

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

**EFEITO DE UMA ESPÉCIE DO GÊNERO *Varronia*  
SOBRE A VIABILIDADE CELULAR, ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA, TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA E O  
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO (*IN VITRO* E *IN VIVO*)**

**Paula Cardoso Ribera**

BELÉM - PA  
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITO DE UMA ESPÉCIE DO GÊNERO *Varronia* SOBRE A  
VIABILIDADE CELULAR, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA,  
TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA E O PROCESSO DE  
CICATRIZAÇÃO (*IN VITRO* E *IN VIVO*)**

**Autora: Paula Cardoso Ribera**

**Orientador: Prof. Dr. Enéas de Andrade Fontes Júnior**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação e Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM - PA

2019

**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)**

---

C268e Cardoso Ribera, PAULA  
Efeito de uma espécie do gênero *Varronia* sobre a  
viabilidade celular, atividade antimicrobiana, toxicidade  
dérmica aguda e o processo de cicatrização (in vitro e in  
vivo) / PAULA Cardoso Ribera. — 2019.  
74 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Enéas de Andrade Fontes Júnior  
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. cicatrização, citotoxicidade, produtos naturais,  
toxicidade dérmica, *Varronia*. I. Título.

CDD 615

---

## FICHA DE APROVAÇÃO

Paula Cardoso Ribera

**Efeito de uma espécie do gênero *Varronia* sobre a viabilidade celular, atividade antimicrobiana, toxicidade dérmica aguda e o processo de cicatrização (*in vitro* e *in vivo*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação e Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019

### Banca Examinadora

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Enéas de Andrade Fontes Júnior (Orientador)

Instituição: PPGCF/UFPA Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva

Instituição: ICS/UFPA Assinatura \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luanna de Melo Pereira Fernandes

Instituição: UEPA Assinatura \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

À Deus pela sua fidelidade e misericórdia e à minha mãe Maria França, que é minha fonte inesgotável de amor e que sempre dobrou seus joelhos em oração a meu favor.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, Autor e Consumador da fé, pela sua Fidelidade, Misericórdia e Graça, que se renovam a cada manhã sobre a minha vida. Agradeço a ti meu Pai, pois eu nada seria sem o seu amor.

À minha mãe Maria França que sonhou os meus sonhos e com muita dificuldade jamais me deixou faltar nada, me incentivando e apoiando em todos os momentos, pelo seu amor, cuidado, carinho, dedicação, compreensão e principalmente pelas suas orações.

Aos meus irmãos Eberson e Paulo Vitor, que mesmo longe sei que sempre estiveram torcendo por mim.

Ao meu namorado e amigo Kaleb Lopes que esteve sempre ao meu lado, sendo paciente, compreensivo e amoroso em todos os momentos.

Ao professor Enéas, que me estendeu a mão desde o início e aceitou ser meu orientador nessa jornada árdua. Agradeço pelos sábios conselhos e ensinamentos que foram fundamentais na minha vida profissional, pessoal e espiritual. Agradeço principalmente a sua amizade.

À equipe do LAFICO, às doutorandas Sabrina e Cinthia pelos conselhos e pela amizade nessa jornada, aos alunos de iniciação Fábio, Pablo, Igor e Leticia pelo companheirismo nesse projeto, pelas risadas, conselhos e amizade.

Ao IC Alessandro Cardoso, que entrou na equipe no meio do caminho e foi parceiro desde então.

Ao Instituto Evandro Chagas pelo fornecimento dos animais para realização dos testes.

À CAPES pelo auxílio financeiro durante a pós-graduação.

## EPÍGRAFE

*“Assim diz o Senhor: pois eu bem sei os planos que estou projetando para vós; planos de paz, e não de mal, para vos dar um futuro e uma esperança.” (Jeremias 29:11)*

## RESUMO

RIBERA, P.C. **Efeito de uma espécie do gênero *Varronia* sobre a viabilidade celular, atividade antimicrobiana, toxicidade dérmica aguda e o processo de cicatrização** (*in vitro* e *in vivo*). f.74. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

Lesões teciduais, particularmente na pele, resultam em danos a estruturas, camadas e linhagens celulares por toda sua extensão. Nessas condições, a cicatrização é o processo fisiológico responsável pela reparação do tecido. A inflamação é uma etapa importante no reparo tecidual e, portanto, um forte alvo para estudos clínicos. A espécie *Varronia multispicata* é usada popularmente para o tratamento de contusões, sendo evidenciado recentemente efeitos anti-inflamatórios e analgésicos. O presente trabalho visou investigar o efeito do extrato aquoso das folhas de *Varronia multispicata* (VAR01) na viabilidade celular, atividade antimicrobiana, toxicidade dérmica e cicatrização *in vitro* e *in vivo*. *In vitro* foi avaliado a viabilidade celular e a cicatrização em fibroblastos murinos da linhagem BALB/c 3T3 e a ação antimicrobiana pela determinação de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. *In vivo* foi realizado o teste de toxicidade dérmica usando ratos *Wistar* fêmeas (grupo salina, 100mg/ml, 200mg/ml e 1000mg/ml do VAR01) e avaliação do processo de cicatrização usando camundongos *Mus musculus* (grupo sham, controle negativo, tratado (creme VAR01 10%) e controle positivo (Dersani®)). *In vitro* o VAR01 manteve as células viáveis no período de 24h, com redução de fibroblastos no tempo de 48h na concentração de 500 µg/ml, aumentou a contração da lesão em fibroblastos e não apresentou atividade antimicrobiana. *In vivo* o VAR01 não promoveu morte ou mudanças comportamentais, não apresentou perfil irritativo, não causou alterações sobre o consumo de água e ração, ganho de peso, peso relativo e análise histológica dos órgãos. O VAR01 mostrou redução nas concentrações séricas de fosfatase alcalina e TGO no grupo tratado com 100 mg/ml quando comparado como grupo controle e, em contrapartida um aumento significativo de concentrações de TGP no grupo de 200 mg/ml em relação ao controle. O extrato, portanto, evidencia-se seguro e de baixa toxicidade, mostrou-se promissor no processo de regeneração tecidual com possível modulação na via inflamatória, sendo um resultado estimulante para a realização das etapas seguintes de avaliação de atividade biológica e elucidação sobre o processo de cicatrização.

**Palavras-chave:** atividade antimicrobiana, cicatrização, produtos naturais, toxicidade, *V. multispicata*, viabilidade celular.

## ABSTRACT

RIBERA, P.C. **Effect of a species of the genus *Varronia* on cell viability, activity antimicrobial, acute dermal toxicity and the wound healing process (*in vitro* and *in vivo*).** p.74. Master's Degree Thesis, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

Tissue damage, particularly to the skin, results in damage to cell structures, layers, and lineages to the fullest extent. Under these conditions, wound healing is the physiological process responsible for tissue repair. Inflammation is an important stage in tissue repair and; therefore, a strong target for clinical studies. The species *Varronia multispicata* is popularly used for the treatment of bruises, with recently discovered anti-inflammatory and analgesic effects. The present work aimed to investigate the effect of aqueous extract of *Varronia multispicata* leaves (VAR01) on cell viability, antimicrobial analysis, dermal toxicity, and *in vitro* and *in vivo* healing. In the *in vitro* assays, there were evaluated the cell viability in BALB/c 3T3 murine fibroblasts, the antimicrobial action by the microdilution method for determination of minimum inhibitory concentration and petri dish culture technique for the minimum bactericidal concentration. Healing assays were performed in cultured fibroblast monolayers. For *in vivo* assays in the dermal toxicity test, female Wistar rats were used and divided into the following groups: saline, 100mg/ml, 200mg/ml, and 1000mg/ml of VAR01; as for healing evaluation, *Mus musculus* mice were used and divided into 4 groups: sham, negative control, treated (VAR01 10%), and positive control (Dersani®). *V. multispicata* kept the cells viable for 24h, with reduction of fibroblasts in the 48h period at a concentration of 500 µg/ml. It showed no antimicrobial activity, presented *in vitro* and *in vivo* injury contraction capacity, did not promote death or behavioral changes, did not cause changes in water and feed intake, weight gain, relative weight, and organ histological analysis, showed a reduction in alkaline phosphatase concentrations in the group treated with 100 mg/ml extract when compared as control group. It was also revealed a reduction in alanine aminotransferase levels in the 100 mg/ml extract-treated group when compared to the control group. However, a significant increase in TGP concentrations was found in the 200 mg/ml group when compared to the control group. While assessing the degree of irritation, VAR01 did not show an irritant profile when administered acutely topically. Therefore, the extract is safe and of low toxicity, promising in the process of tissue regeneration with possible modulation in the inflammatory pathway, being a stimulating result for the following steps of biological activity evaluation and elucidation of the healing process.

**Keywords:** antimicrobial activity, natural products, toxicity, *V. multispicata*, wound healing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Fases da cicatrização: hemostasia e inflamação.....	17
<b>Figura 2</b>	Fases da cicatrização: proliferação celular.....	20
<b>Figura 3</b>	Fases da cicatrização: remodelação tecidual.....	22
<b>Figura 4</b>	Ramo com folhas e inflorescências da Espécie vegetal <i>Varronia multispicata</i> (Cham.) Borhidi. ....	28
<b>Figura 5</b>	Distribuição geográfica da espécie vegetal <i>V. multispicata</i> no Brasil.....	29
<b>Figura 6</b>	Redução do MTT em formazan.....	36
<b>Figura 7</b>	Distribuição das concentrações de VAR01 na microplaca para ensaio da CBM.....	40
<b>Figura 8</b>	Ilustração da linha do tempo de toxicidade dérmica aguda.....	42
<b>Figura 9</b>	Delineamento do experimento <i>in vivo</i> .....	44
<b>Figura 10</b>	Efeito do extrato aquoso de <i>V. multispicata</i> (15,625; 31,125; 62,25;125; 250; 500 µg/mL) sobre a viabilidade celular de fibroblastos murinos 3T3 no período de 24h e 48h.....	47
<b>Figura 11</b>	Efeito do extrato aquoso de <i>V. multispicata</i> (31,125, 62,25 e 125; µg/mL) sobre a regressão da lesão em cultura de fibroblastos murinos nos períodos de 24h, 48h e 72h.....	48
<b>Figura 12</b>	Efeito do tratamento dérmico agudo com extrato aquoso de <i>V. multispicata</i> (100, 200 e 1000 mg/mL) sobre o (A) consumo de água e (B) de ração, e sobre o (C) ganho de peso nos 14 dias subsequentes a administração.....	50
<b>Figura 13</b>	Efeito do tratamento dérmico agudo com extrato aquoso de <i>V. multispicata</i> (100, 200 ou 1000 mg/mL) sobre o peso relativo (A) dos rins e (B) do fígado 14 dias após a administração.....	51
<b>Figura 14</b>	Efeito do tratamento dérmico agudo com extrato aquoso de <i>V. multispicata</i> sobre os níveis séricos de (A) Fosfatase alcalina, (B) Gama glutamil-transferase, (C) Aspartato aminotransferase, (D) Alanina aminotransferase, (E) Ureia e (F) Creatinina após 14 dias da administração.....	52
<b>Figura 15</b>	Efeito do tratamento por 3 e 7 dias com o creme do extrato aquoso de <i>V. multispicata</i> 10% sobre o processo de cicatrização em camundongos. (A) Taxa de contração da lesão. (B) Fotos das lesões nos dias 0, 3 e 7, a partir da formação da lesão.....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação taxonômica da espécie vegetal <i>Varonia multispicata</i> .....	29
<b>Tabela 2</b>	Divisão de grupos experimentais para avaliação da toxicidade dérmica aguda.....	41
<b>Tabela 3</b>	Resultado da atividade antimicrobiana de cepas bacterianas ATCC.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>FGF</b>	Fator de crescimento de fibroblastos
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaqueta
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator transformador de crescimento beta
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>VAR01</b>	Extrato aquoso de <i>Varronia multispicata</i>
<b>MTT</b>	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
<b>TGO</b>	Aspartato aminotransferase
<b>TGP</b>	Alanina aminotransferase
<b>GAMA-GT</b>	Gama glutamiltransferase
<b>FA</b>	Fosfatase alcalina
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>UFPA</b>	Universidade Federal do Pará.
<b>TDA</b>	Toxicidade dérmica aguda
<b>DMEM</b>	Meio Dulbecco Eagle Modificado
<b>SBF</b>	Soro bovino fetal
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido
<b>OECD</b>	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
<b>PGRSS</b>	Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>DER</b>	Dersani
<b>CTL</b>	Controle
<b>CBM</b>	Concentração bactericida mínima

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO .....	16
2.1 Processo de Cicatrização .....	16
2.1.1 Hemostasia .....	16
2.1.2 Inflamação.....	18
2.1.3 Proliferação celular.....	20
2.1.4 Remodelação tecidual.....	22
2.2 Agentes cicatrizantes .....	23
2.3 Produtos naturais e cultura medicinal.....	24
2.4 Família Cordiaceae: gênero <i>Varronia</i> P. Browne. ....	25
2.5 <i>Varronia multispicata</i> (Cham.) Borhidi .....	27
2.5.1 Descrição botânica.....	27
2.5.2 Aspectos fitoquímicos e atividades biológicas de <i>Varronia multispicata</i> .....	30
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Geral	33
3.2 Específicos .....	33
4 METODOLOGIA .....	34
4.1 Formulação do extrato aquoso de <i>V. multispicata</i> .....	34
4.1.1 Obtenção do material vegetal .....	34
4.1.2 Preparo do extrato aquoso das folhas da <i>V. multispicata</i> .....	34
4.1.3 Preparo do creme para administração tópica.....	34
4.2 Ensaio <i>in vitro</i> .....	35
4.2.1 Cultivo e manutenção dos fibroblastos.....	35
4.2.2 Determinação da viabilidade celular.....	35

4.2.3 Cicatrização <i>in vitro</i> .....	37
4.2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana .....	37
4.3 Ensaio <i>in vivo</i> .....	40
4.3.1 Animais .....	40
4.3.2 Avaliação da toxicidade dérmica aguda .....	41
4.3.3 Cicatrização <i>in vivo</i> .....	44
4.4 Análise estatística.....	46
5 RESULTADOS .....	47
5.1 Ensaio <i>in vitro</i> .....	47
5.1.1 VAR01 apresenta baixa citotoxicidade.....	47
5.1.2 VAR01 melhora o fechamento das lesões <i>in vitro</i> .....	47
5.1.3 VAR01 não apresenta atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	49
5.2 Ensaio <i>in vivo</i> .....	49
5.2.1 VAR01 possui baixa toxicidade dérmica aguda .....	49
5.2.2 VAR01 melhora o processo de cicatrização em camundongos.....	53
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÃO .....	62
REFERÊNCIA .....	63
ANEXO I – Parecer do CEPAE .....	72
ANEXO II – ARTIGO PUBLICADO .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

Lesões teciduais, particularmente na pele, resultam em danos à estruturas, camadas e linhagens celulares por toda sua extensão. Nessas condições, a cicatrização é o processo fisiológico responsável pela reparação e recuperação da integridade e função do tecido. Seu processo ocorre em fases sobrepostas e distintas, a saber: a hemostasia, a inflamação, a proliferação celular e a remodelação tecidual (SHAW e MARTIN, 2009; REINKE e SORG, 2012).

A demora no mecanismo de reparo de feridas, promovida por eventos patológicos paralelos, podem desencadear um estado de reação inflamatória descontrolada e evoluir para uma condição crônica. Desta forma, resulta em novas morbidades e no comprometimento da saúde e qualidade de vida do paciente. Entre as fases do processo de cicatrização, a inflamação é uma etapa importante no reparo tecidual e, portanto, um forte alvo para estudos clínicos (MENKE et al, 2007; PEREIRA et al, 2013; BLASSAN et al, 2014; PERINI et al, 2015).

Atualmente, existem várias especialidades farmacêuticas como géis, cremes e pomadas que tem demonstrado eficácia clínica na terapia de cicatrização. No entanto, estas apresentam limitações quanto ao custo elevado, a baixa aderência ao local da lesão e a capacidade de formar novos tecidos de qualidade (YOUNG e McNAUGHT, 2011; PEREIRA et al, 2013).

Na busca por alternativas inovadoras, as plantas são importantes fontes de constituintes bioativos. Sua prospecção deve ser realizada a partir do conhecimento de comunidades tradicionais preservadas quanto a utilização para o tratamento tópico de feridas ou aspectos semelhantes (BALEKAR et al, 2012).

