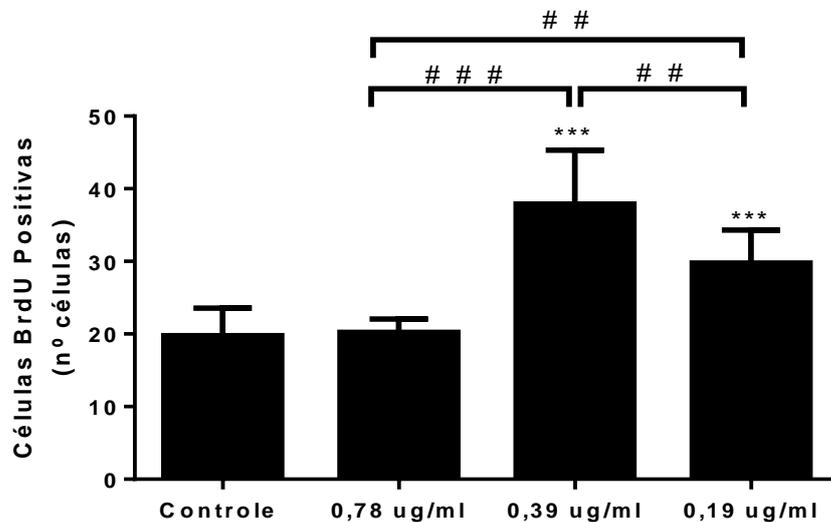
Foi verificado se os extratos do caule, pecíolo e caule da *M. linifera* induzem maior proliferação celular em relação ao grupo não tratado, através da imunomarcagem para BrdU. O grupo controle demonstrou uma média de $19,778 \pm 3,80$ células positivas para BrdU, enquanto os grupos tratados com o extrato do caule nas concentrações de 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml demonstraram $20,222 \pm 1,855$, $37,889 \pm 7,407$, $29,778 \pm 4,521$ células positivas para BrdU, respectivamente. Assim havendo diferença significativa dos grupos tratados com extrato do caule nas concentrações de 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml em relação ao grupo controle, e diferença significativa entre os três grupos tratados com esse extrato (Figura 24).

Já os grupos tratados com o extrato do pecíolo nas concentrações de 0,78 $\mu\text{g/ml}$, 0,39 $\mu\text{g/ml}$, 0,19 $\mu\text{g/ml}$ demonstraram uma média de $20,222 \pm 2,587$, $20,444 \pm 5,077$, $24,889 \pm 3,551$ células positivas para BrdU, respectivamente. Houve diferença significativa do grupo tratado com extrato do pecíolo na concentração de 0,19 $\mu\text{g/ml}$ em relação ao grupo controle (Figura 25).

Os grupos tratados com o extrato da folha nas concentrações de 0,78 $\mu\text{g/ml}$, 0,39 $\mu\text{g/ml}$, 0,19 $\mu\text{g/ml}$ demonstraram uma média de $20,556 \pm 3,504$, $23,778 \pm 5,974$, $22,889 \pm 3,1798$ células positivas para BrdU, respectivamente. Não havendo diferença significativa entre os grupos (Figura 26).

Figura 24: Células BrdU positivas do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do caule nas concentrações de 0,78 $\mu\text{g/ml}$, 0,39 $\mu\text{g/ml}$, 0,19 $\mu\text{g/ml}$. A) Análise quantitativa, com significância de $***P < 0,001$ vs. controle, $**P < 0,01$ vs. 0,39 $\mu\text{g/ml}$ e 0,78 $\mu\text{g/ml}$, $###P < 0,001$ vs. 0,78 $\mu\text{g/ml}$ representados sobre as barras de erro dos grupos. Esses resultados são representativos de três experimentos independentes e são apresentados como média \pm desvio padrão. B) Microfotografias da imunofluorescência para BrdU, barra de escala = 50 μm .

A



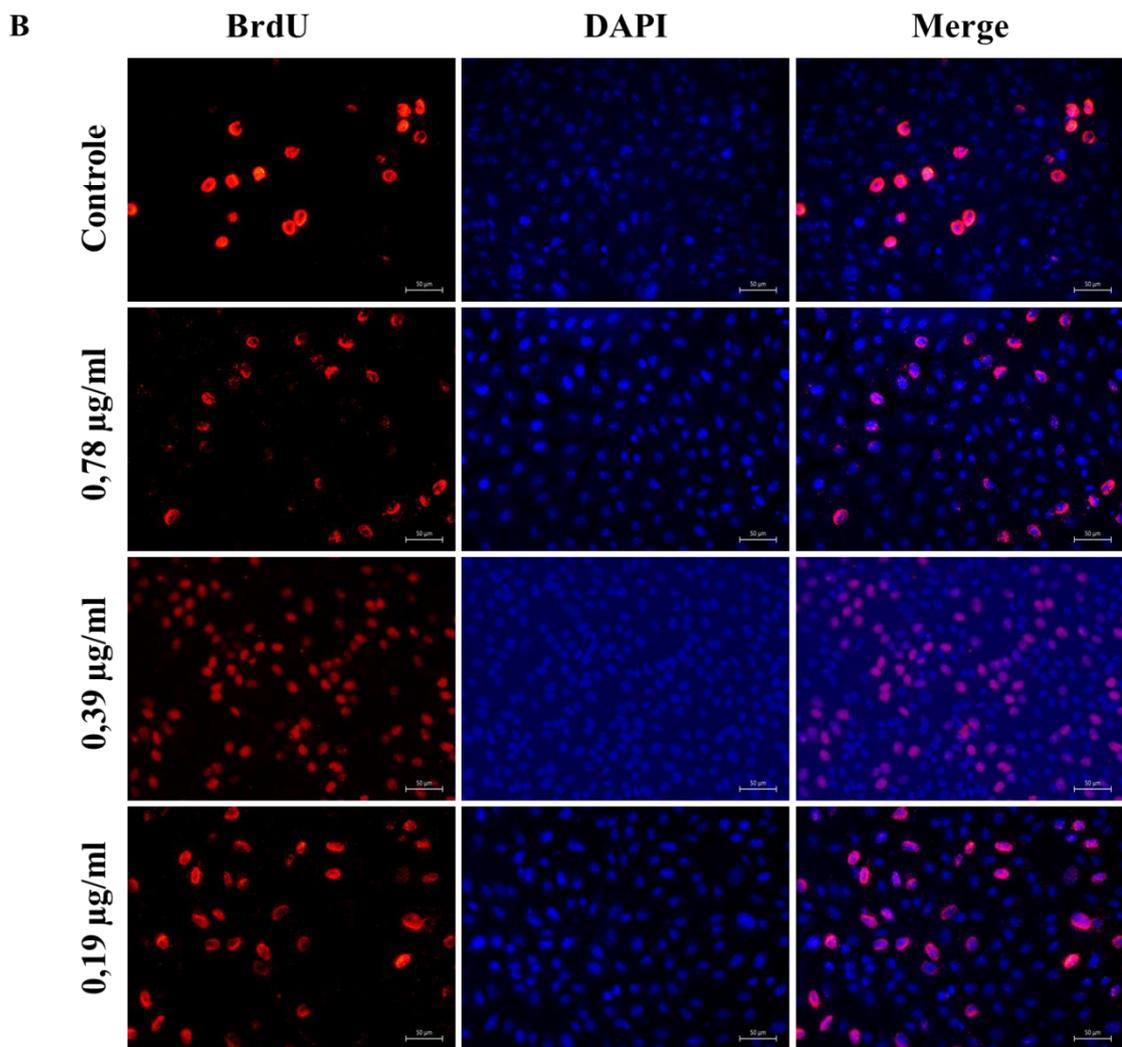
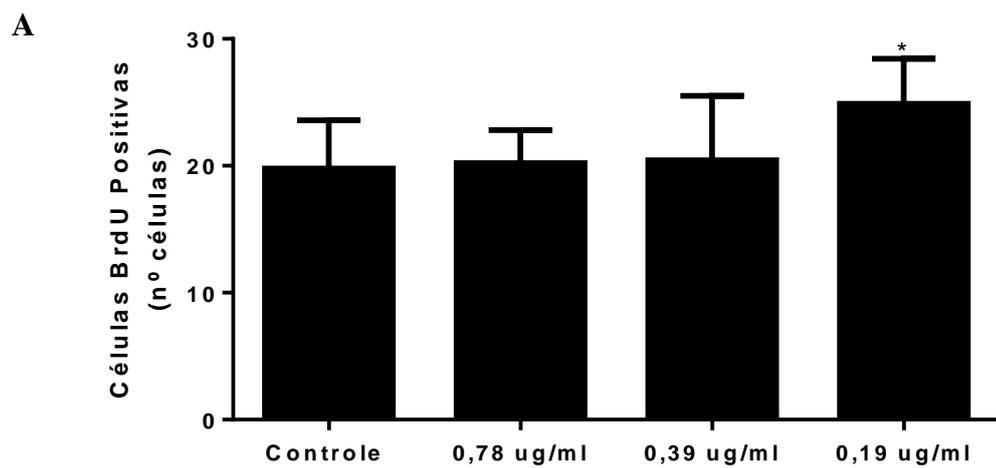