Apesar do amplo conhecimento popular, pouco se sabe sobre a toxicidade ou eficácia de grande parcela das espécies vegetais utilizadas na intervenção ou prevenção de doenças. Este fato reforça a necessidade de extensivas investigações que caracterizem sua segurança e verifique a eficácia relacionadas às alegações de efeito (BALLABH et al.,2008; ADETUTU et al. 2011; BLASSAN et al, 2014).

Entre as plantas de ocorrência Amazônica, as espécies do gênero *Varronia*, o qual pertence à família *Cordiaceae*, são predominantes de zonas tropicais e subtropicais. São popularmente utilizadas como fonte de tratamento de várias patologias que afetam o organismo humano devido suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, analgésicas, antioxidante, anti-helmíntica e diurética (BAYEUX et al. 2002; NOVAIS et al. 2003; ARREBOLA et al., 2004; MEDEIROS et al. 2007; SHARMA e ASATI, 2010; MATIAS et al, 2015.).

A espécie *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi (sinônimo *Cordia multispicata*) é popularmente utilizada para o tratamento de contusões e problemas do trato respiratório (AMOROZO e GÉLY, 1988; KUROYANAGI et al, 2001), tendo sido evidenciado recentemente que é dotada de propriedades antinociceptiva, anti-inflamatória e antiedematogênica, em modelos animais (LOPES, 2017).

Nesse contexto, o presente estudo se propõe a investigar a influência do extrato aquoso das folhas de *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi sobre o processo de cicatrização, além de avaliar sua segurança para aplicação tópica, de forma a contribuir com conhecimento terapêutico sobre a espécie

## **2 REFERÊNCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Processo de Cicatrização**

A pele é o maior órgão anatômico normal do corpo humano, constituindo-se como uma barreira natural a entrada de organismos invasores. A ocorrência de lesões que comprometam a sua integralidade epitelial e capacidade de proteção, abrem espaço para graves processos patológicos. Como resposta a agressão, são desencadeados eventos espontâneos que visam reestabelecimento da homeostasia, a cicatrização (VENUS et al, 2010; PERINI et al, 2015; ARTEM ATAIDE et al, 2018; DENG et al, 2018).

A cicatrização é o processo fisiológico responsável pela reparação e recuperação da integridade e função de um tecido lesionado. Uma ferida, particularmente na pele, resulta em danos à estruturas, camadas e linhagens celulares por toda sua extensão. O organismo, em resposta imediata ao insulto inicial, desencadeia complexas vias celulares e extracelulares de uma maneira regulada e coordenada, que interagem e desempenham um papel fundamental na restauração da integridade tecidual. (VELNAR et al., 2009; BLASSAN et al, 2014).

O desenvolvimento de um novo tecido envolve fatores celulares e humorais, tais como: células inflamatórias, proteínas plasmáticas, tecido endotelial e mediadores químicos. As interações entre esses componentes biológicos ativam as etapas de cicatrização e estimulam uma resposta fisiológica coordenada e sobreposta. Estas, por sua vez, proporcionam a hemostasia imediata após a lesão e inicia os processos inflamatórios, proliferação celular e remodelação tecidual (JANIS et al, 2006; SHAW e MARTIN, 2009; REINKE e SORG, 2012; YEH et al, 2017).

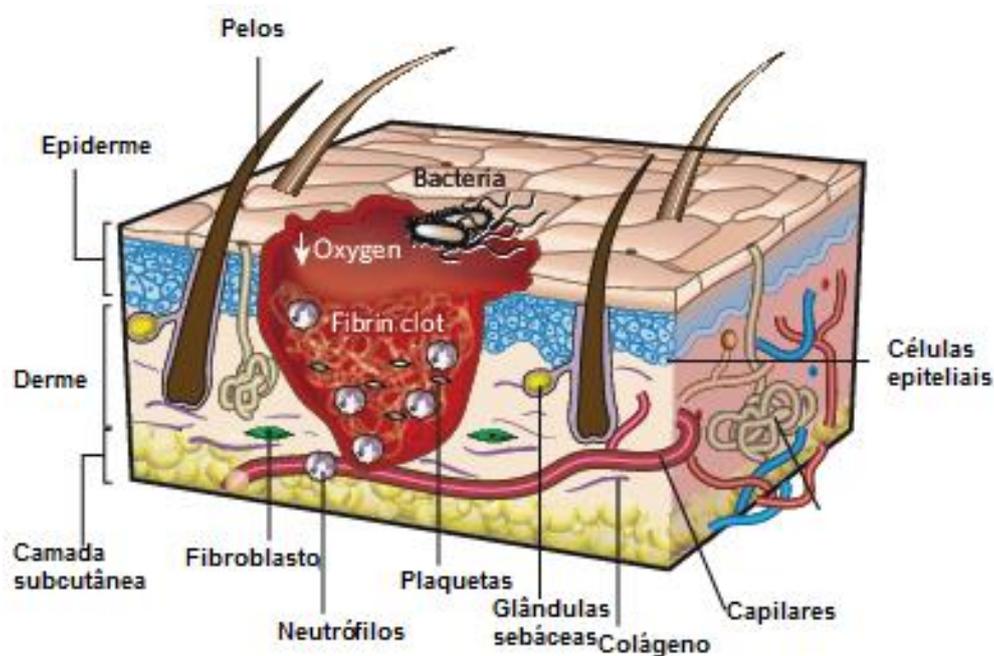
#### **2.1.1 Hemostasia**

O sistema hemostático é a primeira fase envolvida no processo de reparação e é iniciada imediatamente após o surgimento da ferida (FIGURA 1). Após a ruptura dos vasos sanguíneos e o extravasamento de fluidos para o espaço lesado, ocorre a liberação e ativação de compostos que promovem uma

vasoconstrição para o controle da hemorragia. Os principais componentes envolvidos nessa fase são as plaquetas, o endotélio e as proteínas plasmáticas. Estas últimas atuam na agregação plaquetária e deposição de coágulo de fibrina, formando uma barreira física vascular (JANIS et al, 2006; VELNAR et al, 2009; REINKE e SORG, 2012; ZHU et al, 2018).

A agregação plaquetária acontece com a exposição do colágeno na camada subendotelial após dano vascular. As plaquetas adquirem uma superfície pró-hemostática, que favorece a interação com o colágeno e os componentes da matriz extracelular (MEC). Este processo produz uma matriz plaquetária provisória, que atua como estrutura de suporte para a migração de leucócitos, fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos. As plaquetas ativas, então, agregam-se formando pontes de fibrinogênio e a formação do tampão plaquetário rico em fibrina, que reestabelece a hemostasia (SHAW e MARTIN, 2009; REINKE e SORG, 2012; VERSTEEG et al, 2013).

**Figura 1** - Fases da cicatrização: hemostasia e inflamação.



**Fonte:** Adaptado de Gurtner et al., 2008.

As plaquetas têm um papel crucial no processo de cicatrização e são fontes de múltiplos fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator transformador de crescimento- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Estes fatores estimulam o recrutamento e quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos para a ferida. Estimulam também a síntese de colágeno, favorecem a formação de miofibroblastos e promovem a angiogênese (GURTNER et al, 2008; SHAW e MARTIN, 2009; PEREIRA et al, 2013).

Tanto o coágulo de fibrina, quanto as plaquetas e as células leucocitárias infiltradas liberam mediadores que continuam a regular a cascata de cura e ativar o processo inflamatório. As principais citocinas secretadas e que participam das fases seguintes de reparação cicatricial são o fator de necrose tumoral –  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina – 6 (IL-6). A vasoconstrição é então seguida de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, facilitando a entrada de células inflamatórias no espaço lesionado ao redor da ferida (YOUNG e McNAUGHT, 2011; REINKE e SORG, 2012; MAQUART e MONBOISSE, 2014).

### **2.1.2 Inflamação**

Uma segunda resposta a lesão, e que está intimamente ligada a fase anterior, é a inflamação (FIGURA 1). Esta é caracterizada pela vasodilatação, exsudação de líquidos, liberação de mediadores químicos e infiltração intensificada de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) para a região cicatricial. Esses processos são ativados e amplificados por uma série de fatores intracelulares e extracelulares que coordenam fortemente a inflamação e tornam-se essenciais na cicatrização, no ataque contra agentes patogênicos invasores e remoção de tecido morto (PRISTO, 2012; YEH et al, 2017).

Na fase inflamatória inicial, os neutrófilos são as primeiras células de defesa a serem recrutadas para o leito da ferida. Tal infiltração ocorre a partir do aumento da permeabilidade vascular, através da parede endotelial. Este

processo é comandado por sinalizadores quimiotáticos, como a ativação do sistema complemento, liberação de mediadores químicos pelas plaquetas, produtos de degradação bacteriana e TGF- $\beta$  (JANIS et al, 2006; GURTNER et al, 2008; SHAW e MARTIN, 2009; VELNAR et al, 2009; YEH et al, 2017).

No processo inflamatório, os neutrófilos têm a função de eliminar agentes invasores e remover partículas estranhas por fagocitose. Atuam também liberando substâncias tóxicas, tais como enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (EROS), e mediadores, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, que agem como agentes quimioatrativos para outras células envolvidas na fase inflamatória. Ao completar sua tarefa, os neutrófilos sofrem apoptose e são fagocitados pelos macrófagos (SHAW e MARTIN, 2009; REINKE e SORG, 2012; OTTERÇO et al, 2018).

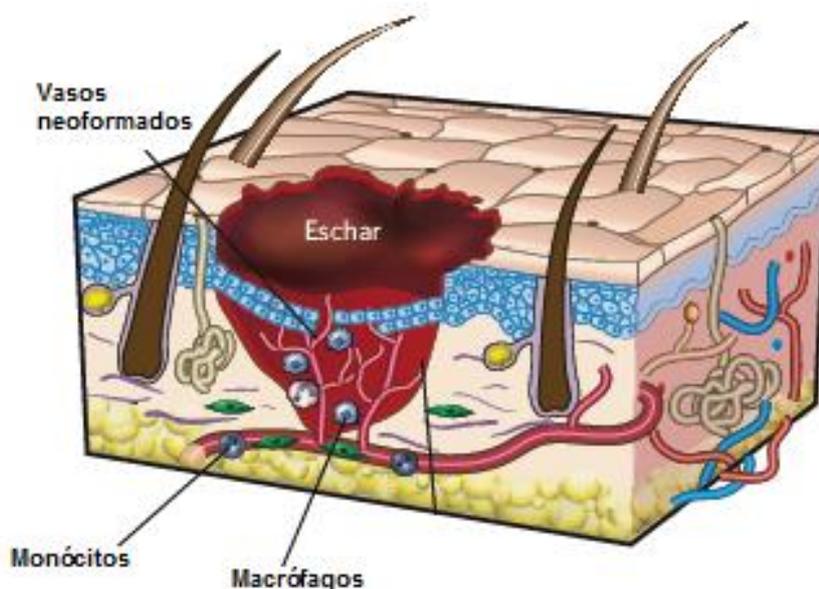
Durante a fase tardia da inflamação, os monócitos são as células predominantes, que ao entrar em contato com o tecido lesionado são diferenciados em células fagocíticas, os macrófagos. Seu recrutamento para a zona de ferida ocorre em resposta a fatores de crescimento (TGF- $\beta$ 1, PDGF), leucotrienos B4, componentes do complemento e produtos da degradação da MEC. O pico de infiltração se dá entre 48 e 72 horas após o início do processo de cicatrização, tendo os macrófagos uma vida útil mais longa que os neutrófilos (JANIS et al, 2006; SHAW e MARTIN, 2009; BUDOVSKY et al, 2015; YEH et al, 2017).

Os macrófagos são fundamentais para os estágios mais tardios da resposta inflamatória. Isto porque participam da promoção e resolução da inflamação, atuando como células apresentadoras de antígenos e removedores de células apoptóticas e corpos estranhos. Operam ainda dando suporte à restauração do tecido pela liberação de colagenase, TGF- $\beta$  e fatores de crescimento (EGF, FGF, PDGF e VEGF), que promovem a proliferação celular, estimulação da angiogênese e síntese de componentes da MEC (JANIS et al, 2006; MOSSER e EDWARDS, 2008; YOUNG e McNAUGHT, 2011).

### 2.1.3 Proliferação celular

Assim que a resposta inflamatória é equilibrada, inicia a terceira etapa envolvida no processo de cicatrização, a proliferação celular ou fase fibroblástica (FIGURA 2). Esse estágio é descrito pela migração e proliferação de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos; deposição de colágeno, restauração da rede vascular e MEC recém-formada, que substitui a matriz provisória de fibrina, com formação de tecido de granulação. Nessa fase também estão envolvidas células inflamatórias e hemostáticas, mediadores químicos e os fatores de crescimento (VELNAR et al, 2009; YOUNG e McNAUGHT, 2011).

**Figura 2** - Fases da cicatrização: proliferação celular.



**Fonte:** Adaptado de Gurtner et al., 2008.

Devido ao comprometimento vascular no centro da ferida, a angiogênese, que acontece concomitante às fases de regeneração, é necessária para fornecer nutrientes e oxigênio para a ferida e o novo tecido. Para tanto, as células endoteliais respondem a vários fatores angiogênicos, incluindo TGF- $\beta$ 1, PDGF, FGF, VEGF, que são liberados por plaquetas, queratinócitos, fibroblastos e macrófagos (BALBINO et al. 2005; OTTERÇO et al, 2018).

Após o estímulo, as células proliferam e migram para a região danificada, apoiando o crescimento capilar ao longo da ferida e o aparecimento do tecido cicatricial de granulação, que serve de suporte aos estágios posteriores do processo de reparo (REINKE e SORG, 2012).

Os fibroblastos são as principais células do tecido de granulação e, em resposta aos mediadores como TGF- $\beta$ 1, PDGF, TNF-  $\alpha$  e IL-1 são ativados e recrutados das margens da lesão para o local da ferida. Os fibroblastos também expressam suas próprias citocinas e fatores de crescimento com objetivo de melhorar a quimioatração de mais células para a região (LI e MAITZ, 2018).

Ao povoar o novo tecido, os fibroblastos iniciam o processo de produção e secreção proteínas componentes da MEC, como a fibronectina, ácido hialurônico, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e fibras de colágeno tipo I e III. Juntos, estes elementos representam a base para a nova matriz do tecido conjuntivo e conferem força à pele. (MAQUART e MONBOISSE, 2014; YEH et al, 2017).

Uma vez que a matriz é estabelecida, os fibroblastos se diferenciam em células contráteis, os miofibroblastos, pela ação de macrófagos. Essa mudança permite que eles se liguem às proteínas ao redor (fibronectina e colágeno) e auxiliem na aproximação das bordas da lesão. Através da interação entre a actina e miosina, que puxam os corpos celulares mais próximos, ocorre a contração da ferida. Desta forma, os fibroblastos e miofibroblastos desempenham papéis importantes na fase de reparo, pois promovem juntos a formação da nova MEC, o que favorece ainda mais a migração celular (PRISTO, 2012).

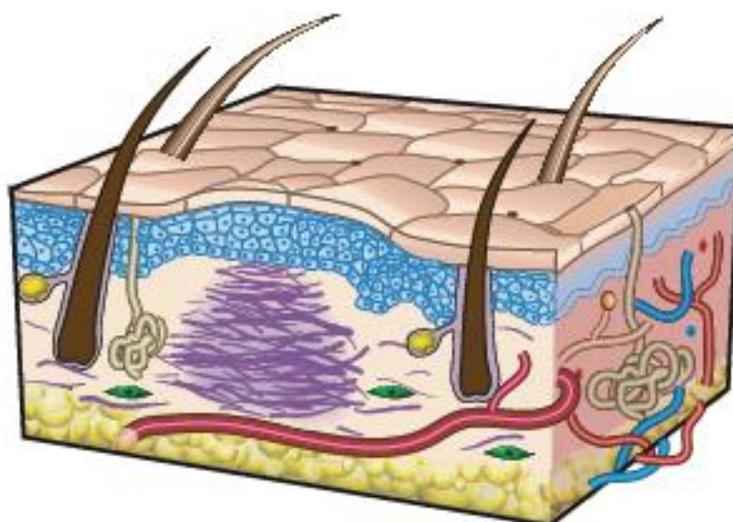
Ao final da fase proliferativa ocorre a epitelização, processo que cobrirá a superfície da lesão. Pela estimulação de citocinas e fatores de crescimento ocorrerá a maturação e migração dos queratinócitos (células epiteliais) a partir das margens da ferida até que ocorra o fechamento da região e ligação com a matriz abaixo. Desta forma, é então restaurada a barreira de proteção do epitélio contra invasores (SPIEKSTRA et al, 2007; LI e MAITZ, 2018).

### 2.1.4 Remodelação tecidual

Como etapa final da cicatrização, ocorre a remodelação tecidual, que é responsável pelo amadurecimento do novo epitélio (FIGURA 3). Este remodelamento prosseguirá até que a composição e propriedades do novo tecido sejam próximas àsquelas do tecido saudável (BALBINO et al. 2005).

O objetivo final do processo de cicatrização é a regeneração do tecido sem formação de cicatrizes e com aumento da força de tensão. Durante este estágio, todos os processos ativados após a lesão diminuem e cessam, com prevalência principal de colágeno e algumas proteínas da MEC (YOUNG e McNAUGHT, 2011; REINKE e SORG, 2012).

**Figura 3** – Fases da cicatrização: remodelação tecidual.



**Fonte:** Adaptado de Gurtner et al., 2008.

O colágeno, sintetizado pelos fibroblastos e miofibroblastos, é o principal constituinte do tecido cicatricial. Sua produção aumenta ao longo da ferida, suas fibras são alinhadas e seus feixes sofrem aumento de diâmetro. A substituição do colágeno do tipo III, produzido na fase proliferativa, pela deposição do colágeno do tipo I, mais forte. (STRONCEK et al, 2009).

A enzima collagenase (metaloproteinase), produzida pelos macrófagos e fibroblastos, são as responsáveis pela degradação das fibras de colágeno

imaturas e não funcionais. A organização total é alcançada durante os estágios finais da fase de remodelação (GURTNER et al, 2008).

Com o acúmulo de colágeno, os vasos sanguíneos reduzem a sua densidade, a concentração de fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos decaem gradualmente por apoptose, componentes da MEC como o ácido hialurônico e a fibronectina são degradados e os proteoglicanos aumentam sua quantidade. O tecido de granulação amadurece para formar a cicatriz e a resistência à tração da ferida aumenta progressivamente em paralelo com a formação do colágeno (REINKE e SORG, 2012; BLASSAN et al, 2014).

## **2.2 Agentes cicatrizantes**

No tecido sadio o processo de regeneração ocorre de maneira ordenada, culminando na reparação de tecidos danificados. Entretanto, um processo de cicatrização inapropriado, pode envolver fatores intrínsecos ou extrínsecos que interferem negativamente na capacidade de restauração anátomo-funcional do tecido, bem como o atraso no reparo da ferida e contribuem com o risco de contaminação por agentes infecciosos. Esses fatores podem afetar diretamente as fases responsáveis pelo processo de cicatrização, como destaque a fase inflamatória. (ZHU et al, 2018; THAKUR et al, 2011; ATAIDE et al, 2018).

Apesar de a inflamação aguda desempenhar um papel benéfico na cicatrização, reações inflamatórias exacerbadas elevam descontroladamente os níveis de citocinas. Esta condição pode gerar uma resolução inadequada da ferida, danos extensos aos tecidos, atraso nas etapas de regeneração e até o desenvolvimento de uma ferida crônica. Trata-se de um fator etiológico comum para diversas doenças que afetam a saúde e a qualidade de vida do paciente (MENKE et al, 2007; PEREIRA e BÁRTOLO, 2016; YEH et al, 2017; XU e HSIA, 2018).

Diante da complexidade do processo de reparo, várias alternativas terapêuticas têm sido desenvolvidas. Os agentes cicatrizantes são compostos que idealmente devem melhorar uma ou mais fases de cicatrização sem efeitos colaterais deletérios. Entre esses encontram-se hidropolímeros, hidrogéis,

pomadas, acupuntura, curativos e enxertos (SUMITRA et al, 2005; SMITH et al, 2017; ATAIDE et al, 2018; OTTERÇO et al, 2018; ZHU et al, 2018).

Embora existam estratégias clinicamente eficazes, estas apresentam limitações relevantes que prejudicam a regressão da lesão, como maior frequência na troca de curativos, risco de contaminação, prevalência de morbidade, vascularização inadequada, baixa aderência ao leito da ferida, incapacidade de reproduzir apêndices cutâneos e altos custos de fabricação (YOUNG e McNAUGHT, 2011; PEREIRA et al, 2013, PERINI et al, 2015; XU e HSIA, 2018).

A busca por novos produtos capazes de otimizar o processo cicatricial, melhorar a qualidade do tecido, e que interfiram de forma positiva nas etapas de cicatrização com boa relação custo-benefício tem crescido nos últimos anos (HOUSE, 2015; PERINI et al, 2015).

### **2.3 Produtos naturais e cultura medicinal**

No início da colonização brasileira, os europeus notaram a importância da cultura medicinal indígena com tratamento de doenças a partir de remédios naturais. Esses produtos oriundos da natureza utilizados como fontes medicinais vinham em grande parte de preparações a base de plantas e ervas, demonstrando a importância dessa terapia alternativa e sua eficácia (PINTO et al, 2002; VIEGAS JR. et. al., 2006).

O Brasil é um país rico em sua flora tropical, sobretudo na região Amazônica considerada uma das maiores floresta do planeta, essa diversidade natural possui uma valiosa fonte etnofarmacológica e um enorme potencial de novos fármacos, tendo como guia os conhecimentos e práticas tradicionais repassados pelos indígenas e que tem durado por gerações. Na terapêutica tradicional, conhecida também como alternativa, inúmeras espécies de produtos naturais são aplicadas para tratar patologias e prevenir doenças (BARREIRO e BOLZANI, 2009; DUTRA et al, 2016).

O uso de plantas na medicina permanece ao longo do tempo e tem crescido, devido elas serem agentes promissoras que oferecem substâncias

biologicamente ativas que ajudam no tratamento de doenças, sendo largamente preferidas devido à sua ampla disponibilidade, baixa toxicidade e sua eficácia como preparações brutas. Substâncias naturais que possuem em sua composição químicos metabólitos secundários como alcaloides, terpenóides e flavonoides são descritos na literatura como compostos cicatrizantes devido seus potentes efeitos anti-inflamatória, antimicrobiano e antioxidantes (SHARMA et al, 1990, SUGUNA et al, 2002; SUMITRA et al, 2005; ANNAN et al, 2008; SHIVHARE et al, 2010; MATIAS et al, 2013; PERINI 2015).

Na natureza, as plantas têm sido um dos alvos de interesse científico em pesquisas farmacológicas como estratégia de descobrir novas opções de tratamento medicamentoso e o desenvolvimento de produtos fitoterápicos, isolamento de substâncias bioativas e fármacos sintéticos. A literatura relata que cerca de 250 produtos naturais que estavam em estudo, aproximadamente 80% eram oriundos de plantas medicinais. Na terapêutica atual muitos produtos acabados de fontes naturais estão disponíveis e são aplicados na prática clínica, no entanto apesar do fácil acesso a esses medicamentos, parte significativa da população ainda não consegue custear tais produtos e optam para o tratamento tradicional à base de plantas. (VIEGAS JR. et. al., 2006; HARVEY, 2008; REUTER et al., 2009; MATIAS et al, 2013; LORDANI et al, 2018).

Na busca por novos produtos com atividade biológica e entre as alternativas da flora amazônica, encontra-se o gênero *Varronia* P. Browne em particular a *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi que pode ser uma espécie promissora para o desenvolvimento de uma droga inovadora com constituintes bioativos seguros e eficazes.

#### **2.4 Família Cordiaceae: gênero *Varronia* P. Browne.**

A *Cordiaceae* é uma família monofilética apoiada por dados moleculares e morfológicos, com a presença de um endocarpo indiviso, ramos estigmáticos duplamente divididos e cotilédones plicados. *Cordiaceae* compreende atualmente de três gêneros: *Cordia* L., *Coldenia* L. e *Varronia* P. Browne (TARODA e GIBBS, 1986; GOTTSCHLING et al. 2005; MILLER, 2001, 2007; MILLER E GOTTSCHLING, 2007).

Durante anos alguns autores trataram *Varronia* P. Br. como uma seção de *Cordia* L.. O número de espécies descritas de *Cordia* L. cresceu e a diversidade morfológica dessas espécies resultou em muitas opiniões sobre quantos gêneros, subgêneros ou seções deveriam ser reconhecidos. No entanto, não houve nenhum consenso sobre se *Varronia* ou as outras divisões de *Cordia* L. deveriam receber o nível de gênero (MILLER, 2001, 2007; MILLER E GOTTSCHLING, 2007).

Um estudo realizado por Gottschling (2001, 2005) gerou dados moleculares correlacionados com os dados morfológicos e palinológicos e revelou que cerca de 100 espécies que foram reconhecidas como pertencentes a seção *Varronia*, na verdade são irmãs do restante das espécies de *Cordia* L. e sugeriu que a *Varronia* deveria ser considerada como um gênero distinto.

Baseados no estudo anterior alguns autores propuseram a integração do gênero *Varronia*, o que permitiu a separação da seção *Varronia* de *Cordia* L. e sua ascensão ao nível de gênero da família *Cordiaceae* e que agora inclui espécies como *C. globosa*, *C. leucocephala*, *C. multispicata*, *C. verbanacea* (MILLER E GOTTSCHLING, 2007; MILLER, 2007).

As diferenças morfológicas entre os gêneros *Cordia* e *Varronia* consiste nas folhas e inflorescências: árvores com inflorescência paniculada ou cimeiras abertas, folhas de margem totalmente inteira em *Cordia* e arbustos com inflorescência condensada, espatulada, pequena e compacta, folhas de margem serrada em *Varronia* (MILLER, 2001, 2007; MILLER E GOTTSCHLING, 2007; LAGE VIANA et al, 2016).

Esse novo gênero congrega cerca de 100 espécies neotropicais de arbustos, com folhas serradas e inflorescências condensadas. No Brasil são reconhecidas até o momento a ocorrência de 30 espécies do gênero *Varronia* P. Br. Apesar do surgimento do novo gênero *Varronia* e o mesmo englobar várias espécies antes pertencentes a *Cordia* L., muitos estudos científicos ainda adotam a denominação antiga *Cordia* (TARODA e GIBBS, 1986; STAPF e SILVA, 2013).

Na medicina popular essas espécies são comumente usadas como fonte de remédio e são preparadas na forma de decoção, extrato, chás, xaropes e infusão hidroalcoólica. Entre as partes mais utilizadas como preferência terapêutica, se encontram as folhas, casca do caule, frutos e sementes. As

classes de substâncias já descritas no gênero *Varronia* são: flavonoides, alcaloides, cardioquinonas, taninos, derivados fenilpropanoides e triterpenos (AMOROZO e GÉLY, 1988; DE CARVALHO et al, 2004; THIRUPATHI, 2008; OZA e KULKARNI, 2017).

As principais aplicações biológicas reportadas são como agentes antiinflamatórios, antihelmíntico, diuréticos, laxantes, antitussígeno, antiedematogênicos, analgésicos, antioxidantes, antimicrobianos e cicatrizantes (MENEZES et al. 2001; BAYEUX et al, 2002; ARREBOLA et al. 2004; DE CARVALHO et al, 2004; SANTIAGO et al, 2005; SERTIÉ et al. 2005; FREITAS et al, 2006; SOUZA, 2008; BARROSO et al, 2009; CORREIA DA SILVA et al, 2010; AL-MUSAYEIB et al, 2011; PIMENTEL et al, 2012; PERINI et al. 2015).

Entretanto, apesar dos estudos realizados com o gênero *Varronia* P. Br., muitas espécies ainda precisam ser estudadas como possíveis alternativas farmacológicas. Entre essas espécies encontrasse a *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi, com poucas evidências científicas para atividade biológica.

## **2.5 *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi**

### **2.5.1 Descrição botânica**

A planta *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi (sinônimo *Cordia multispicata* (Cham.) Linnaea) é um arbusto invasor de pastagens abandonadas. A mesma possui flores dispostas com inflorescências densas, brancas, pentaméricas e tubulares, com folhas de margem serrada (FIGURA 4). Seus frutos são vermelhos e carnudos e servem como alimento para aves e gado. De origem nativa e espontânea, a *V. multispicata* é endêmica no Brasil e está presente nas regiões Norte, Nordeste, Centro oeste e Sudeste (FIGURA 5). (FEUILLET, 2016, VIEIRA et al, 1994, 1997; MACHADO e LOIOLA, 2000; KUROYANAGI et al, 2001, 2003; STAPF, 2015).

**Figura 4** – Ramo com folhas e inflorescências da Espécie vegetal *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi.



Fonte: Herbário UFPE, 2010.

**Figura 5** – Distribuição geográfica da espécie vegetal *V. multispicata* no Brasil.



**Fonte:** [https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/varronia\\_multispicata](https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/varronia_multispicata).

A espécie é classificada taxonomicamente de acordo com a TABELA 1.

**Tabela 1** - Classificação taxonômica da espécie vegetal *Varronia multispicata*.

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	
<b>Divisão</b>	Angiospermae
<b>Classe</b>	Dicotyledonea
<b>Ordem</b>	Tubiflorae
<b>Família</b>	Cordeacea
<b>Gênero</b>	Varronia P. Browne
<b>Espécie</b>	<i>Varronia multispicata</i> (Cham.) Borhidi
<b>Sinonímia botânica</b>	<i>Cordia multispicata</i> (Cham.) Linnaea
<b>Nomes populares</b>	“Carucaá”, “maria-preta”, “chá de-Caboclo” e “cavarucaá”

**Fonte:** do autor.

## 2.5.2 Aspectos fitoquímicos e atividades biológicas de *Varronia multispicata*

### 2.5.2.1 Compostos químicos

Estudos fitoquímicos elucidaram alguns constituintes de triterpenos. Da fração acetato de etila do extrato metanólico obtidos das folhas resultou no isolamento de seis novos derivados de triterpenos do tipo ursano e oleanano (Cordiacetal A – B, Cordiacetal A – C e Cordianone), além de outros oito triterpenoides descritos na literatura e flavonoides. Em seguida, uma nova triagem levou ao registro de triterpenos do tipo damarano, sendo descobertos nove compostos de cardinóis (Cardinol A – I) e um composto de Cordialina A, já isolada na espécie *C. verbenacea*. (KUROYANAGI et al, 2001, 2003).

Compostos fenólicos e terpenóides como trans-fitol (diterpeno), taraxerol (triterpeno), 3',5-di-hidroxi-3,4',7'- trimetoxiflavona, quercetina (flavonoides), rutina, 5-hidroxi-3,4',7'-trimetoxiflavona e tilirosídeo também foram encontrados em extratos acetônico e suas frações obtidos de pó das folhas (CORREIA DA SILVA et al, 2010; AL-MUSAYEIB et al, 2011).

Graça (2010) investigou amostras de óleo essencial das folhas coletadas em quatro regiões do estado do Pará e foi observado a ocorrência de terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos), o  $\beta$ -cariofileno e o  $\beta$ -felandreno, sendo o  $\beta$ -cariofileno o composto com maior predominância encontrado nas amostras. Raízes secas também foram alvos de ensaios fitoquímicos e a partir do extrato hexânico foi descrito o isolamento e caracterização de três naftoquinonas: 2,3-Dihidroxi-cordiaquinona J, cardioquinona B e J (DA SILVA et al, 2017).

Vaz (2015) também identificou os constituintes do extrato etanólico das folhas de *V. multispicata* e suas frações a partir da Cromatografia em camada delgada comparativa e observou a presença de flavonoides, cumarinas, ácidos graxos, antracenos e terpenóides. O mesmo estudo também permitiu o isolamento de cinco substâncias a partir do extrato etanólico das folhas e do extrato acetato de etila da inflorescência. Os compostos identificados foram retusina, 3,7-dimetoxi-3',4',5-triidroxiflavona e 5,3'-diidroxi-3,7,4' trimetoxiflavona ou Ayanina ou Ayarina, pertencentes a classe dos flavonoides.

Uma análise do perfil cromatográfico o extrato aquoso das folhas de *V. multispicata* demonstrou a existência de três compostos predominantes, apesar de ainda não terem sido caracterizados e isolados. Lopes (2017) também apresentou em seus estudos dados espectrais que apontam uma grande variedade de compostos flavonoides, como quercetina 3-O- rutinosideo, flavona, flavonol dimetilado, ayarina e retusina no extrato aquoso das folhas.