Figura 25: Células BrdU positivas do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato do pecíolo nas concentrações de 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml. A) Análise quantitativa, com significância de *P < 0,05 vs. controle, representados sobre as barras de erro dos grupos. Esses resultados são representativos de três experimentos independentes e são apresentados como média ± desvio padrão. B) Microfotografias da imunofluorescência para BrdU, barra de escala = 50 µm.



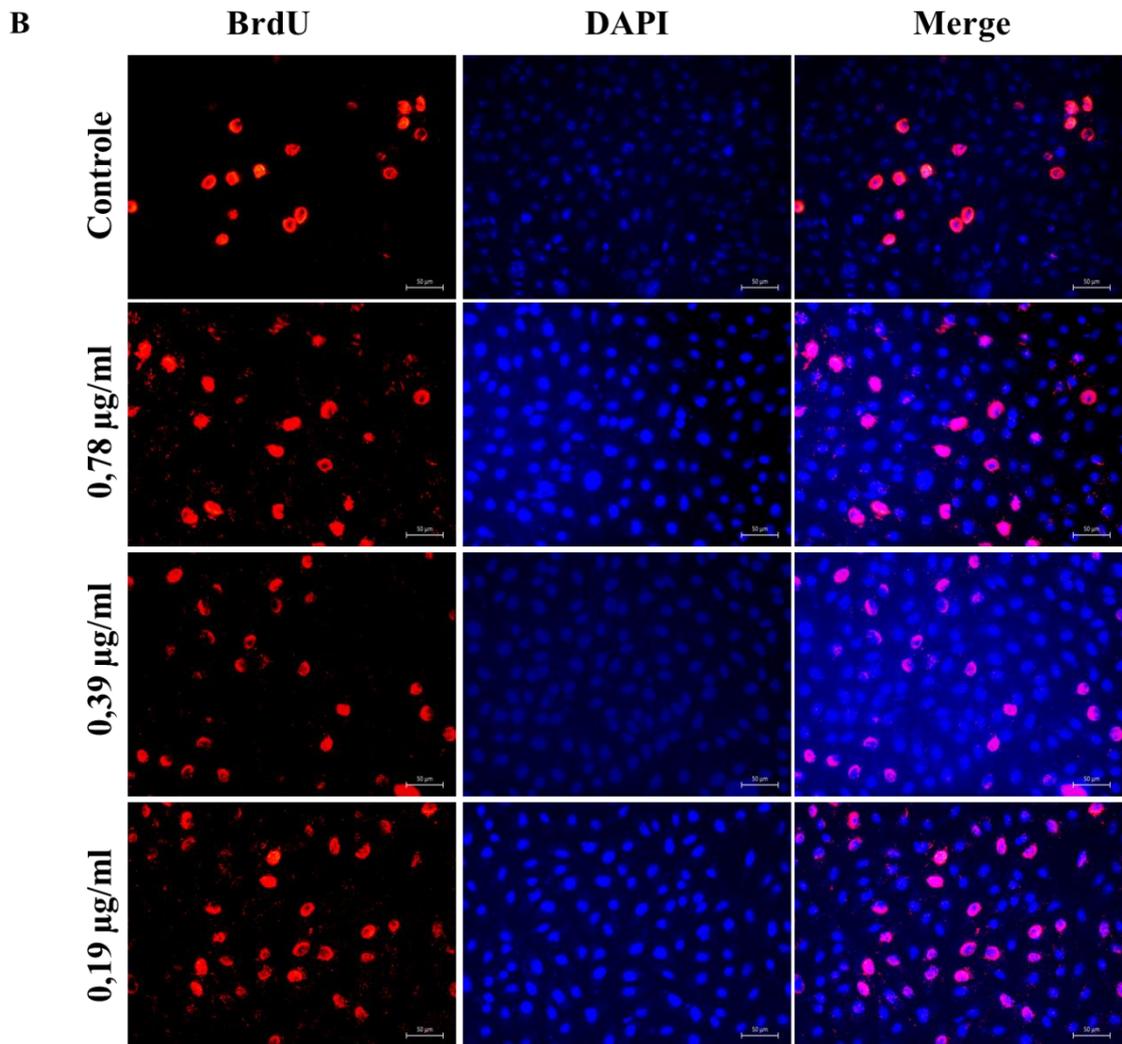
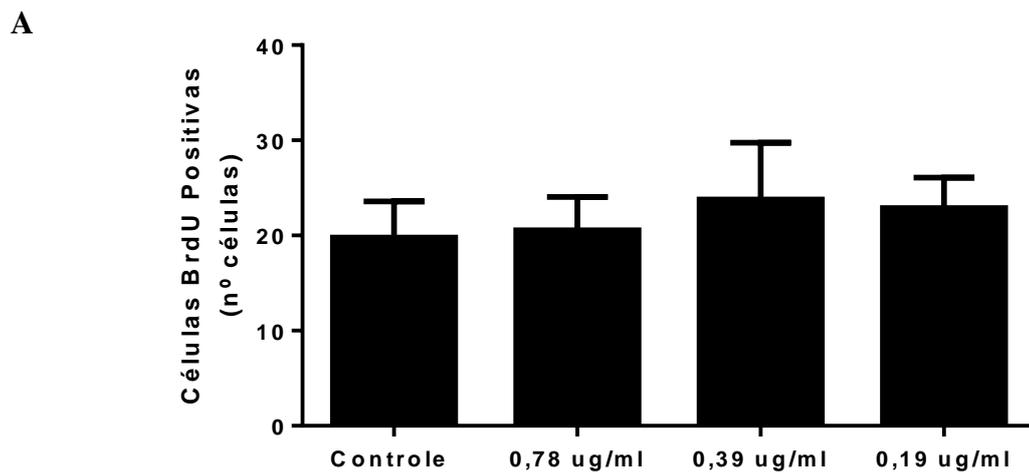
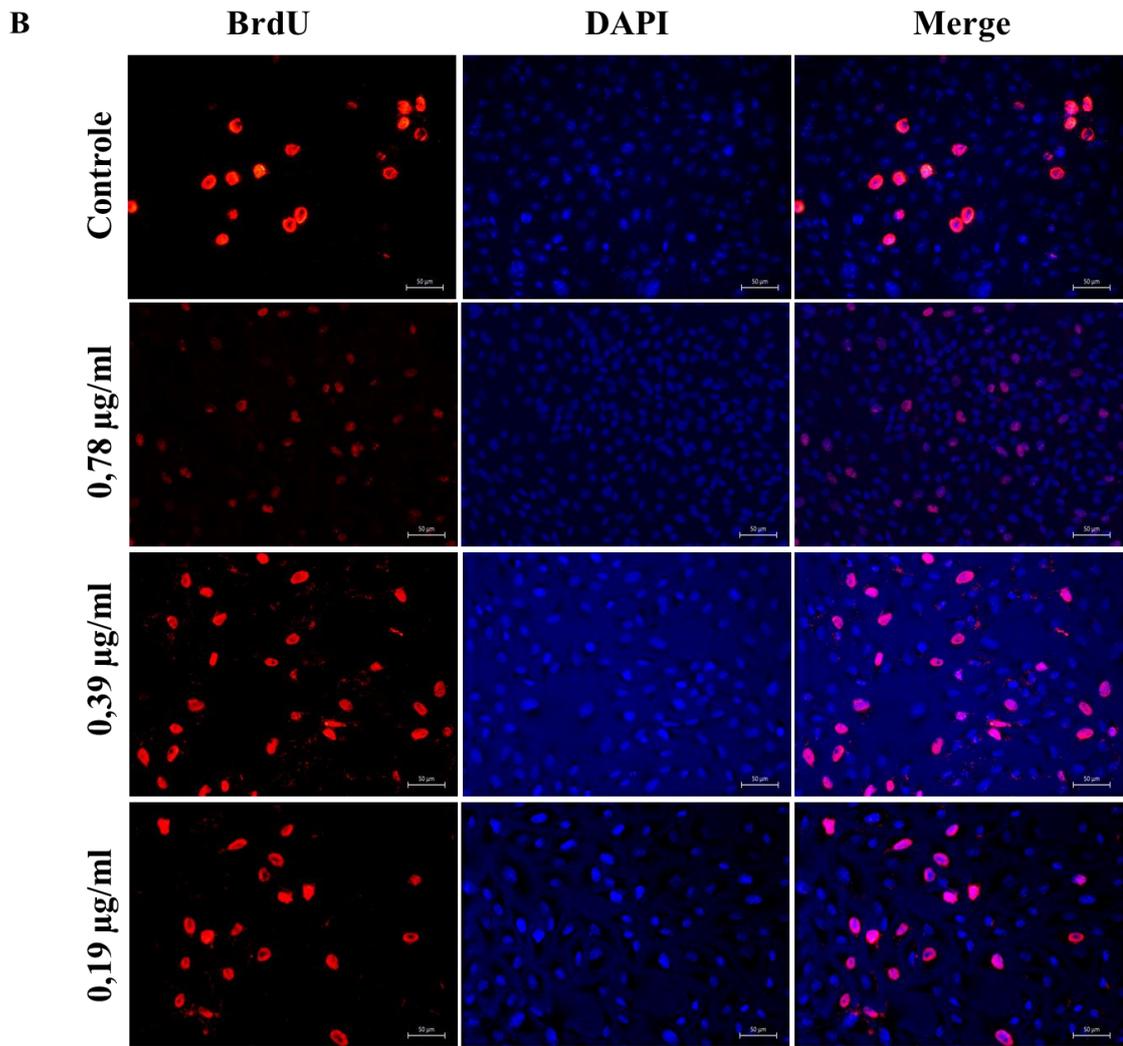