#### 2.5.2.2 Atividade biológica

Tradicionalmente as folhas de *V. multispicata* são usadas em forma de xaropes e chás pela população para tratamento de tosse, bronquite, asma, resfriado e contusões, apoiado pela sabedoria e experiência adquirida ao longo dos anos, porém sem estudos que comprovem sua segurança e eficácia. Os poucos estudos já realizados revelaram atividades biológicas antiandrogênica da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas com inibição de 73% frente à testosterona 5- $\alpha$ - redutase e efeito antioxidante do extrato acetônico das folhas de *V. multispicata* com inibição de formação de radicais livres (AMOROZO e GÉLY, 1988; KUROYANAGI et al, 2001, 2003; CORREIA DA SILVA et al, 2010).

Lopes (2017) a partir do extrato aquoso das folhas *V. multispicata* realizou ensaios biológicos de toxicidade oral aguda e atividade inflamatória em animais, como resultado o extrato das folhas apresentou um perfil de baixa toxicidade por via oral e potente efeito anti-inflamatório e antiedematogênico com provável ação de flavonoides. Outro estudo realizado apresentou um redução no número de contorções abdominais pelo extrato etanólico e frações das folhas, demonstrando uma potencial atividade analgésica da planta (Vaz et al, 2015).

Apesar do gênero *Varronia* P. Browne ser conhecido pela presença de uma variedade de metabólitos secundários, a *V. multispicata* atua predominante como rica fonte de terpenoides e flavonoides. Recentemente as atividade anti-inflamatória e antiedematogênica foram descritas para espécie. No entanto, os efeitos sobre o processo de cicatrização de feridas na pele e a toxicidade dérmica aguda e celular ainda não foram relatados para essa espécie.

Partindo do conhecimento tradicional e científicos que atribuem propriedades farmacológicas e somando-se a carência de estudos que comprovem de forma efetiva sua atividade biológica, o presente trabalho buscou investigar o potencial do extrato aquoso das folhas de *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi como agente terapêutico alternativo e seguro no tratamento tópico de ferida.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar a citotoxicidade e toxicidade dérmica aguda do extrato aquoso das folhas de *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi (VAR01), seus efeitos sobre processo de cicatrização *in vitro* e *in vivo* e atividade antimicrobiana.

#### 3.2 Específicos

Estudo *in vitro*:

- Avaliar o efeito do VAR01 sobre a viabilidade de fibroblastos murinos em cultura;
- Verificar o efeito do VAR01 sobre a contração da lesão em modelo de cicatrização *in vitro*;
- Avaliar a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do VAR01 contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Estudo *in vivo*:

- Verificar a toxicidade dérmica aguda do VAR01 em ratos;
- Avaliar o efeito do VAR01 sobre o processo de cicatrização em camundongos.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Formulação do extrato aquoso de *V. multispicata***

#### **4.1.1 Obtenção do material vegetal**

Foram coletadas folhas da *V. multispicata* em janeiro de 2013 no município de Castanhal – PA nas coordenadas 01°18'25.63" de latitude e 47°45'18.01" de longitude, obtidas pelo aparelho de GPS (Global Positioning System). O material foi identificado pela especialista botânica Silvane Tavares do Herbário da Embrapa Amazônia Oriental. A exsicata foi depositada sob registro IAN-188979.

#### **4.1.2 Preparo do extrato aquoso das folhas da *V. multispicata***

O preparo do VAR01 foi realizado pelo Laboratório de Cromatografia Líquida (LABCROL) da UFPA. As folhas foram lavadas em água corrente e secadas na estufa com fluxo de ar forçado (45 °C) no período de 72 horas. Após a secagem o material foi pulverizado em moinhos de faca e obtido 200g de material pulverizado.

O material resultante foi submetido a infusão em 2 litros de água destilada à 100 °C durante 30 minutos, em seguida filtrado e liofilizado (1 mba / -20 °C), obtendo-se 18 g de VAR01, correspondendo a um rendimento de 9%.

#### **4.1.3 Preparo do creme para administração tópica**

O VAR01 foi incorporado à forma farmacêutica creme para favorecer sua administração tópica. O creme foi produzido na farmácia magistral Homeofarma® na concentração de 10% e sua composição está apresentada na tabela 2. A base do creme foi utilizada como controle negativo.

## 4.2 Ensaio *in vitro*

### 4.2.1 Cultivo e manutenção dos fibroblastos

Os fibroblastos murinos de linhagem BALB/c 3T3, clone A31, provenientes do Banco de Células do rio de Janeiro, Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (BCRJ: 004, lote 001183), foram cultivados em meio DMEM suplementado com soro bovino fetal (SBF) a 10% e mantidos em estufa a 37% em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, até que atingissem 80% ou mais de confluência.

Atingida a confluência, as células foram submetidas a ação da tripsina para remoção das células aderidas a garrafa de cultura, sendo primeiramente lavadas com PBS 1x e, logo depois, adicionada tripsina a 0,05% por um minuto à 35°C na estufa de CO<sub>2</sub> até que houvesse desprendimento das células da parede da garrafa de cultura. A ação da tripsina foi neutralizada com meio DMEM com 10% de SBF.

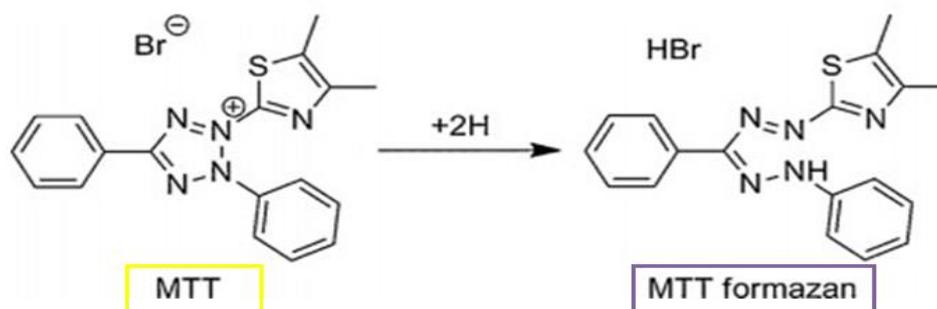
O conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo de 15 mL e centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas duas vezes com PBS para remover a tripsina e, posteriormente, as células foram ressuspensas em meio suplemento com SBF para posterior cultivo nas concentrações adequadas para cada experimento.

### 4.2.2 Determinação da viabilidade celular

A avaliação de viabilidade celular foi realizada através do teste Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) {*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]*}, em fibroblastos murinos da linhagem BALB/c 3T3. O ensaio baseia-se em analisar o dano induzido pela droga em estudo no metabolismo celular, através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais presentes em células metabolicamente viáveis. As desidrogenases mitocondriais reduzem o MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração violeta e insolúvel em água). A redução do MTT a formazan, é

diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (FIGURA 6).

**Figura 6** - Redução do MTT em formazan.



**Fonte:** adaptado de GRELA, 2018

Para tanto, os fibroblastos foram cultivados em placa de 96 poços na concentração de  $3 \times 10^3$  células/mL com meio DMEM (Meio Dulbecco Eagle Modificado), suplementado com 5% de SBF (Soro Bovino Fetal). Após 24h, quando as células se encontravam aderidas à placa, procedeu-se o tratamento com diferentes concentrações do VAR01 (15,625; 31,125; 62,25; 125; 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24h e 48h em estufa à  $37^\circ\text{C}$ .

Findados os intervalos de tratamento, os sobrenadantes foram retirados dos poços e foi adicionado 100 $\mu\text{L}$  de MTT (0,5 mg/mL). A seguir, as placas foram incubadas por 3 horas ( $37^\circ\text{C}$ ; atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ ). Após a incubação, foi retirado o sobrenadante e adicionado 200  $\mu\text{L}$  Dimetil Sulfóxido (DMSO) em cada poço, com agitação por 5 minutos, para solubilização dos cristais de formazan (RANZATO et al., 2009).

Em seguida, foi realizada a leitura da solução resultante em leitor de ELISA (BIO-RAD Model 450 Microplate Reader) em um comprimento de onda de 550 nm. Como controle de morte celular, as células foram mortas com solução de formol a 10% (100 $\mu\text{L}$ ).

### 4.2.3 Cicatrização *in vitro*

Os fibroblastos foram semeados em placas de 96 poços e lavados com uma solução de PBS para remover possíveis detritos. Com uma ponteira de 1 mL foi realizado uma ranhura mimetizando a lesão *in vitro* (Fronza et al., 2009 adaptado). Após as lesões, as células foram lavadas novamente com PBS para retirada de fragmentos celulares. Em seguida as células foram tratadas com VAR01 nas concentrações de 31,125; 62,25; 125 µg/mL ou SBF.

As imagens das lesões foram obtidas, em microscópio óptico Axiovert 25, nos tempos (hora) Tempo<sub>0</sub>, Tempo<sub>24</sub>, Tempo<sub>48</sub> e Tempo<sub>72</sub> e a área da lesão foi medido através do programa ImageJ, sendo utilizando a fórmula 1, adaptada de Yue et al., 2010 para calcular a contração da área.

Fórmula:

$$\% \text{ área} = \frac{AT_0 - AT_f}{AT_0} \times 100\% \quad (1)$$

AT<sub>0</sub>: Área da lesão inicial

AT<sub>f</sub>: Área da lesão final

### 4.2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

#### 4.2.4.1 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados na atividade antibacteriana foram caldo Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar Manitol (HIMEDIA, Índia), ágar Cetrimide (HIMEDIA, Índia), ágar Sangue (HIMEDIA, Índia) e ágar MacConkey. Estes meios foram preparados a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante.

#### 4.2.4.2 Cepas dos micro-organismos testados

Os micro-organismos utilizados para a realização da pesquisa foram cepas de bactérias de referência ATCC (American Type Culture Collection): *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 8789, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

As cepas ATCC foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro). As bactérias foram mantidas em tubo inclinado com ágar nutriente a temperatura ambiente, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Farmácia da UFPA.

#### 4.2.4.3 Preparo das concentrações das soluções

A preparação das soluções seguiu os critérios adotados por Allegrini et al (1973) e Brazão et al (2014) com adaptações. Foram pesados em um tubo eppendorf estéril 0,002 g dos compostos, em seguida adicionou-se 100 µl de DMSO para solubilizar e 900 µl de solução salina 0,9%, obtendo-se uma solução mãe de 2mg.mL<sup>-1</sup>. Para o ensaio antimicrobiano, o extrato foi utilizado nas seguintes concentrações: 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.4.4 Preparo do inóculo bacteriano

As bactérias foram previamente semeadas em placas de Petri contendo o meio ágar Mueller-Hinton, assim como em meio de cultura específico para cada bactéria. Em seguida, foram incubadas a 35°C em estufa por 24 horas para o crescimento e posterior preparação do inóculo. A obtenção do inóculo seguiu a norma M7-A9 vol. 32 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico” - Norma Aprovada - Nona edição da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

O inóculo foi preparado a partir da retirada de três a quatro colônias da bactéria, as quais foram transferidas para um tubo contendo 5 mL do caldo Mueller-Hinton, realizando-se ajustes para o alcance da concentração desejada de 1x10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, em aparelho espectrofotômetro (sendo compatível com a

escala 0,5 de Mc Farland (0,09 a 0,11). Em seguida, a suspensão foi incubada por uma hora para alcançar o crescimento exponencial bacteriano. Logo após a incubação, diluições seriadas foram realizadas até a obtenção do inóculo  $1 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.4.5 *Concentração inibitória mínima (CIM)*

O método empregado para a avaliação da atividade antimicrobiana foi a microdiluição em caldo, descrito conforme a norma M7-A9 (vol. 32 nº 2) da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). As diluições do extrato foram preparadas conforme descrito anteriormente. Assim, na placa de microdiluição de 96 poços (Corning), adicionou-se 100µl do inóculo + 100µl de cada concentração dos compostos. O controle positivo recebeu 100µl do inóculo + 100µl do cloranfenicol (250 µg.ml<sup>-1</sup>, Ariston) para bactérias gram-positivas ou Penicilina+estreptolisina (10000unit/10mg, Ariston) para bactérias gram-negativas. O controle negativo foi composto por 100µl do inóculo + 100 µl do DMSO a 10% (Interlab) e o controle do inóculo 100µl do inoculo + 100 µl do caldo M. Hinton, obtendo-se um volume final de 200µl em todos os poços. A incubação da placa ocorreu à temperatura de 35° C por 24 horas, sendo o experimento realizado em duplicata.

Após esse período foi adicionado a cada poço 30µl de resazurina 0,01% (Sigma Aldrich, Brasil), incubando-se novamente a placa por três horas. A resazurina é um corante de coloração azul, utilizado como indicador devido sua reação de óxido-redução passando de resazurina a resofurina, indicando a presença de células viáveis através da mudança de cor (cor azul para rosa) considerando-se a manutenção da coloração azul como ausência de crescimento (CLSI, M7-A9, 2012).

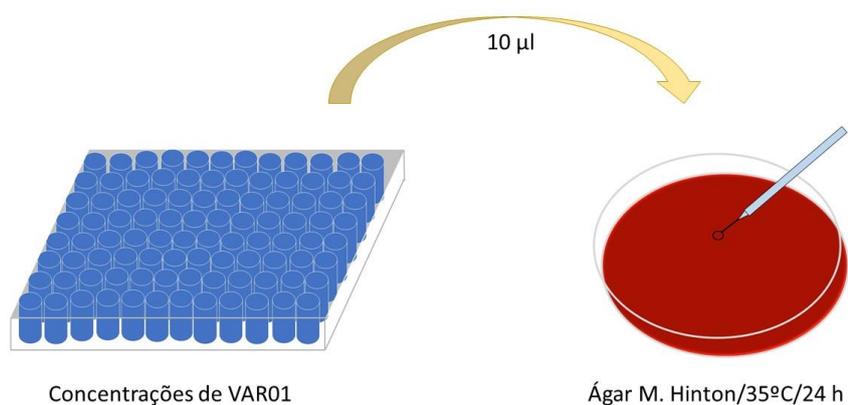
#### 4.2.4.6 *Concentração bactericida mínima (CBM)*

A CBM representa a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um micro-organismo em teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo sob condições conhecidas (QUADROS et al, 2011). Dessa forma, a CBM foi obtida pelo método de semeadura, retirando-se uma alíquota de 10 µL do conteúdo dos poços,

seguidas de espalhamento em placas de Petri previamente preparadas com ágar M. Hinton e incubadas em estufa a 35°C por 24 h (FIGURA 7).

Posteriormente as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas, na qual a CBM foi considerada a menor concentração dos compostos que resultou em ausência de crescimento ou o aparecimento de menos de três colônias, eliminando 99,9% dos micro-organismos (QUADROS et al, 2011).

**Figura 7** - Distribuição das concentrações de VAR01 na microplaca para ensaio da CBM.



**Fonte:** do autor.

### 4.3 Ensaios *in vivo*

#### 4.3.1 Animais

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (UFPA) sob o parecer CEUA nº 8678120917 (ANEXO A). Foram utilizadas fêmeas da espécie *Rattus norvegicus* (*Wistar*, n=24), pesando entre 150 e 200g para o ensaio de toxicidade dérmica aguda e fêmeas *Mus musculus* (*swiss*, n=48), com peso de 27-30 g para o ensaio de cicatrização. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas e alocados no Biotério da Faculdade de Farmácia da UFPA. Os animais foram mantidos sob condições padronizadas de temperatura (25 °C), exatidão, ciclo claro/escuro de 12 horas (claro: 7–19 horas), água e ração *ad libitum*.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento da Faculdade de Farmácia, sendo obedecido os critérios e as normas estabelecidas pelo Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais.

#### 4.3.2 Avaliação da toxicidade dérmica aguda

A investigação da toxicidade dérmica aguda (TDA) seguiu a metodologia preconizada pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) nº 402/2017. Para a realização do teste, os ratos foram anestesiados com cetamina e xilazina (90 mg/kg e 10 mg/kg, i.p.), posteriormente, cada animal teve 10% da superfície dorsal depilada, sendo então colocados em gaiolas individuais, com o propósito evitar contaminação cruzada.

Após 24h foi aplicado uniformemente sobre a região depilada o volume de 200 µl ou 400 µl do veículo de dissolução ou solução de VAR01 em concentrações graduadas de 10% (100 mg/ml), 20% (200 mg/ml) e 100% (1000 mg/ml) conforme a OECD - nº 402/2017 (TABELA 2).