Figura 26: Células positivas para BrdU do grupo controle e dos grupos tratados com o extrato da folha nas concentrações de 0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml. A) Análise quantitativa, com significância de *P < 0,05 vs. controle, representados sobre as barras de erro dos grupos. Esses resultados são representativos de três experimentos independentes e são apresentados como média ± desvio padrão. B) Microfotografias da imunofluorescência para BrdU, barra de escala = 50 µm.





5. DISCUSSÃO

A busca por novos tratamentos para lesões crônicas a partir de espécies vegetais é de grande importância, devido as mesmas possuírem vários compostos bioativos (CRAGG, NEWMAN, 2001; CRAGG, NEWMAN, 2016) e grande parte dessas plantas demonstram atividades farmacológicas que ainda não foram elucidadas pela comunidade científica (SKIRY CZ et al., 2016). A atividade farmacológica da *M. linifera* é pouco descrito na literatura, então nosso grupo de pesquisa iniciou a investigação dessa planta, para verificar se realmente a mesma possui ação na cascata de cicatrização.

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram que os extratos etanólicos das folhas, pecíolos e caules da *M. linifera* possuem substâncias da classe dos terpenos (Quadro 2 e Figura 11A). Os terpenos são uma das maiores classes de compostos orgânicos de origem natural registrada (GERSHENZON, DUDAREVA, 2007), já se sabe que substâncias classificadas como terpenos possuem atividade anti-inflamatória, neuroprotetora, antioxidante, antitumoral (CHO et al., 2017, LU et al., 2019; ISLAM et al., 2019), cicatrizantes (D'ALESSIO et al., 2014), antidiarreica (NEGREIROS et al., 2019), antibacterianas, antifúngicas (ZACCHINO A et al., 2017), anti-hiperlipidêmica, antinoceptiva, analgésica, ansiolítica, antidepressiva (PEREIRA et al., 2018, HARADA et al., 2018). Dessa forma, possivelmente os extratos *M.linifera* testados nesse trabalho possuem atividade biológica devido aos terpenos presentes neles.

Segundo Quadro 2 e Figura 11B e 11C, os resultados demonstram que o extrato das folhas da *M.linifera* possui flavonóides e fenóis . Os flavonóides possuem diversas propriedades biológicas como: anti-inflamatória (PEI et al., 2020), anticancerígeno (ADEWOLE, 2020), antioxidante, anti-hipertensivo (KURMA, PANDEY, 2013). Já os fenóis possuem atividade antibacteriana (PINHEIRO et al., 2017), antioxidante (HOSSAIN et al., 2019), entre outras. Além disso, os extratos da folha e caule apresentaram atividade antioxidante (Quadro 2 e Figura 11D), o que corrobora para com os resultados da análise fitoquímica, pois as três classes identificadas (terpeno, flavonoides e fenóis), geralmente possuem atividade antioxidante (GONZÁLEZ-BURGOS, GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012; BUBOLS et al., 2013; DAI, MUMPER, 2010). Mas como apenas os terpenos foram identificados nos três extratos (caule, pecíolo e folha), possivelmente a atividade antioxidante se deve devido a presença de substâncias pertencentes a classe dos terpenos.

Espécies reativas de oxigênio (ERO) em níveis baixos possuem papel importante na cicatrização de lesões agudas, pois ajudam a combater processos infecciosos, participam na

estimulação da angiogênese e proliferação de queratinócitos (DUNNILL et al., 2015). Porém, as lesões crônicas possuem altos níveis de espécies reativas de oxigênio, causando um estresse oxidativo excessivos, o que contribui para que o processo inflamatório seja duradouro e a lesão não consiga passar para a próxima fase da cascata de cicatrização (SCHÄFER, WERNER, 2008; LYONS et al., 2019). Estudo utilizando feridas crônicas em camundongos diabéticos demonstrou que altos níveis de estresse oxidativo nas lesões dificulta o processo de cicatrização e propicia um ambiente para infecções (KIM et al., 2019b). Então, substâncias com atividade antioxidante são importantes para combater o estresse oxidativo elevado nas feridas crônicas, assim acelerar o processo de cicatrização, devido a diminuição de espécies reativas de oxigênio e por consequência os danos celulares causados pelas mesmas (KIM et al., 2019a; YADAV et al., 2018).

A Organização Internacional de Padronização (ISO) preconiza que em extratos ou dispositivos médicos sejam realizados testes de triagem, para averiguar a eficiência e qualidade dos mesmos, entre os testes recomendados está o de citotoxicidade, através do ensaio de MTT (ISSO 10993-5, 2009). Além da ISO, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD) também recomenda que se realize em novas drogas teste para verificar a citotoxicidade e selecionar as melhores doses ou concentrações para utilizar nas próximas etapas da pesquisa (OECD, 2010).

Qualquer substância ou material utilizado para fins terapêuticos devem exercer seu papel no tratamento do paciente, sem causar efeito negativo local ou sistêmico na pessoa tratada, logo para pessoas em tratamento de lesões crônicas, um dos pré-requisitos para isso, é que a droga utilizada não deve ser tóxica na dose ou concentração e intervalos de tempo administrados (ANVISA, 2013)

Então seguindo os padrões internacionais foi verificado a citotoxicidade dos extratos do caule, pecíolo e folha da *M. linifera* e nenhuma das concentrações nos tempos testados foram citotóxicos (todos os grupos com viabilidade acima de 80%), sendo que as menores concentrações dos extratos nos tempos de 24h, 48h e 72h demonstraram aumento significativo na viabilidade em relação ao controle, com exceção do extrato do pecíolo nos tempos de 24h e 72h (Figura 12, 13 e 14). Esse aumento possivelmente ocorreu devido os extratos em pequenas concentrações pode estar induzindo a proliferação celular mais acelerada em relação ao grupo sem tratamento, aumentando assim consideravelmente a quantidade de células nos grupos em questão e consequentemente aumentando o metabolismo celular detectado no ensaio de MTT.

Realizado o ensaio de migração celular, para verificar o potencial cicatrizante dos extratos de interesse desse trabalho, utilizando as concentrações escolhidas a partir do teste de

citotoxicidade (0,78 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml), foi demonstrado em nossos resultados que os grupos do extrato do caule nas concentrações 0,39 µg/ml no tempo de 24h e 0,19 µg/ml nos tempos de 12h e 24h, e o grupo do extrato do pecíolo na concentração de 0,19 µg/ml no tempo de 24 horas obtiveram uma diminuição da área de lesão *in vitro* em relação ao grupo controle respectivo a cada tempo (Figura 15, 16, 17 e 18). Assim o extrato do pecíolo na concentração de 0,19 µg/ml e caule nas concentrações 0,39 µg/ml e 0,19 µg/ml possuem potencial cicatrizante, pois promovem maior migração de fibroblastos, assim fechando a lesão. Os grupos tratados com o extrato da folha não demonstraram diferença significativa (Figura 19 e 20).

A migração celular é um evento de grande importância no processo de cicatrização tecidual, ocorre principalmente na fase de proliferação, juntamente com outros eventos, como a proliferação celular (GRADA et al., 2017). O ensaio de migração *in vitro* ou *scratch* é amplamente utilizado para verificar o potencial cicatrizante de inúmeras substâncias, moléculas ou métodos biomédicos (D'AGOSTINO et al., 2020; HUMMITZSCH et al., 2020; PINTO et al., 2018), devido esse ensaio ser de baixo custo, mantém interações célula-célula e célula-MEC, além de se verificar se é viável testar *in vivo* a droga de interesse (JONKMAN et al., 2014; LIANG et al., 2007).

A migração de células para o fechamento da lesão é realizada geralmente em grupos de células, denominado migração por folha, e para que essa migração por folha ocorra é necessário que se tenha sinalização para interações célula-célula e célula-MEC; assim ativando fatores que estimulam a migração coordenada, como ativação de moléculas como caderina e integrinas (COLLINS, NELSON, 2015), logo os extratos do caule e pecíolo podem estar participando dessa sinalização, para que ocorra a migração mais eficiente.

Além disso, foi analisado a morfologia das células após 24h da lesão *in vitro*, e foi demonstrado que não houve mudança morfológica anormal nas células utilizadas devido ao estresse causado ao tratamento dos grupos com lesão depois de 24h (Figura 21,22 e 23). É descrito na literatura que células que sofrem estresse de diferentes tipos, modulam a expressão de proteínas do citoesqueleto e as interações célula-célula e célula-MEC, assim sendo possível observar a mudança morfológica significativa celular devido o estresse, podendo assim prejudicar o fechamento da lesão (BOCCAFOSCHI et al., 2009).

Outro evento crucial para o reparo tecidual é o processo de proliferação celular, nossos resultados demonstram, através da imunomarcagem para BrdU, que o extrato do caule promoveu maior proliferação celular significativa nas concentrações de 0,39 µg/ml, 0,19 µg/ml e o extrato do pecíolo promoveu maior proliferação celular na concentração de 0,19 µg/ml (Figura 24 e 25). Esses dados corroboram com os resultados anteriores, mostram que os extratos do caule e

pecíolo, nas menores concentrações testadas, além de não ser citotóxico, promover a migração celular e não causar estresse demasiado nas células, também promove a proliferação dos fibroblastos. Assim, podendo promover o fechamento da lesão de forma mais rápida e eficiente tanto de lesões pequenas, quanto de lesões grandes que se faz necessário a ocorrência da migração e proliferação, para restabelecimento da MEC, logo que um dos principais mecanismos de cicatrização em humanos é a reepitelização (SORG et al., 2017).

O BrdU é um análogo da Timina e é incorporado pelo DNA de células replicantes, que entraram na fase S do ciclo celular, enquanto o BrdU estava no meio de cultura, que estava em contato direto com as mesmas. Assim, posteriormente foi possível marcar essas células replicadas com o anticorpo específico para BrdU (CRANE, BHATTACHARYA, 2013). Portanto, provavelmente os extratos do caule e pecíolo alteram o ciclo celular, por isso há o aumento a proliferação das células tratadas com esses extratos.