**Tabela 2** - Divisão de grupos experimentais para avaliação da toxicidade dérmica aguda.

GRUPO	TRATAMENTO	NÚMERO
<b>Controle</b>	Aplicação tópica de solução salina 0,9% - 200 µL	06
<b>Tratado I - 100 mg</b>	Aplicação tópica de 200 µl de VAR01 (100 mg/mL)	06
<b>Tratado II - 200 mg</b>	Aplicação tópica de 200 µl de VAR01 (200 mg/mL)	06
<b>Tratado III - 1000 mg</b>	Aplicação tópica de 400 µl de VAR01 (500 mg/mL)	06

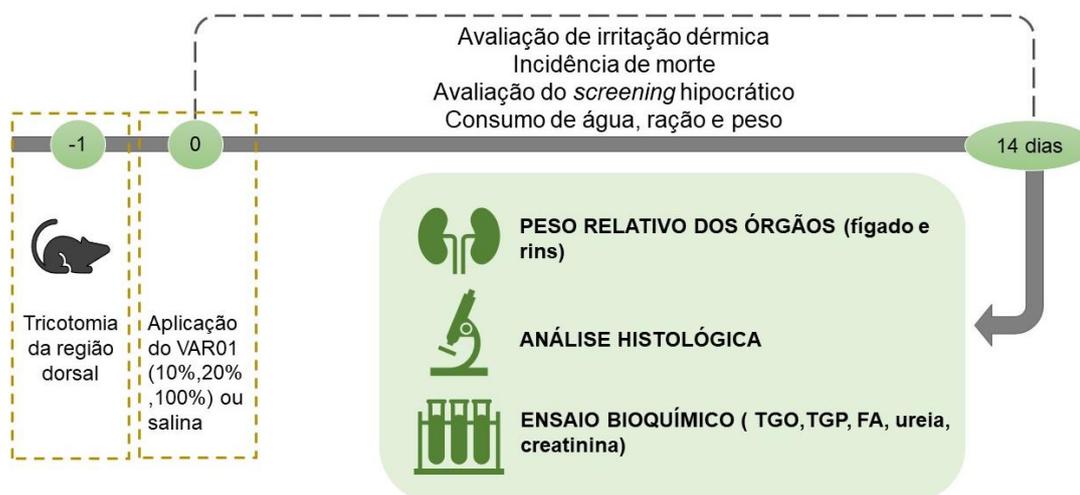
Fonte: do autor

Após o tratamento, os animais foram observados uma vez ao dia durante 14 dias. Nesse período foi observado os parâmetros hipocráticos tais como alterações na locomoção, frêmito vocal, agressividade, atenção, lacrimação, força de agarrar, ataxia, tremores, convulsões, hipnose, anestesia, piloereção, cianose, salivação e secreção nasal (MALONE, 1983).

Além disso, foram observadas as ocorrências de alterações na região depilada, como eritema, descamação e crescimento do pelo. Os resultados

seguiram uma escala de 0 a 4 e foram discriminados em ausente (0), raro (1), pouco (2), moderado (3) e intenso (4). Foi avaliado diariamente o consumo hídrico, a ingesta de ração e o peso corpóreo (FIGURA 8).

**Figura 8** - Ilustração da linha do tempo de toxicidade dérmica aguda.



**Fonte:** do autor

Ao final do período de avaliação, os animais foram sacrificados por descolamento cervical sendo realizada a coleta das amostras biológicas de sangue por punção cardíaca para análises bioquímicas, e do fígado, rins e pele. Os órgãos foram avaliados quanto ao peso relativo calculado de acordo com a fórmula 2.

Fórmula:

$$Pr = \frac{Po (g)}{Pc (g)} \times 100 \quad (2)$$

Pr – Peso relativo;  
Po – Peso do órgão em gramas;  
Pc – Peso corporal em gramas.

Após a coleta das amostras, as carcaças dos animais foram descartadas em sacos plásticos brancos de risco biológico e encaminhado à empresa terceirizada responsável pelo Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde (PGRSS).

#### 4.3.2.1 *Ensaio bioquímicos*

As amostras de sangue foram armazenadas em tubos contendo gel e centrifugadas durante 5 minutos a 3.500 rpm. Em seguida o soro sanguíneo foi transferido para frascos do tipo eppendorf e armazenado a -20 °C. O soro foi usado para determinar a concentração de creatinina, ureia, fosfatase alcalina (FA), gama glutamiltransferase (Gama-GT), aspartato aminotransferase (TGO) e alanina aminotransferase (TGP).

Os ensaios foram realizados utilizando os Kits comerciais ELITech® (Creatinina, Ureia) e Vida biotecnologia® (TGO, TGP, FA, Gama-GTlistar), de acordo com as instruções da bula. A leitura foi feita no aparelho semiautomático Microlab 300 em um  $\lambda = 505 \text{ nm}$ .

#### 4.3.2.2 *Avaliação histológica*

A análise macroscópica e microscópica foi realizada no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia, com objetivo de verificar possíveis alterações nos tecidos dos órgãos coletados.

As secções dos órgãos foram produzidas contemplando a região central e periférica dos órgãos, sendo fixados em formol tamponado 10% por 24h e depositadas em cassetes. O material foi processado de acordo com o método histológico convencional descrito por Luna (1968).

As amostras foram desidratadas por imersão em séries crescentes de etanol (50, 70, 90 e 100%), diafanizadas em xilol e depois incluídas em blocos de parafina. Utilizando-se um micrótomo rotativo com navalhas descartáveis, foram produzidas secções de 5  $\mu\text{m}$ .

Estes cortes foram posicionados em lâminas e corados pela técnica de hematoxilina-eosina. A seguir foi feita a finalização com montagem com aplicação de resina acrílica Entellan® e lamínula. A leitura histológica das lâminas foi realizada em microscópio óptico, em objetivas de 10x e 40x pelo patologista do Laboratório de Patologia da UFRA.

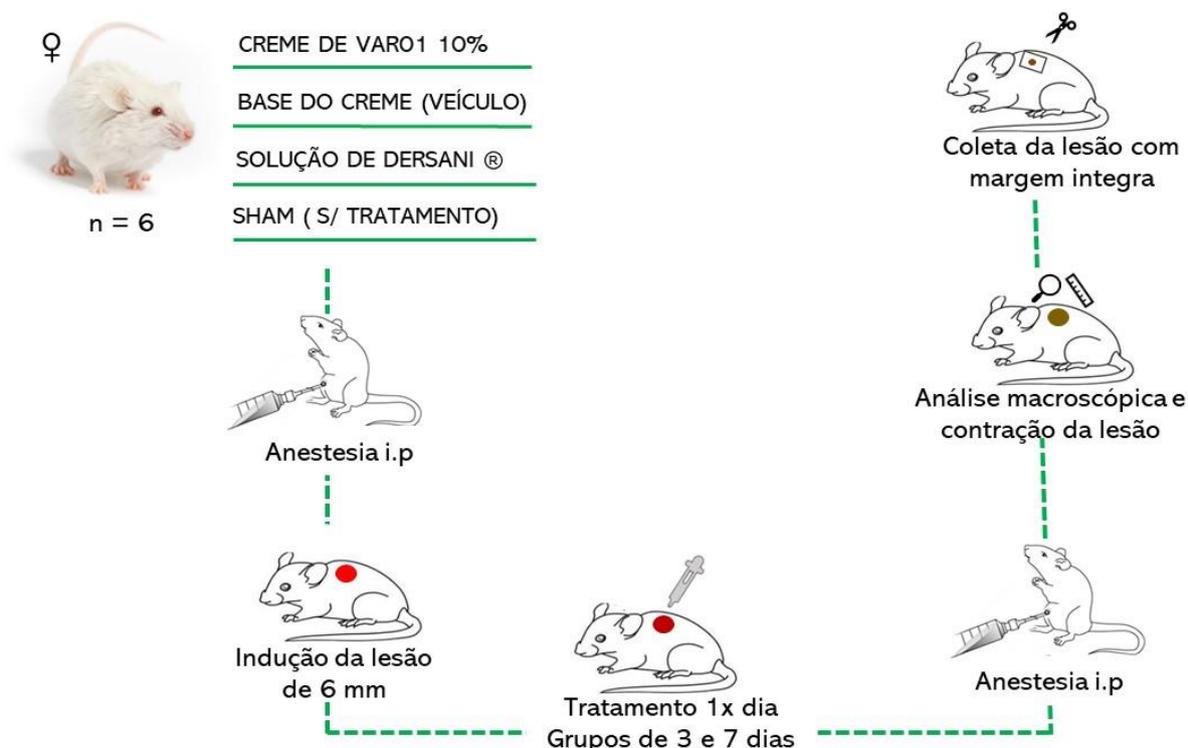
### 4.3.3 Cicatrização *in vivo*

#### 4.3.3.1 Procedimento cirúrgico

De acordo com o protocolo proposto por Cross (1995), os camundongos foram inicialmente anestesiados (cetamina 90 mg/kg + xilazina 10 mg/kg; i.p.), sendo então realizada a tricotomia no dorso superior do animal. Na região depilada foram produzidas feridas através da rotação da borda cortante de um *punch* (d = 6 mm). O fragmento de pele seccionado foi retirado com auxílio de tesoura e pinça cirúrgica até a exposição da fáscia muscular dorsal.

Posteriormente, os animais foram alocados individualmente em gaiolas plásticas, com objetivo de evitar contaminação cruzada. Nenhum analgésico ou curativo foram aplicados aos animais no período pós-operatório. Os animais foram submetidos ao tratamento tópico diário por um período de 3 e 7 dias (FIGURA 9).

**Figura 9** -Delineamento do experimento *in vivo*.



Fonte: do autor

#### 4.3.3.2 Grupos experimentais

Para esse trabalho os camundongos foram divididos em 4 grupos:

- **Grupo 1 (VAR01 10%)** – animais receberam tratamento tópico do creme na concentração 10% de *V. multispicata* /excisão/dia – 6 animais.
- **Grupo 2 (Controle negativo)** – animais receberam tratamento com a base do creme (veículo)/excisão/dia– 6 animais.
- **Grupo 3 (controle positivo)** – animais receberam tratamento com solução de Dersani®/excisão/dia – 6 animais.
- **Grupo 4 (SHAM)** – animais não receberam nenhum tratamento – 6 animais.

#### 4.3.3.3 Análise macroscópica e contração da lesão

Os camundongos foram avaliados diariamente, sendo registradas as possíveis alterações da área da lesão, observando-se aspectos como: crosta, necrose, hiperemia, exsudação e reepitelização.

A área da lesão foi verificada diariamente com auxílio de um paquímetro universal, foram calculados a área da lesão de acordo com a fórmula 3. A lesão foi fotografada (Câmera digital - Nokia XL 650, 12 megapixels) com auxílio de um padrão de escala métrica. O grau de contração da ferida foi calculado de acordo com a fórmula 4 (RAMSEY et al., 1995).

Fórmulas:

$$A = \pi \cdot r_1 \cdot r_2 \quad (3)$$

A – área da lesão;  
 $r_1$  – crânio-sacral (raio);  
 $r_2$  – látero-lateral (raio).

$$GC = \frac{A_i - A_x}{A_i} \times 100 \quad (4)$$

GC – Grau de contração;  
 $A_i$  – Área de lesão inicial;  
 $A_x$  – Áreas dos dias subsequentes

#### **4.4 Análise estatística**

Inicialmente a normalidade dos dados foi verificada pelo método de Kolmogorov-Smirnov. Para as amostras com distribuição gaussiana, as diferenças entre os grupos foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) de uma via ou ANOVA de mensurações repetidas (RM) de acordo com a natureza dos dados, seguida do pós-teste de Dunnett. Nos demais casos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns. Foram consideradas significativas as diferenças cuja probabilidade de nulidade foi menor que 5% ( $P < 0.05$ ). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) das amostras.

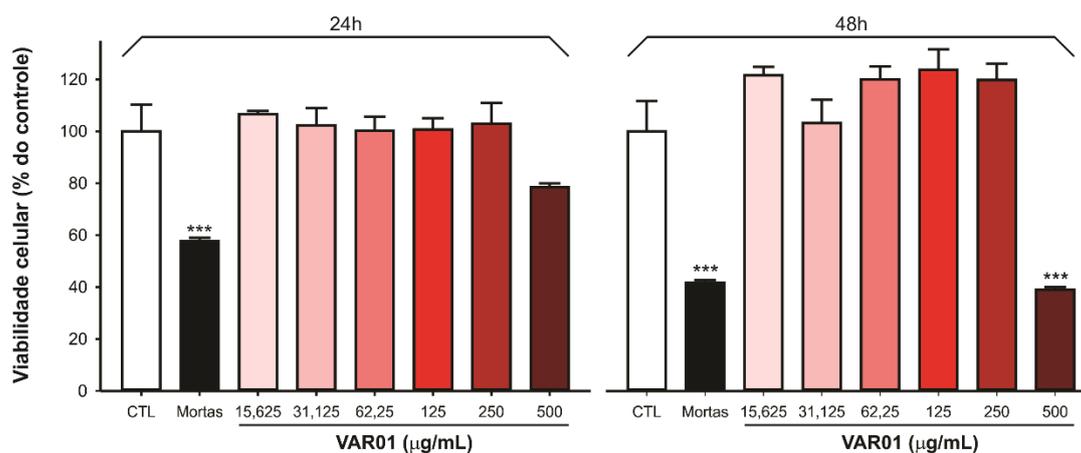
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaios *in vitro*

#### 5.1.1 VAR01 apresenta baixa citotoxicidade

O tratamento das culturas de fibroblastos murinos (linhagem BALB/c 3T3) com VAR01 (15,625; 31,125; 62,25; 125; 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ) não promoveu redução na viabilidade celular no intervalo de 24h (figura 10). Na avaliação após 48h de tratamento, somente a maior concentração (500  $\mu\text{g/mL}$ ) promoveu redução significativa ( $p < 0,001$ ; ANOVA-Dunnett) das células viáveis em relação ao grupo controle (FIGURA 10).

**Figura 10** – Efeito do extrato aquoso de *V. multispicata* (15,625; 31,125; 62,25; 125; 250; 500  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre a viabilidade celular de fibroblastos murinos 3T3 no período de 24h e 48h. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*\*\* $p < 0,001$  versus controle (CTL). ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett.



Fonte: do autor

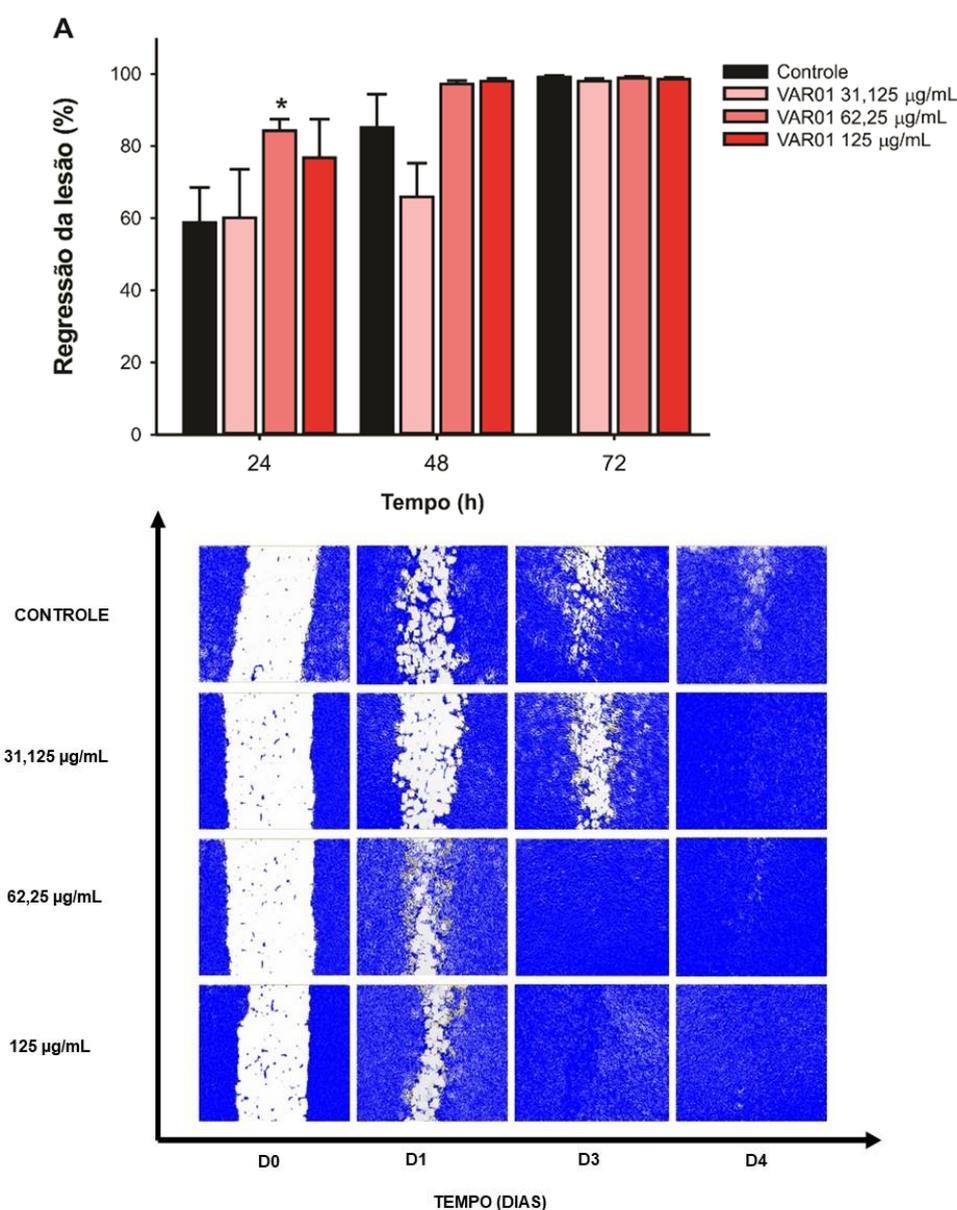
#### 5.1.2 VAR01 melhora o fechamento das lesões *in vitro*

Para o ensaio de cicatrização em cultura de fibroblastos murinos foram selecionadas as concentrações de 31,125  $\mu\text{g/mL}$ , 62,25  $\mu\text{g/mL}$  e 125  $\mu\text{g/mL}$  do VAR01, visto que não promoveram efeitos nocivos às células no ensaio de citotoxicidade.