A proliferação celular no processo de reparo tecidual é essencial para reepitelização e a formação da MEC que foi perdida com a lesão, dessa forma o tecido lesionado é restabelecido (GURTNER et al., 2008). LOUGHLIN, ARTLETT, 2011 demonstraram que feridas crônicas de diabéticos, possuem o processo de reepitelização prejudicado, devido a regulação negativa de ERK1/2, AKT pela via p38 MAPK, assim causando deficiências na proliferação e migração celular, dificultando o fechamento da lesão. Então, é importante se realizar o tratamento dessas lesões com substâncias que atuem estimulando de forma positiva o ciclo celular.

Na literatura existem estudos que comprovam que alguns terpenos possuem atividade cicatrizante e promovem a migração celular, proliferação e restabelecimento da integridade parcial ou total do tecido que foi lesionado (SCHERERA et al., 2019; KESKIN et al., 2017; PASDARANA, HAMED, 2017), esses dados corroboram com nossos resultados, pois foi identificado terpenos nos extratos do caule, pecíolo e folha da *M.linifera*. Os extratos do caule e pecíolo demonstraram resultados satisfatórios nas menores concentrações, aumento significativo da viabilidade, migração e proliferação celular, o que demonstra que possivelmente substâncias terpenóides presente nesses extratos podem estar influenciando de forma positiva o processo de cicatrização, porém esses extratos devem ser investigados com mais detalhes para se elucidar qual substância específica ou molécula dentro dessa classe que está presente neles possui atividade de reparo tecidual.

Os três extratos investigados nesse trabalho não apresentaram citotoxicidade, e os extratos da folha e caule demonstraram atividade antioxidante, porém apenas o extrato do caule e pecíolo demonstraram atividade cicatrizante *in vitro*. Sendo que no extrato da folha foi encontrado além de terpeno, também flavonóide e fenóis, os dois últimos não foram

encontrados no extrato do caule e pecíolo, possivelmente essas 3 substâncias podem ser antagonizando a ação cicatrizante do extrato da folha, mas deve ser realizado outras análises para confirmar que a folha da *M.linifera* não possui atividade de reparo tecidual. Logo, o extrato do caule e pecíolo da *M.linifera* são fortes candidatos para o tratamento de lesões na pele.

6. CONCLUSÃO

A *M. linifera* possui poucos estudos farmacológicos e não possui nenhuma comprovação ou evidência anterior a este trabalho que descreve cientificamente a ação dessa espécie no processo de cicatrização da pele. Este trabalho é pioneiro a demonstrar a atividade cicatrizante *in vitro* dos extratos da *M.linifera*.

Os extratos etanólicos do caule e folha possuem atividade antioxidante. E os extratos do caule, pecíolo e folha são compostos por terpenos que possivelmente são responsáveis pela atividade biológica dos mesmos. No extrato da folha também foram encontrados flavonoides e fenóis.

Então os extratos etanólicos do caule, pecíolo e folha da *M. linifera* não demonstraram citotoxicidade quando colocados em contato por 24h, 48h e 72h com a linhagem de células L929, e apresentando maior viabilidade celular quando as células foram expostas as menores concentrações testas dos extratos.

O extrato etanólico do caule nas concentrações 0,39 µg/ml e 0,19 µg/ml e do pecíolo na concentração 0,19 µg/ml induziram maior migração celular, assim promovendo o fechamento da lesão, favorecendo o processo de reparo tecidual. O extrato da folha não apresentou resultado significativo para a indução da migração celular.

Além disso, o extrato etanólico do caule nas concentrações 0,39 µg/ml e 0,19 µg/ml e do pecíolo na concentração 0,19 µg/ml também induziram uma maior proliferação dos fibroblastos, além de possivelmente estarem atuando no ciclo celular dos mesmos. O extrato da folha não apresentou resultado significativo para a indução da proliferação celular.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho inicial, o extrato etanólico do caule e pecíolo em concentrações pequenas possuem um potencial cicatrizante, podendo ser utilizado para o tratamento de lesões crônicas, porém é necessário que se realize mais testes para elucidar o mecanismo de ação dos extratos.

REFERÊNCIAS

- ADEWOLE K. E. Nigerian antimalarial plants and their anticancer potential: a review. **Journal of Integrative Medicine**, 2020.
- AMARANTE C. B., AGUIAR-DIAS A. C. A., SANTOS A. C. F, NEVES P.A.F.G, BATISTA R.J.R., LINS A. L. F. A. Flavonoides Em *Montrichardia Linifera* (Arruda) Schott (Araceae): Doseamento E Localização In Situ. **Rev. Bras. Farm.**, v. 96, n.1, p.1055 – 1069, 2015.
- AMARANTE C. B., FERNANDES A. R., VASCONCELOS J. M., MELO N. C., OLIVEIRA P. D., LINS A. L. F. A., BATISTA R. J. R., JUNIOR L.S. R.; GONÇALVES F. A. C., BOTERO W. G.; AMARAL E. L. S., BOTELHO A. S. Bioaccumulation of metals in *Montrichardia linifera*: aquatic macrophyte of Amazon Region. **Revista Espacios**, v. 38, n. 53, p. 4, 2017.
- AMARANTE C. B., MOURA P. H. B., UNO W. S., PRADO A. F. Toxicity In *Artemia Salina* Of Fractions Derived From Dichloromethane Extract Obtained From Leaves Of *Montrichardia Linifera* (Arruda) Schott, Araceae. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7, n.12; 2011a.
- AMARANTE C. B., MÜLLER A. H., PÓVOA M.M., DOLABELA M.F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n.3, p. 431 – 434, 2011b.
- AMARANTE C. B., MÜLLER R. C. S., DANTAS K. G. F., ALVES C.N., MÜLLER A.H., PALHETA D.C. Composição química e valor nutricional para grandes herbívoros das folhas e frutos de aninga (*Montrichardia linifera*, Araceae). **Acta Amazonica**, v. 40, n.4, p. 729-736, 2010.
- AMARANTE C. B., SILVA J. C. F., SOLANO F. A. R., NASCIMENTO L. D., MORAES L. G., SILVA G. F., UNO W. S. Estudo Espectrométrico Das Folhas Da Aninga (*Montrichardia linifera*) Coletadas à Margem do Rio Guamá no Campus da UFPA, Belém-PA. Uma Contribuição ao Estudo Químico da Família Araceae. **Revista Científica da UFPA**, v. 7, n. 01, 2009.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. **Brasília**, versão 2, 2013.
- ARDA O., GÖKSÜGÜR N., TÜZÜN Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clinics in Dermatology**, v.32, n.1, p.3–13, 2014.
- BALLESTEROS-CILLERO R., DAVISON-KOTLER E., KOHLI N., MARSHALL W. S., GARCÍA-GARETA E. Biomimetic In Vitro Model Of Cell Infiltration Into Skin Scaffolds For Pre-Screening And Testing Of Biomaterial-Based Therapies. **Cells**, v. 8, n..8, P. 917, 2019.
- BELKAID Y., SEGRE J.A. Dialogue between skin microbiota and immunity. **Science**, v. 346, n. 6212, p. 954-959, 2014.

BERETTA-PICCOLI B. T.; INVERNIZZI P.; GERSHWIN³ M.E., MAINETTI C. Skin Manifestations Associated with Autoimmune Liver Diseases: a Systematic Review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v.53, n.3, p. 394–412, 2017.

BICKERS D. R., LIM H. W., MARGOLIS D., WEINSTOCK M. A., GOODMAN C., FAULKNER E., GOULD C., GEMMEN E., DALL T. The burden of skin diseases: 2004. A joint project of the American Academy of Dermatology Association and the Society for Investigative Dermatology. **Journal American Academy of Dermatology**, v. 55, n.3, p. 490-500, 2006.

BLANPAIN C., FUCHS, E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.10, n.3, p.207–217, 2009.

BOCCAFOSCHI F., BOSETTI M., SANDRA P. M., LEIGHEB M., CANNAS M. Effects of mechanical stress on cell adhesion. A possible mechanism for morphological changes. **Cell Adhesion & Migration**, n. 4, v.1, 19-25, 2009.

BORGES BUBOLS G., DA ROCHA VIANNA D., MEDINA-REMON A., VON POSER G., LAMUELA-RAVENTOS M. R., EIFLER-LIMA L. V., GARCIA C. S. The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.13, n.3, p. 318–334, 2013.

CEFALU J. E., BARRIER K. M., DAVIS A. H. Wound Infections in Critical Care. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 29, n.1, p.81–96, 2016.

CHILDS D. R., MURTHY A. S. Overview of Wound Healing and Management. **Surgical Clinics of North America**, v. 97, p. 189–207, 2017.

CHO K.S., LIM Y., LEE K., LEE J., LEE J. H., LEE I. Terpenes from Forests and Human Health. **Toxicological Research**, v. 33, n. 2, p. 97-106, 2017.

COLLINS C., NELSON W. J. Running with Neighbors: Coordinating Cell Migration and Cell Cell Adhesion. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 36, p. 62-70, 2015.

COSTA E. S. S.,¹ DOLABELA M. F., PÓVOA M. M., OLIVEIRA D. J. MÜLLER A. H. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em Artemia salina de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.4, p. 834-838, 2009.

COWELL J. Integridade da Pele e Cuidado das Feridas. In: POTTER P.A., PERRY A.G., HALL, M., STOCKERT P.A. **Fundamentos de Enfermagem**. Rio de Janeiro, Elsevier, 8^o ed., p. 1204-1216, 2013.

CRAGG G. M., NEWMAN D.J. Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, p. 8–17, 2001.

CRAGG G. M., NEWMAN D.J. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v.79, p.629–661, 2016.

CRANE A. M., BHATTACHARYA S. K. The Use of Bromodeoxyuridine Incorporation Assays to Assess Corneal Stem Cell Proliferation. **Corneal Regenerative Medicine**, v. 1014, p.65–70, 2013.

D' ALESSIO P., MIRSHAHI M., BISSON J.-F., BENE, M. C. Skin Repair Properties of d-Limonene and Perillyl Alcohol in Murine Models. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n.1, p. 29–35, 2014.

D'AGOSTINO A., PIROZZI A. V. A., FINAMORE R., GRIECO F., MINALE M., SCHIRALDI C. Molecular Mechanisms at the Basis of Pharmaceutical Grade Triticum vulgare Extract Efficacy in Prompting Keratinocytes Healing. **Molecules**, v. 25, n. 431, 2020.

DAI J., MUMPER R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DONIGAN J. M., PASCOE V. L., KIMBALL A. Psoriasis and herpes simplex virus are highly stigmatizing compared with other common dermatologic conditions: A survey-based study. **Journal of The American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 3, p. 525-526, 2015.

DUNNILL C., PATTON T., BRENNAN J., BARRETT J., DRYDEN M., COOKE J., LEAPER D., GEORGOPOULOS N. T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **International Wound Journal**, v. 14, n.1, p. 89–96, 2015.

ESCANDON J., VIVAS A. C., TANG J., ROWLAND K. J., & KIRSNER R. S. High mortality in patients with chronic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v.19, n.4, p.526–528, 2011.

USA (ESTADOS UNIDOS DA AMERICA). U.S. Department of Health and Human Services Food, Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Center for Devices and Radiological Health (CDRH). **Guidance for Industry Chronic Cutaneous Ulcer and Burn Wounds — Developing Products for Treatment**. Rockville, Maryland, USA, 2006.

FREITAS C. T., SHEPARD G. H., PIEDADE M. T. F. The Floating Forest: Traditional Knowledge and Use of Matupá Vegetation Islands by Riverine Peoples of the Central Amazon. **PLoS ONE**, v.10, n.4, p. 1-15, 2015.

GANTWERKER E. A., HOM D. B. Skin: Histology and physiology of wound healing. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 39, n.1, p. 85-97, 2012.

GASPAR-PINTILIESCU A., STANCIUC A. M., CRACIUNESCU O. Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 854-865, 2019.

GBD (GLOBAL BURDEN OF DISEASES (GBD)). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Global Health Metrics**, v.392, p.1736–1788, 2018.

GERSHENZON J., DUDAREVA N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n.7, p. 408-414, 2007.

GONZÁLEZ-BURGOS E, GÓMEZ-SERRANILLOS M.P. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 31, p. 5319–5341, 2012.

GOULD J. Superpowered Skin. **Nature**, Outlook Skin, v. 563, p. S84, 2018.

GRADA A., OTERO-VINAS M., PRIETO-CASTRILLO F., OBAGI Z., FALANGA V. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. **Research Techniques Made Simple**, v. 137, n. 2, p. e11–e16.

GUPTA S., ANDERSEN C., BLACK J., LEON J., FIFE C., LANTIS J. C., NIEZGODA J., MAPWCA F., SNYDER R., SUMPIO B., TETTELBACH W., TREADWELL T., WEIR D., SILVERMAN R. P. Management of Chronic Wounds: Diagnosis, Preparation, Treatment, and Follow-up. **Wounds**, v.29, n.9, n.S19–S36, 2017.

GURTNER G.C., WERNER S., BARRANDON Y., LONGAKER M. T. Wound Repair And Regeneration. **Nature**, V. 453, N.15, P. 312-321, 2008.

HAN G., CEILLEY R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 3, p. 599-610, 2017.

HARADA H., KASHIWADANI H., KANMURA Y., KUWAKI T. Linalool Odor - Induced Anxiolytic Effects in Mice. **Frontiers Behavioral Neuroscience**, v. 12; n.23, p.241-248, 2018.

HOATH S. B., LEAHY D. G. The Organization of Human Epidermis: Functional Epidermal Units and Phi Proportionality. **The Society for Investigative Dermatology**, v. 121, n.6, p. 1440-1445, 2003.

HOSSAIN M. A., WELI A. M., AHMED S. H. I. Comparison of total phenols, flavonoids and antioxidant activity of various crude extracts of *Hyoscyamus gallagheri* traditionally used for the treatment of epilepsy. **Clinical Phytoscience**, v.5, n.20, 2019.

HUMMITZSCH L., ALBRECHT M., ZITTA K., HESS K., PARCZANY K., RUSCH R., CREMER J., STEINFATH M., HANEYA A., FAENDRICH F., BERNDT R. Human monocytes subjected to ischaemia/reperfusion inhibit angiogenesis and wound healing in vitro. **Cell Proliferation**, v. 00, n.12753, 2020.