Ao avaliar a área de lesão após 24h do tratamento, verificou-se que as culturas tratadas com VAR01 na concentração de 62,25  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram

regressão significativamente superior (84,25%;  $p=0,023$ ; ANOVA-Dunnett) às culturas controle (58,80%). Na avaliação após 48h as culturas tratadas com VAR01 nas concentrações de 62,25  $\mu\text{g/mL}$  e 125  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram fechamento completo da lesão, isto é, 100% de regressão, enquanto o grupo controle apresentou uma média de 82,22. Por fim, na avaliação após 72h verificou-se que todos os grupos alcançaram plena regeneração (FIGURA 11).

**Figura 11** - Efeito do extrato aquoso de *V. multispicata* (31,125, 62,25 e 125;  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre a regressão da lesão em cultura de fibroblastos murinos nos períodos de 24h, 48h e 72h. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 6 culturas. \* $p<0,05$  versus controle (CTL). ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett.



Fonte: do autor

### 5.1.3 VAR01 não apresenta atividade antimicrobiana *in vitro*

No ensaios de microdiluição, o extrato aquoso de *V. multispicata* (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg.mL<sup>-1</sup>) não apresentou ação antimicrobiana frente às bactérias *S. aureus*, *E. fecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* nos ensaios de CIM e CBM, com possível ação bacteriana em concentrações maiores que 1mg. (TABELA 3).

**Tabela 3** - Resultado da atividade antimicrobiana de cepas bacterianas ATCC.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CEPAS ATCC CIM E CBM mg.mL <sup>-1</sup>								
Compostos	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus fecalis</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
VAR01	>1mg	>1mg	>1mg	>1mg	>1mg	>1mg	>1mg	>1mg

Fonte: do autor.

## 5.2 Ensaio *in vivo*

### 5.2.1 VAR01 possui baixa toxicidade dérmica aguda

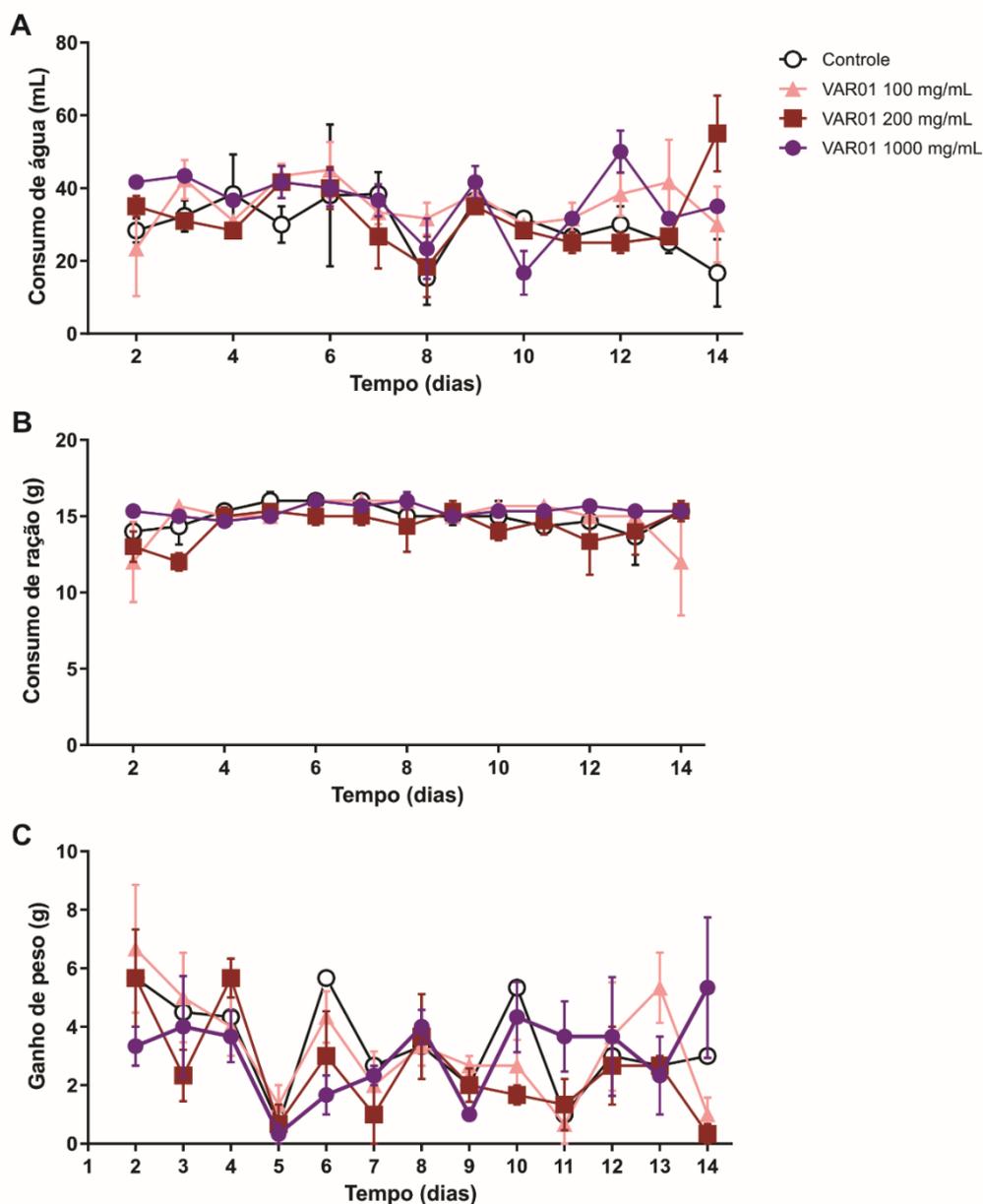
#### 5.2.1.1 Avaliação hipocrática

Não foram observadas alterações comportamentais ou óbitos entre os animais tratados topicamente com VAR01 (100, 200 ou 1000 mg/ml) durante os 14 dias de avaliação.

#### 5.2.1.2 Consumo hídrico e de ração e ganho de peso

O tratamento tópico agudo com VAR01 (100, 200 e 1000 mg/ml) não alterou significativamente a ingestão de água ou de ração dos animais, conservando padrões equivalentes ao grupo controle (FIGURA 12A e B) durante os 14 dias de avaliação. De forma semelhante, os animais tratados com VAR01 apresentaram ganho ponderal equivalente aos animais controle (FIGURA 12C).

**Figura 12** - Efeito do tratamento dérmico agudo com extrato aquoso de *V. multispicata* (100, 200 e 1000 mg/mL) sobre o (A) consumo de água e (B) de ração, e sobre o (C) ganho de peso nos 14 dias subseqüentes a administração. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=6/grupo). RM ANOVA, seguida do teste de Dunnett.



Fonte: do autor.

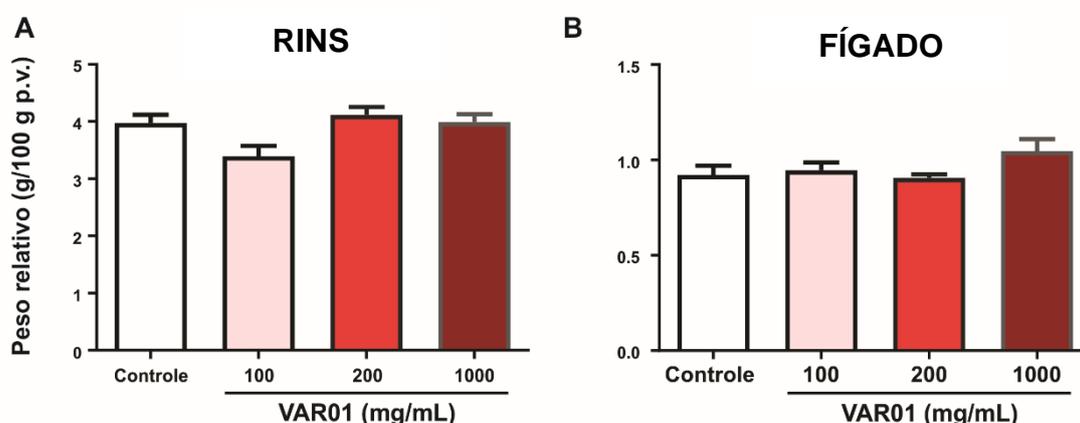
### 5.2.1.3 Avaliação de irritação dérmica

Não foram observadas evidências de toxicidade/irritação sobre a pele onde foi aplicado o VAR01 (100, 200 ou 1000mg/mL), evidenciando relativa segurança para os ensaios de cicatrização *in vivo*, para os quais foi adotada a dose inicial correspondente a 10% da concentração máxima testada, ou seja, 100 mg/ml.

#### 5.2.1.4 Peso relativo dos órgãos

Voltada a avaliação das repercussões sistêmicas do uso dérmico da droga, a verificação dos pesos relativos dos rins (FIGURA 13A) e do fígado (FIGURA 13B), ao final dos 14 dias de acompanhamento, revelou que o tratamento tópico com VAR01 (100, 200 ou 1000 mg/mL) não promove alterações significativas sobre esta variável quando comparado ao grupo controle.

**Figura 13** - Efeito do tratamento dérmico agudo com extrato aquoso de *V. multispicata* (100, 200 ou 1000 mg/mL) sobre o peso relativo (A) dos rins e (B) do fígado 14 dias após a administração. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m, (n=6/grupo). ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett.



**Fonte:** do autor.

#### 5.2.1.5 Avaliação histológica dos órgãos

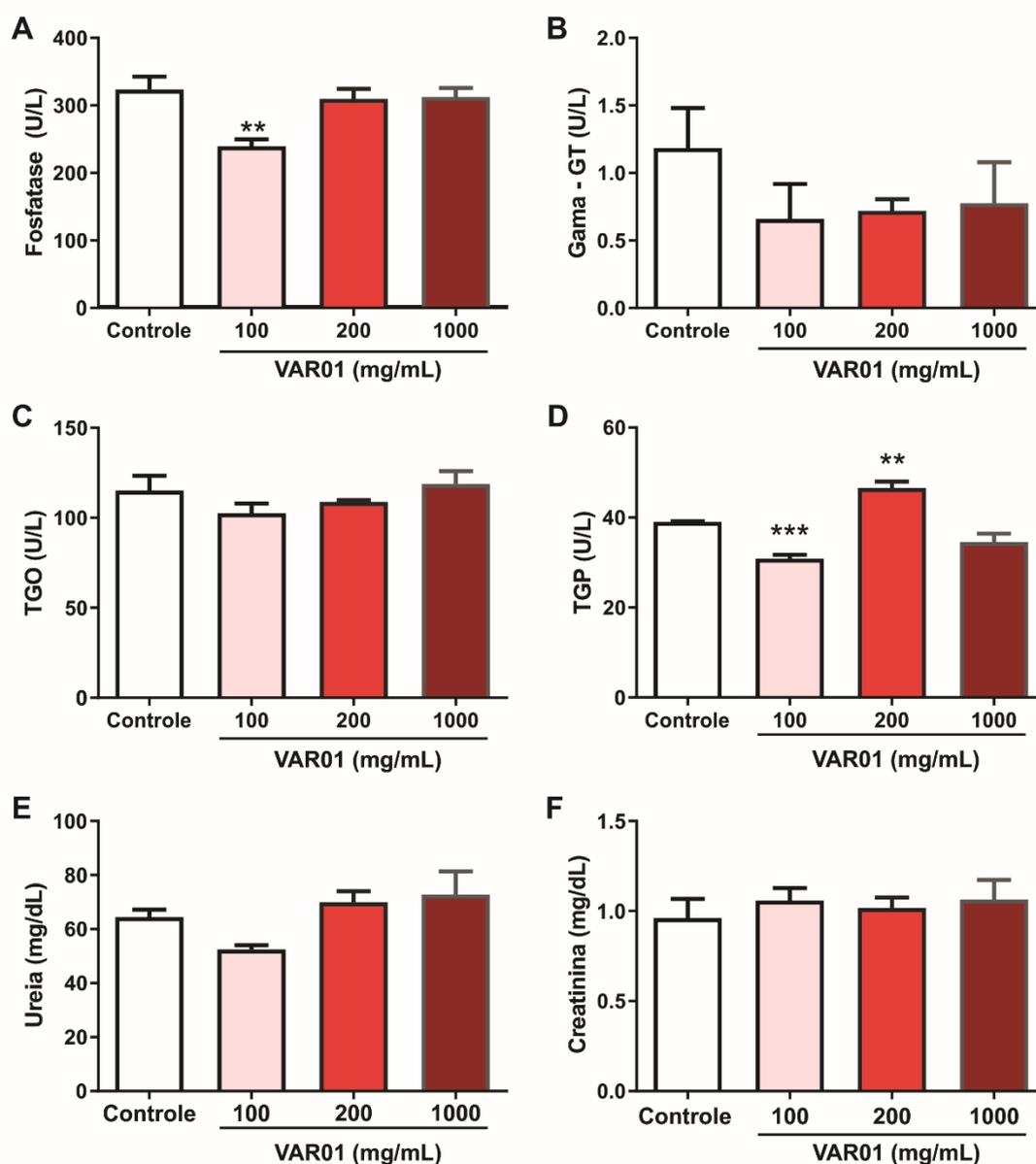
A análise microscópica das amostras de pele, rins e fígado evidenciou normalidade histológica tanto entre os animais controle quanto para aqueles receberam aplicação dérmica de VAR01 (100, 200 ou 1000 mg/mL).

#### 5.2.1.6 Avaliação dos marcadores bioquímicos de função hepática e renal

Com relação aos marcadores de função hepática, isto é, FA (FIGURA 14A) GGT (FIGURA 14B), TGO (FIGURA 14C) e TGP (FIGURA 14D), apenas foi observada redução nos níveis séricos de FA ( $p < 0,01$ ; ANOVA-Dunnett; FIGURA 14A) e TGP ( $p < 0,001$ ; ANOVA-Dunnett; FIGURA 14D) no grupo tratado com

VAR01 na concentração de 100 mg/mL, quando comparado ao controle. No grupo tratado com a concentração de 200 mg/mL de VAR01, por outro lado, verificou-se a elevação dos níveis séricos de TGP em relação ao controle ( $p < 0,01$ ; ANOVA-Dunnett). Não foram observadas alterações significativas nos marcadores de função renal, isto é, ureia (FIGURA 14E) e creatinina (FIGURA 14F).

**Figura 14** - Efeito do tratamento dérmico agudo com extrato aquoso de *V. multispicata* sobre os níveis séricos de (A) Fosfatase alcalina, (B) Gama glutamil-transferase, (C) Aspartato aminotransferase, (D) Alanina aminotransferase, (E) Ureia e (F) Creatinina após 14 dias da administração. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m, ( $n=6$ /grupo). \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  versus controle. ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett.



Fonte: do autor.