ISLAM M. T., KHALIPHA A. B. R., BAGCHI R., MONDAL M., SMRITY S.Z., UDDIN S. J., SHILPI J.A., ROUF R. Anticancer Activity of Thymol: A LiteratureBased Review and Docking Study with Emphasis on its Anticancer Mechanisms. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 71, n. 1, p. 9-19, 2019.

ISO (THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION) 10993-5. 2009. International standard: Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods, 34 p.

JONKMAN J. E. N., CATHCART J. A., XU F., BARTOLINI M. E., AMON J. E., STEVENS K. M., COLARUSSO P. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell Adhesion & Migration**, v. 8, n. 5, p. 440—451, 2014.

KAPP S., SANTAMARIA N. The financial and quality-of-life cost to patients living with a chronic wound in the community. **International Wound Journal**, v.14, n.6, p.1108–1119, 2017.

KARIMKHANI C., DELLAVALLE R. P., COFFENG L. E., FLOHR C., HAY R. J., LANGAN S. M., NSOESIE E.O., FERRARI A.J., ERSKINE H. E., SILVERBERG J. I., VOS, T., NAGHAVI M. Global Skin Disease Morbidity and Mortality An Update From the Global Burden of Disease Study 2013. **JAMA Dermatology**, v.153, n.5, p.406-412, 2017.

KESKIN I., GUNAL Y, AYL A S, KOLBASI B, SAKUL A, KILIC U, GOK O, KORUGLU K, OZBEK H. Effects of Foeniculum vulgare essential oil compounds, fenchone and limonene, on experimental wound healing. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 92, n.4, p. 274–282, 2017.

KIM D., KU B., CHOI E.M. Se-methylselenocysteine stimulates migration and antioxidant response in HaCaT keratinocytes: Implications for wound healing. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 58, n. 126426, 2019a.

KIM J. H., YANG B. TEDESCO A. LEBIG E. G. D., RUEGGER P. M., XU K., BORNEMAN J., MARTINS-GREEN M. High Levels of Oxidative Stress and Skin Microbiome are Critical for Initiation and Development of Chronic Wounds in Diabetic Mice. **Scientific Reports – Nature**, v.9, n.19318, 2019b.

KIM S., KIM T. H., CHOI J.Y., KWON Y.J., CHOI D.H., KIM K. C., KIM M. J., HWANG H. K., LEE K.B. Predictors for Amputation in Patients with Diabetic Foot Wound. **Vascular Specialist International**, v. 34, n. 4, 2018.

KORTING H.C., LLMANN C. S., WHITE E.J. Management of minor acute cutaneous wounds: importance of wound healing in a moist environment. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.25, p.130–137, 2011

KUMAR S., PANDEY A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, ID 162750, 2013.

LE'VESSQUE H., LAFONT O. L'aspirine à travers les siècles: Rappel historique. **La Revue de Médecine Interne**, v.21, p.S8–S17, 2000.

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

LINDHOLM C., SEARLE R.. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. **International Wound Journal**, v.13, s.2, p.5–15, 2016.

LOUGHLIN D. T., ARTLETT C. M. Modification of Collagen by 3-Deoxyglucosone Alters Wound Healing through Differential Regulation of p38 MAP Kinase. **Plos One**, v.6, n.5, 2011.

LU Q., HUANG N., PENG Y., ZHU C., PAN S. Peel oils from three Citrus species: volatile constituents, antioxidant activities and related contributions of individual components. **Journal Food Science and Technology**, v. 56, n. 10, p. 4492-4502, 2019.

LYONS O. T., SAHA P., SMITH A. Redox dysregulation in the pathogenesis of chronic venous ulceration. **Free Radical Biology and Medicine**, n. 19, 2019.

MACEDO E.G., FILHO B.G.S., POTIGUARA R.C.V., SANTOS D.S.B. Anatomia e Arquitetura F Anatomia e Arquitetura Foliar de oliar de Montrichardia linifera Montrichardia linifera (Arruda) Schott (Araceae) Espécie da Várzea Amazônica Schott (Araceae) Espécie da Várzea Amazônica. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, Belém, v. 1, n. 1, p. 19-43, 2005.

MARTINENGO L., OLSSON M., BAJPAI R., SOLJAK M., UPTON Z., SCHMIDTCHEN A., CAR J., JÄRBRINK K. Prevalence of chronic wounds in the general population: Systematic review and meta-analysis of observational studies. **Annals of Epidemiology**, v. 28, p.8-15, 2018.

MAYO S.J., BOGNER J., BOYCE P.C. Use. **The Genera of Araceae**. Kew Royal Botanic Gardens, cap. 16, p. 54, 1997.

MENONA G. K., CLEARY G. W., LANEC M. E. The structure and function of the stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v.435, p. 3–9, 2012.

MIRANDA J.A.L., ROCHA J.A., ARAÚJO K.M., QUELEMES, P.V., MAYO S.J., ANDRADE, I.M. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1142-1149, 2015.

MORTON L. M., PHILLIPS T. J. Wound healing and treating wounds. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.74, n.4, p.589–605, 2016.

MSOMI N. Z., SIMELANE M. B. C. Herbal Medicine. In: **Herbal Medicine**. BUILDERS P.F. IntechOpen, cap. 11, 2018.

NEGREIROS P. S., COSTA D. S., SILVA V. G., LIMA I. B. C., NUNES D. B., SOUSA F. B. M., ARAÚJO T. S. L., MEDEIROS J. V. R., SANTOS R. F., OLIVEIRA R. C. M. Antidiarrheal activity of α -terpineol in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 631–640, 2019.

NIEMANN C., HORSLEY V. Development and homeostasis of the sebaceous gland. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 23, n.8, p. 928–936, 2012.

OEDCD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). Guidance Document On Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests, nº 129. **OECD Environment, Health and Safety**. Publications Series on Testing and Assessment, JT03286856, Paris, 2010.

OLSSON M., JÄRBRINK K., DIVAKAR U., BAJPAI R. The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review. **Wound Repair and Regeneration**, v. 27, p. 114-125, 2018.

OPNEJA A., KAPOOR S., STAVROU E. X. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. **Thrombosis Research**, v.179, p. 56-63, 2019.

PANTOJA, P. O. **Comparação ecofisiológica e de atributos de crescimento das herbáceas aquáticas *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott e *M. arborescens* (L.) Schott em tipologias alagáveis contrastantes na Amazônia central.** Dissertação (mestrado em ecologia) - INPA, Manaus, s.n., 2011.

PASDARANA A., HAMED I. A. The genus *Scrophularia*: a source of iridoids and terpenoids with a diverse biological activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, 2017.

PATIL P. S., FATHOLLAHIPOUR S., INMANN A., PANT A., AMINI R., SHRIVER L. P., LEIPZIG N.D. Fluorinated Methacrylamide Chitosan Hydrogel Dressings Improve Regenerated Wound Tissue Quality in Diabetic Wound Healing. **Advances In Wound Care**, v. 00, n. 00, p. 1-12, 2019.

PEI R., LIU X., BOLLING B. Flavonoids and gut health. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 61, p. 153–159, 2020.

PEREIRA I., SEVERINO P., SANTOS A. C., SILVA A. M., SOUTO E. B. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 566–578, 2018.