## 5.2.2 VAR01 melhora o processo de cicatrização em camundongos

### 5.2.2.1 Avaliação da redução da área de lesão

O tratamento tópico das lesões induzidas no dorso dos animais com o creme do VAR01 10% promoveu ganhos significativos sobre a regressão da área de lesão (FIGURA 15). Após 3 dias de acompanhamento, os animais tratados com VAR01 apresentaram contração da lesão cerca de 13,24% superior à dos animais do grupo Sham ( $p=0,04$ ; ANOVA-Dunnett) e 18,77% em relação ao grupo controle ( $p=0,003$ ; ANOVA-Dunnett). O Dersani, por sua vez, promoveu contração da lesão 35,65% superior ao grupo Sham ( $p<0,001$ ; ANOVA-Dunnett; FIGURA 15A).

Após 7 dias de acompanhamento os animais tratados com creme do VAR01 10% apresentaram uma média de contração de lesão 22,5% superior ao grupo Sham ( $p=0,006$ ; ANOVA-Dunnett), 18,33% em relação ao grupo controle ( $p=0,028$ ; ANOVA-Dunnett). Seu efeito foi ainda equivalente ao da droga padrão (Dersani), cuja média de efeito foi 22,16% superior ao grupo Sham ( $p=0,003$ ; ANOVA-Dunnett; FIGURA 15A).

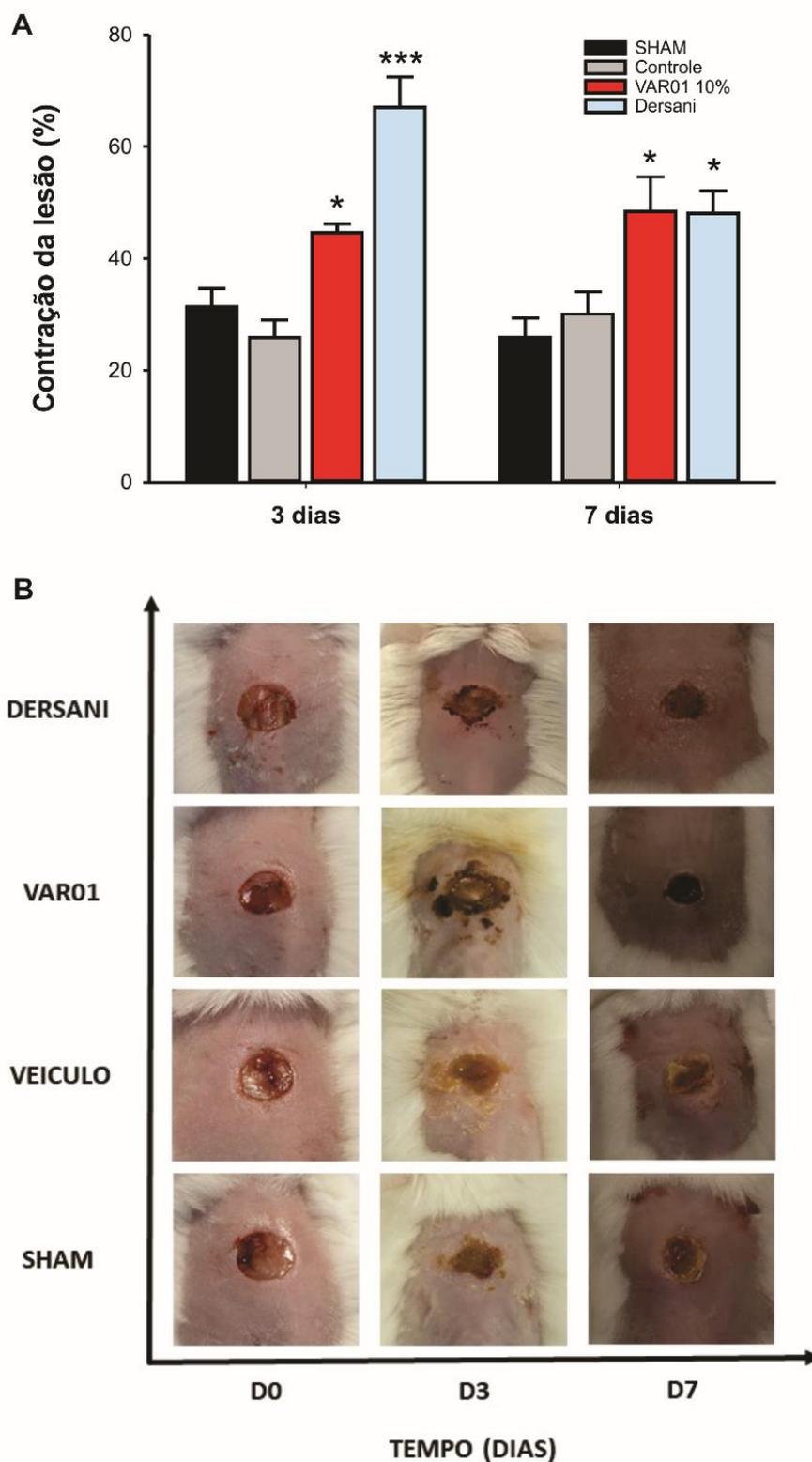
### 5.2.2.2 Avaliação macroscópica da lesão

Após 3 dias de acompanhamento, os animais tratados com creme do VAR01 10% apresentaram crosta de bom aspecto, sem necrose e uma discreta exsudação. O grupo controle apresentou crosta bem definida com hiperemia e exsudação moderadas.

No 7º dia de acompanhamento todos os grupos apresentaram formação de crosta exuberante, sem presença de tecido necrosado. O grupo tratado com creme do VAR01 10% a presença de secreção foi rara e ausente, confirmando a eficácia do tratamento.

Até o 7º dia ainda não foi possível identificar reepitelização em nenhum grupo. Isto pode ocorrer devido a lacuna da ferida à ser preenchida é extensa, deixando a epitelização mais lenta (FIGURA 15B).

**Figura 15** - Efeito do tratamento por 3 e 7 dias com creme do VAR01 10% sobre o processo de cicatrização em camundongos. (A) Taxa de contração da lesão. (B) Fotos das lesões nos dias 0, 3 e 7, a partir da formação da lesão. Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  versus sham. ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett.



Fonte: do autor.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra pela primeira vez que o extrato aquoso de *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi apresentou baixa citotoxicidade contra fibroblastos murinos (*in vitro*), evidenciada pela inocuidade das concentrações de 15,625–250 µg/mL do extrato após 48h de exposição, assim como não atuou com efeito antibacteriano frente as cepas testadas. O extrato evidenciou ausência de mortes e prejuízos comportamentais, sem danos histológicos e bioquímicos na toxicidade dérmica aguda (*in vivo*). Demonstrou ainda que o extrato apresenta potencial cicatrizante *in vitro* e *in vivo*.

A espécie *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi é comumente utilizada em práticas terapêuticas por comunidades tradicionais para tratar contusões e doenças do trato respiratório como asma, bronquite, tosse e resfriado (AMOROZO e GÉLY, 1988). Em estudos científicos realizados por kuroyanagi (2001), Coreia da Silva (2010) e Lopes (2017) já foram descritos efeitos anti-androgênicos, antioxidante e anti-inflamatório, respectivamente.

No que tange a sua composição química, poucos estudos fitoquímicos foram realizados até o momento. No entanto, indicam a presença de classes de metabolitos secundários importantes como flavonóides e terpenóides os quais têm sido apontados como principais constituintes e são conhecidos por apresentarem atividade biológica de grande relevância (GRAÇA et al, 2010; VAZ et al, 2015; LOPES et al, 2017; KUROYANAGI et al, 2003).

O ensaio de viabilidade celular tem o potencial de rastrear compostos tóxicos e baseia-se na ideia de que estes compostos afetam as funções básicas das células. Sendo assim, testes *in vitro* podem ser um indicador sensível e confiável para detecção de citotoxicidade a partir da avaliação do dano celular. O rastreio precoce de extratos vegetais quanto ao seu grau de toxicidade pode ajudar a revelar se o composto poderá seguir para os demais testes de avaliação de atividade biológica (BARILE et al, 1994).

Verificou-se nas etapas realizadas que o extrato aquoso de VAR01 nas concentrações entre 15,625 e 500 µg/ml não gerou alteração sobre a sobrevivência celular de fibroblastos murinos no após 24h de exposição. Na avaliação após 48h de exposição, somente na concentração de 500 µg/mL que

reduziu a viabilidade celular, indicando que o extrato apresenta baixa citotoxicidade.

Os fibroblastos são células-chaves na regeneração tecidual e participantes ativos da fase de proliferação celular, isto porque estão envolvidos diretamente na migração e proliferação de células de defesa e reparo, além de promover a produção de fibras de colágeno responsáveis pela contração de feridas (ADETUTU et al, 2011).

A baixa citotoxicidade do VAR01, ou seja, a relativa ausência de prejuízo à viabilidade de fibroblastos murinos em cultura pela exposição ao extrato é um achado relevante, que fornece a segurança necessária para a avaliação de suas potenciais atividades terapêuticas, iniciada com o modelo de regressão de lesão em cultura de fibroblastos.

O modelo de cicatrização em fibroblastos é reconhecido como um método de triagem de drogas com potencial cicatrizante, visando a seleção de candidatas para a avaliação em modelos *in vivo*, além de contribuir para a redução do uso de animais em experimentação (YUE et al, 2010).

Com base nos achados, evidenciou-se o benefício gerado pelo tratamento das culturas de fibroblastos lesionadas (com ranhuras induzidas) com 62,25 µg/mL de VAR01, as quais apresentaram uma média de regressão da lesão em torno de 25,45% superior a desenvolvida pelo grupo controle nas primeiras 24 horas. Adicionalmente, verificou-se que o tratamento promoveu o pleno fechamento da lesão em 48 horas, o que para o grupo controle foi verificado somente na avaliação de 72 horas. Desta forma, nossos achados indicam uma possível aceleração na regeneração de tecido em monocamadas de células.

Entre os efeitos farmacológicos com potencial benefício para o processo cicatricial são observadas principalmente as atividades anti-inflamatória e anti-oxidante. Estudos recentes de nosso grupo têm descrito os expressivos efeitos antinociceptivo, interferindo em componentes inflamatórios da nocicepção, prevenindo a formação de edemas, a migração celular e a produção no aumento das concentrações de óxido nítrico do VAR01 (LOPES, 2017), já tendo sido também demonstradas propriedades anti-oxidantes da espécie (CORREIA DA SILVA et al, 2010). Tais evidências reforçam o potencial da droga para o tratamento de feridas.

As bactérias são distribuídas na natureza e fazem parte da microbiota da pele. Durante o processo de rompimento da integridade da camada externa da pele podem ocorrer contaminações por agentes etiológicos causadores de infecções, algumas espécies de bactérias como *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* são comumente encontradas em locais de feridas abertas, sendo responsáveis por infecções oportunistas em humanos (HOUGHTON et al., 2005).

As principais patologias descritas são infecções cirúrgicas, bacteremias, sepses, infecções purulentas como furúnculos, abscesso e carbúnculos, sendo essas últimas as mais comuns. Quando ocorre a contaminação, há formação de uma grande quantidade de exsudato e produção de toxinas, que retardam o reparo tecidual e contribui para a cronificação da ferida (HOUGHTON et al., 2005; MATIAS et al, 2013; POWERS e WARDENBURG et al, 2014).

Nesse sentido, substâncias com a capacidade de inibir localmente a proliferação bacteriana ou induzir sua morte, ao prevenir os prejuízos de uma infecção, podem promover a redução do tempo necessário a resolução da lesão (CUSHNIE e LAMB, 2005). Extratos ricos em fitocompostos como flavonoides e terpenos são relatados na literatura como principais responsáveis pela inibição bacteriana (MATIAS et al, 2013).

Diante disto, o VAR01 foi testado quanto aos seus efeitos frente a culturas de *S. aureus*, *E. fecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo verificado que, apesar de apresentar em sua composição tais componentes, não apresentou propriedades antimicrobianas, o que indica que os efeitos cicatrizantes da droga provavelmente não estão relacionados a atividade antimicrobiana.

A partir da caracterização de suas propriedades *in vitro*, o passo seguinte foi verificar a segurança para uso e atividade *in vivo*. A avaliação da TDA é delineada para identificar propriedades irritativas locais mediante o contato da droga com a pele. Permite também verificar possíveis efeitos sistêmicos (alteração comportamental, lesão de órgãos alvo, prejuízos ao desenvolvimento ou indução de óbitos), a partir da aplicação tópica, considerando uma possível absorção percutânea dos compostos testados (OECD, 2017).

Em nosso estudo, a aplicação tópica aguda do VAR01 nas concentrações testadas (100, 200 e 1000mg/ml) não promoveu irritação dérmica nos animais tratados, sugerindo a inocuidade do extrato sobre o local de administração. Com

relação a possíveis efeitos sistêmicos, o VAR01 não foi capaz de provocar morte nos animais e/ou alterações comportamentais durante os 14 dias de avaliação, o que permite classificar como uma droga segura, conforme a OECD (2017).

Além da avaliação comportamental, outros parâmetros toxicológicos como consumo hídrico, ingesta de ração e ganho de peso são importantes para prever interferências sobre o desenvolvimento ponderal e nutrição. A avaliação macro e microscópicas permite verificar a promoção de danos sistêmicos, podendo-se lançar mão de parâmetro histopatológicos e bioquímicos (TAN et al, 2013; KANDHARE et al, 2015; FARSI et al, 2016).

A aplicação tópica do VAR01 não promoveu alterações nestes parâmetros, sendo conservada a normalidade de sua nutrição. O ganho de peso dos animais tratados também seguiu um padrão equivalente aos controles. O acompanhamento destes parâmetros possibilita identificar efeitos sobre os processos de fome e saciedade, bem como interferências no aproveitamento dos nutrientes devido a alterações no trânsito gastrointestinal ou ainda a instalação de síndromes de má absorção, já que a perda significativa de peso corporal pode ser considerada um indicativo de dano animal e sinal de toxicidade evidente (JAHN e GUNZEL, 1997; KANDHARE et al, 2015).

O organismo animal possui órgãos vitais que são alvos importantes de substâncias exógenas (JOTHY et al, 2011; SALEEM et al, 2017). Neste trabalho selecionamos o fígado, visto estar intimamente relacionado ao processo de biotransformação de xenobióticos, e os rins, que são o principal mecanismo de excreção de substâncias. O tratamento com VAR01 não promoveu alterações anatômicas ou histológicas nos órgãos avaliados, reforçando o indicativo de tratar-se de uma droga de baixa toxicidade.

Em relação à biópsia realizada na pele e órgãos (fígado e rins), verificamos que os tecidos se apresentaram histologicamente normais. A integridade epidérmica e anexos cutâneos estavam preservados, não houve alterações nos hepatócitos, e os glomérulos e células epiteliais tubulares apresentaram morfologia normal.

A função destes órgãos foi então verificada através dos perfis bioquímicos séricos, que são utilizados como critérios importantes para avaliar a extensão da

homeostase ou possíveis alterações resultantes de processos patológicos (BRANCO et al, 2011).

A ureia e a creatinina são considerados como marcadores bioquímicos da função renal. A creatinina é a mais indicada para avaliar a funcionalidade dos rins devido a mesma não sofrer reabsorção nos túbulos renais como a ureia e sua concentração renal ser constante, uma vez detectado alterações nesse parâmetro pode haver indicativo de insuficiência renal (COSTA et al, 2012). A aplicação do extrato nos animais não resultou em alterações desses parâmetros bioquímicos.

As enzimas TGO, TGP, FA e Gama-GT são amplamente distribuídas em diversos tecidos e encontram-se em concentrações maiores no fígado. São consideradas marcadores bioquímicos e comumente utilizadas na clínica para avaliar a função hepática ou biliar. Uma elevação significativa em seus níveis séricos pode indicar danos hepatocelulares (COSTA et al, 2012; SALEEM et al, 2017). Em nossos achados, os animais tratados topicamente com a concentração de 100 mg/ml não apresentaram alterações significativas, a exceção da TGP e FA, que apresentaram níveis inferiores aos respectivos controles. Na concentração de 200 mg/ml também não houve alterações, a exceção da TGP, que se apresentou elevada em relação aos controles.

As alterações bioquímicas supracitadas podem estar correlacionadas a condições hepáticas observadas durante a avaliação histológica do órgão. No entanto, tais alterações foram identificadas como pré-existentes, ou seja, não relacionadas ao uso da droga.