PIEDEDE, M.T.F.; SCHÖNGART, J.; JUNK, W.J. O manejo sustentável das áreas alagáveis da Amazônia central e as comunidades de herbáceas aquáticas. **UAKARI**, v. 1, n. 1, p. 43-56, 2005.

PINHEIRO P. F., MENINI L. A. P., BERNARDES P. C., SARAIVA S. H., CARNEIRO J. W. M., COSTA A. V., ARRUDA T. R., LAGE M. R., GONCALVES P. M., BERNARDES C. O., ALVARENGA E. S., MENINI L. Semisynthetic Phenol Derivatives Obtained from Natural Phenols: Antimicrobial Activity and Molecular Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n.1, p. 323–330, 2017.

PINTO B. I., LUJAN O. R., RAMOS S. A., PROPPER C. R., KELLAR R. S. Estrogen Mitigates the Negative Effects of Arsenic Contamination in an in vitro Wound Model. **Applied in Vitro Toxicology**, v. 4, n. 1, 2018.

PLOWMAN T. Folk Uses of New World Aroids. **Economic Botany**, v.23, n.2, p.97–122, 1969.
REINKE J. M., SORG H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**, v.49, p.35–43, 2012.

ROBBINS S. L., COTRAN R. S. Inflamação Aguda e Crônica. In: ROBBINS S. L., COTRAN R. S. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, cap.2, p. 44-77, 2010.

SALOME G. M., ALMEIDA S. A., PEREIRA, M.T.J, MASSAHUD M. R., MOREIRA C. N. O., BRITO M. J. A., FERREIRA L. M. The Impact of Venous Leg Ulcers on Body Image and Self-esteem. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 29, n. 7, 316- 321, 2016.

SANTOS F. N., OLIVEIRA T. A., LIMA K. C.S, ANDRADE J. I. A., SILVA D. X., AMARAL L. V., MOYA H. D., RONCHI-TELES B., MATSUURA T., NUNEZ C.V. *Montrichardia linifera* (Araceae) biological potential, phytochemical prospection and polyphenol content. **Universitas Scientiarum**, Journal of the Faculty of Sciences, v.19, n.3, p.213-224, 2014.

SARQUIS R. S. F. R., SARQUIS I.R., SARQUIS I. R., FERNANDES C. P., SILVA G. A., SILVA R. B. L., JARDIM M. A.G., SANCHEZ-ORT-Z B. L., CARVALHO J. C. T. The Use of Medicinal Plants in the Riverside Community of the Mazagão River in the Brazilian Amazon, Amapá, Brazil: Ethnobotanical and Ethnopharmacological Studies. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2019, p.25, 2015.

SAWKA M. N., CHEUVRONT S. N., KENEFICK R. W. Hypohydration and Human Performance: Impact of Environment and Physiological Mechanisms. **Sports Medicine**, v. 45, n. S1, p. S51–S60, 2015.

SCHAFFER M., WERNER S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacological Research**, v. 58, n. 2, p.165–171, 2008.

SCHERER M. M. C., MARQUESA F. M., FIGUEIRA M. M., PEISINO M. C. O., SCHMITTA E. F. P., KONDRATYUK T. P., ENDRINGER D. C., SCHERER R., FRONZ M. Wound healing activity of terpinolene and α -phellandrene by attenuating inflammation and oxidative stress in vitro. *Journal of Tissue Viability*, v. 28, p. 94-99, 2019.

SERRA R., IELAPI N., BARBETTA A., FRANCISCIS S. Skin tears and risk factors assessment: a systematic review on evidence-based medicine. **International Wound Journal**, v.15, n.1, p. 38-42, 2017.

SERRA, R., GRANDE, R., BUTRICO, L., ROSSI, A., SETTIMIO, U. F., CAROLEO, B., AMATO B., GALLELLI L., FRANCISCIS, S. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v., n.5, p.605–613, 2015.

SILVA R. N. O., SOUSA E. M., PRADO A. F., MULLER A. H., AMARANTE C. B., POVOA M. M.M, MOTA E. F., DOLABELA M. F. Prospección fitoquímica y actividad antiplasmódica del extracto hexánico de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.16, n.2, p.135-139, 2011.

SKIRYCZ A., KIERSZNIOWSKA S., MÉRET M., WILLMITZER L., TZOTZOS G. Medicinal Bioprospecting of the Amazon Rainforest: A Modern Eldorado? **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 10, 2016.

SMITH P.C., MARTÍNEZ C., MARTÍNEZ J., MCCULLOCH C. A. Role of Fibroblast Populations in Periodontal Wound Healing and Tissue Remodeling. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. 270, p. 1-10, 2019.

SORG H., TILKORN D. J., HAGER S., HAUSER J., MIRASTSCHISKI U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, v. 58, p. 81-94, 2017.

SUN H., LV H., QIU F., SUN D., GAO Y., CHEN N., ZHENG Y., DENG K., YANG Y., ZHANG H., XU T., REN, D. Clinical application of a 3D-printed scaffold in chronic wound treatment: a case series. **Journal of Wound Care**, v.27, n.5, p.262–271, 2018.

TAZIMA M. F. G. S., VICENTE Y. A. M. V. A., MORIYA T. Biologia da Ferida e Cicatrização. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.41, n. 3, p. 259-264, 2008.

TEIXEIRA D. F.F., SIQUEIRA B. S., CATTANIO J. H. Importância Da Aninga (*Montrichardia Linifera*) Na Retenção De Sedimentos Na Baía Do Guajará, Pa. **Revista de estudos ambientais (Online)**, v.16, n. 2, p. 6-19, 2014.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Springer, 2001.

WALSH J. W., HOFFSTAD O. J., SULLIVAN M. O., MARGOLIS D. J. Association of diabetic foot ulcer and death in a population-based cohort from the United Kingdom. **Diabetic Medicine**, v. 33, n. 11, p. 1493-1498, 2016.

YADAV E., SINGH D., YADAV P., VERMA A. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Prosopis cineraria* based phenolic rich ointment in wound healing. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1572-1583, 2018.

ZACCHINO S. A., BUTASSIA E., LIBERTO M.D., RAIMONDI M., POSTIGO A., SORTINO M. Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. **Phytomedicine**, 37, 27–48, 2017.

ZAIDI Z., LANIGAN S. W. Skin: Structure and Function. **Dermatology in Clinical Practice**, Springer, London. p. 1–15. 2010.

ZAYAN N. E., WEST J. M., SCHULZ S. A., JORDAN S. W., VALERIO I. L. Incisional Negative Pressure Wound Therapy: An Effective Tool for Major Limb Amputation and Amputation Revision Site Closure. **Advances in Wound Care**, v. 8, n. 8, 2019.

ZIELINS E. R., BRETT E. A., LUAN A., HU M. S., WALMSLEY G. G., PAIK K., SENARATH-YAPA K., ATASHROO D. A., WEARDA T., LORENZ H. P., WAN D. C., LONGAKER, M. T. **Emerging drugs for the treatment of wound healing**. Expert Opinion on Emerging Drugs, v.20, n.2, p.235–246, 2015.

ZIMMERMAN A., BAI L., GINTY D. D. The gentle touch receptors of mammalian skin. **Science**, v. 346 n. 6212, p.950-953, 2014.