Conjuntamente, os dados obtidos indicam que o VAR01 apresenta um perfil de baixa toxicidade, o que estabelece parâmetros de segurança para o seu uso terapêutico. De fato, a avaliação toxicológica preliminar é essencial para autenticação da segurança no uso de produtos naturais, sendo amplamente enfatizada pela Organização Mundial da Saúde para garantir o uso seguro e eficaz de tratamentos à base de plantas medicinais (OMS, 1993).

Posteriormente, avaliou-se o efeito do extrato aquoso de VAR01 em feridas abertas promovidas em murinos. No modelo de cicatrização, a substância atuou de maneira positiva na contração da lesão no período de 3 e 7 dias. Tal potencial cicatrizante pode estar vinculado à capacidade do extrato de modular a via inflamatória, efeito demonstrado previamente por nosso grupo de pesquisa

e semelhante à literatura, com estudos que apresentam efeito cicatrizante e anti-inflamatório de espécies pertencentes ao gênero *Varronia* (Kuppast e Nayak, 2005; Zala et al, 2012; Perini et al, 2015).

A cicatrização de feridas cutâneas ocorre de maneira complexa envolvendo vários tipos de tecidos e células em quatro fases sobrepostas: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação. O processo inflamatório é uma etapa importante na cicatrização e tem papel de destaque nesse processo, pois promove a destruição de agentes invasores e a remoção de fragmentos estranhos (MENKE et al, 2007; YEH et al, 2017).

A persistência do estado inflamatório, porém, tende a agravar a lesão e retardar o processo de regeneração tecidual. Desta forma, a capacidade de modular o processo inflamatório é reconhecido como um elemento favorável que contribui para melhorar a recuperação e a qualidade da ferida (PEREIRA e BÁRTOLO, 2016; XU e HSIA, 2018).

Perini et al (2015) testou o Acheflan® um fitoterápico tópico desenvolvido no Brasil a partir de uma planta nativa *Varronia curassavica* Jacq (sin. *Cordia verbenácea*). O estudo demonstrou propriedades cicatrizantes do produto no modelo de cicatrização de feridas, sendo tal efeito atribuído ao seu principal constituinte, o sesquiterpeno  $\alpha$ -humuleno com importante atividade anti-inflamatórias já comprovada (MEDEIROS et al, 2007; PASSOS et al, 2007).

Outro estudo realizado por Kuppast e Nayak (2005) testou o extrato etanólico e frações do fruto da *Cordia dichotoma* e mostrou que a partir do 4º dia de tratamento houve aumento na contração da lesão e com epitelização precoce da ferida nos animais tratados com as frações, sendo esse resultado associado a presença de compostos flavonoides. Zala et al (2012) realizou testes com pomadas de extratos do pó das folhas de *Cordia rothii* em seus achados os extratos etanólico e aquoso apresentaram um aumento significativo da contração a partir do 4º dia e redução no tempo de epitelização da ferida.

Estudos anteriores, incluindo de nossa equipe de pesquisa, apresentam constituintes fitoquímicos similares para as espécies do gênero *Varronia* (sin. *Cordia*), tais como terpenoides, flavonoides e fenóis e que são descritos nos escassos trabalhos realizados para avaliação da cicatrização. A estes são atribuídas propriedades significativas de regeneração de feridas, devido atuarem

como agentes antioxidantes e anti-inflamatórios capazes de modular fases importantes do processo de cicatrização.

## 7 CONCLUSÃO

Os dados obtidos demonstraram, pela primeira vez, que o extrato aquoso de *Varronia multispicata* possui baixa citotoxicidade sobre fibroblastos murinos (*in vitro*) e baixa toxicidade dérmica aguda (*in vivo*). Revelaram ainda que o extrato promove a contração de feridas (*in vitro* e *in vivo*), acelerando a redução da área de lesão, destacando-o como uma potencial droga cicatrizante. Por fim, demonstraram que o extrato é desprovido de atividade antibacteriana sobre as espécies testadas.

Estudos adicionais encontram-se em andamento para caracterizar o efeito cicatrizante em todo o processo de cicatrização, além de identificar os constituintes ativos responsáveis pelo efeito e os mecanismos pelo quais atuam.

## REFERÊNCIA

- ADETUTU, A.; MORGAN, W.A.; CORCORAN, O. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf, a wound-healing plant of Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p.116-119, 2011.
- ALLEGRI, M.; SIMEON, M.; MAILLOS, H.; OILOOT, A. Émulsions et applications en microbiologie. Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier, v. 33, p. 73-86, 1973.
- AL-MUSAYEIB, Nawal et al. Antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory activities of phenolic constituents from *Cordia sinensis*. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 10214-10226, 2011.
- AMAROZO, MCM., GÉLY, A. Uso de plantas medicinais por caboclos do baixo amazonas. Barcarena, PA, **Brasil. Bol. Museu Paraense Emílio Goeldi. Sér. Bot.** v. 4, p. 100, 1988
- ANNAN, K.; HOUGHTON, P. J. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L., wound-healing plants of Ghana. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 141-144, 2008.
- ARREBOLA, M. R. B. et al. Estudo dos componentes lipídicos das sementes de três espécies do gênero *Cordia* L.(Boraginaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 57-65, 2004.
- ARTEM ATAIDE, J. et al. Natural actives for wound healing: A review. **Phytotherapy Research**, 2018.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**. v. 41, p. 27-51, 2005.
- BALEKAR, N. et al. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, 817–824, 2012.
- BALLABH, B. et al. Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh—used against kidney and urinary disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 331-339, 2008.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARILE, F.A.; DIERICKX P.J.; KRISTEN U. In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. **Cell Biology and Toxicology**. v.10, p. 155-162, 1994.

BRAZÃO, M. A. B.; BRAZÃO, F. V.; MAIA, J.G.S.; MONTEIRO, M.C. Antibacterial activity of the Piper aduncum oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-resistant strains. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v.13, n.6, p.517 – 526, 2014.

BARROSO, I.C.E.; OLIVEIRA, F.D. Pharmacognostic diagnosis of fruits of *Cordia sellowiana* Cham. and *Cordia myxa* L. (Boraginaceae Jussieu). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 458–470, 2009.

BAYEUX, M. et al. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1229–1232, 2002.

BLASSAN, P.G.; THANGARAJ P.; RAHUL C. Anti-inflammatory and wound healing properties of *Rubus fairholmianus* Gard. root—An in vivo study. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 216–225, 2014.

BRANCO, A. C. S. C. et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos wistar e camundongos swiss do biotério professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, p. 209-214, 2011.

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

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. Approved standart: M7-A9, None Edition, vol. 32, nº 2, January, 2012.

CORREIA DA SILVA, T. B. et al. Determination of the phenolic content and antioxidant potential of crude extracts and isolated compounds from leaves of *Cordia multispicata* and *Tournefortia bicolor*. **Pharmaceutical biology**, v. 48, p. 63-69, 2010.

COSTA, J. P. et al. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, p. 421-428, 2012.

CROSS, S.E. et al. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. **British Journal of Plastic Surgery**. v. 48, p. 189-197, 1995.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. “Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss,” **Journal of Ethnopharmacology**. v. 101, p. 243–248, 2005.

DA SILVA, A. O. et al. Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of an uncommon 2, 3-dihydroxynaphthoquinone isolated from *Cordia multispicata* (Cham.). **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 55, p. 682-685, 2017.

DE CARVALHO, JR, P. M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 297-301, 2004.

DENG, Z. et al. The effect of earthworm extract on promoting skin wound healing. **Bioscience reports**, v. 38, 2018.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

FARSI, E. et al. Mutagenicity and preclinical safety assessment of the aqueous extract of *Clinacanthus nutans* leaves. **Drug and chemical toxicology**, v. 39, p. 461-473, 2016.

FEUILLET, C. Lectotypifications of six taxa in the Boraginales (Cordiaceae and Heliotropiaceae). **PhytoKeys**, v. 62, p. 95–100, 2016.

FREITAS, M.L.M. et al. Parâmetros genéticos em progênies de polinização aberta de *Cordia trichotoma* (Vell.) ex Steud. Genetic parameters in open-pollinated families of *Cordia trichotoma* (Vell.) ex Steud. **Rev. Inst. Flor**, v. 18, p. 95–102, 2006.

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

GOTTSCHLING, M. et al. Congruence of a phylogeny of Cordiaceae (Boraginales) inferred from ITS1 sequence data with 71 morphology, ecology and biogeography. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 92, p. 425–437, 2005.

GOTTSCHLING, M. et al. Secondary structure of the ITS1 transcript and its application in a reconstruction of the phylogeny of Boraginales. **Plant Biology**, v. 3, p. 629–636, 2001.

GRAÇA, M. et al. Volatiles of the *Cordia multispicata* Cham.: a Weed Medicinal Brazilian Plant. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 543-545, 2011.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, p. 314, 2008.

HARVEY, A. L. "Natural products in drug discovery," **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894–901, 2008.

JAHN, A. I.; GUNZEL P. K. H. The value of spermatology in male reproductive Toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reproductive Toxicology**. v. 2, p. 171-178, 1997.

JANIS, J. E. et al. The basic science of wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 117, n. 7 Suppl, p. 12S-34S, 2006.

JOTHY S. L. et al. Acute oral toxicity of methanolic seed extract of cassia fistula in mice. **Molecules**, v. 16, p. 5268-5282, 2011.

KANDHARE, A. D. et al. Acute and repeated doses (28 days) oral toxicity study of glycosides based standardized fenugreek seed extract in laboratory mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.72, p. 323–334, 2015.

KUPPAST IJ, NAYAK PV. Wound healing activity of *Cordia dichotoma* Forst F. fruits. **Indian Journal Natural Product Res.** v. 5, p. 99–102. 2006.

KUROYANAGI, M. et al. Anti-androgenic triterpenoids from the Brazilian medicinal plants *Cordia multispicata*. **Chem Pharm Bull.**, v. 49; p. 954–957, 2001.

KUROYANAGI, M. et al. Dammarane-type triterpenes from the Brazilian medicinal plant *Cordia multispicata*. **J Nat Prod.**, v. 66, p. 1307–1312, 2003.

LAGE VIANA, P. et al. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: história, área de estudos e metodologia. **Rodriguésia**, v. 67, 2016.

LI, Z.; MAITZ, P. Cell therapy for severe burn wound healing. **Burns & trauma**, v. 6, p. 13, 2018.

LOPES, K.S. **Avaliação da toxicidade oral aguda, atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, e composição química do extrato seco de *Varronia multispicata* (CORDIACEAE)**. 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade de Federal do Pará, Belém. 2017.

LORDANI, T. V. A. et al. Therapeutic Effects of Medicinal Plants on Cutaneous Wound Healing in Humans: A Systematic Review. **Mediators of inflammation**, v. 2018, 2018.

LUNA, L.G. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3.ed. New York, McGraw Hill, 258p, 1968.

MACHADO, I.C.; LOIOLA, M.I. Fly pollination and pollinator sharing in two synchronopatric species: *Cordia multispicata* (Boraginaceae) and *Borreria alata* (Rubiaceae). **Rev. Bras. Bot.**, v. 23, p. 305–311, 2000.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. The Pharmacological Evaluation of Natural Products—General and Specific Approaches to Screening Ethnopharmaceuticals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 8, p.127-147, 1983.

MAQUART, F. X.; MONBOISSE J. C. Extracellular matrix and wound healing. **Pathologie Biologie**, v. 62, p. 91-95, 2014.

MARTIAS, E.F.F. et al. Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

MATIAS, E.F.F. et al. The genus *Cordia*: botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.25, 2015.

MATIAS, E. F. F., SANTOS, K. K. A., FALCÃO-SILVA, V. S., SIQUEIRA-JUNIOR, J. P., COSTA, G. M., COUTINHO, H. D. M. Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Cordia verbenacea* DC. **Indian Journal Medical Research**. v. 137, p. 178–182. 2013

MEDEIROS, R. et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **Br. J. Pharmacol.**, v. 151, p. 618–627, 2007

MENEZES, J.E. et al. Trichotomol, a new cadinenediol from *Cordia trichotoma*. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 12, p. 787–790, 2001.

MENKE, N. B. et al. Impaired wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 19–25, 2007.

MILLER, J.S. New Boraginaceae from tropical America 4: Three new species of *Cordia* from South America. **Novon**, v. 11, p. 421–428, 2001.

MILLER, J.S. New Boraginales from Tropical America 5: New names and typifications for neotropical species of *Cordia* and *Varronia*. **Novon**, v. 17, p. 372–375, 2007.

MILLER, J.S.; GOTTSCHLING, M. Generic classification in the Cordiaceae (Boraginales): resurrection of the genus *Varronia* P. Br. **Taxon**, v. 56, p. 163–169, 2007.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, p. 958, 2008.

NOVAIS, T. et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, p. 5–8, 2003.

OECD, Guidelines for Testing of Chemicals. **Acute Dermal Toxicity**, v. 402, pp. 1–7, 2017.

OTTERÇO, A. N. et al. Effect of photobiomodulation (670 nm) associated with vitamin A on the inflammatory phase of wound healing. **Lasers in medical science**, p. 1-8, 2018.

OZA, M. J.; KULKARNI, Y. A. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the medicinal species of the genus *Cordia* (Boraginaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2017.

PASSOS, G. F; FERNANDES, E. S; DA CUNHA, F. M; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F; CAMPO, M. M. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal Ethnopharmacology**. v. 110, p. 323–33. 2007.

PEREIRA, R. F. et al. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. **Nanomedicine**, v. 8, p. 603–621, 2013.

PEREIRA, R. F.; BARTOLO P.J. Traditional Therapies for Skin Wound Healing. **Advances in wound care**, 2016.

PERINI, J. A. et al. Topical application of Acheflan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, p. 203, 2015.

PIMENTEL, S.P. et al. Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morpho-metric assays. **BMC Complement. Altern. Med.** 12, 224, 2012.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.

PRISTO, II. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.

POWERS, M.E.; WARDENBURG, J.B. Igniting the Fire: *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in the Pathogenesis of Sepsis. **PLOS collections**, 10.1371/journal.ppat.1003871, 2014.

QUADROS, A.U; BINI, D; PEREIRA, P.A; MORONI, E.G; MONTEIRO, M.C. Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-dependent mechanism. **Folia Microbiol.**, Vol. 56, 349-352, 2011.

RAMSEY, DT et al. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 941-949, 1995.

REINKE, J.M.; SORG H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, p. 35–43, 2012.

REUTER, J. et al. Botanicals in Dermatology and Skin Health. **Botanical Medicine**, p. 33-65, 2009.

SALEEM, U. et al. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG. **Toxicology reports**, v. 4, p. 580-585, 2017.

SANTIAGO, G. M. P. et al. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e

*Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, p. 187-190, 2005.

SERTIÉ, J. A. A. et al. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, v. 12, p. 338-344, 2005.

SHARMA, S. P. et al. Anti-inflammatory and woundhealing activities of the crude alcoholic extracts and flavonoids of *Vitex leucoxydon*. **Fitoterapia**, v. 61, 263–265, 1990.

SHARMA, V.K.; ASATI, D.P. Pediatric contact dermatitis. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, v. 76, p. 514–520, 2010.

SHAW, T. J.; MARTIN, P.: Wound repair at a glance. **Journal Cell Science**, v. 122, p. 3209–3213, 2009.

SHIVHARE, Y. et al. Wound healing potential of methanolic extract of *Trichosanthes dioica* Roxb (fruits) in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, p. 614-619, 2010.

SMITH, O. J. et al. A Systematic Review of Autologous Platelet-Rich Plasma and Fat Graft Preparation Methods. **Plastic and Reconstructive Surgery–Global Open**, v. 5, n. 12, p. e1596, 2017.

SOUZA, L. A. Morphology and Anatomy of the *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab.ex IM Johnst diaspore (Boraginaceae). **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 51, p. 761–768, 2008.

SPIEKSTRA, S. W. et al. Wound-healing factors secreted by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in skin substitutes. **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, p. 708-717, 2007.

STAPF, M. N. S.; SANTOS S. T. R.. Four new species of genus *Cordia* (Cordiaceae, Boraginales) from Brazil. **Brittonia**, v. 65, p. 191-199, 2013.

STAPF, M.N.S. *Varronia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015

STRONCEK, J. D.; BELL, N.; REICHERT, W. M. Instructional PowerPoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 90, p. 1230-1238, 2009.

SUGUNA, L. et al. Influence of *Terminalia chebula* on dermal wound healing in rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 227-231, 2002.

SUMITRA, Miriyala; MANIKANDAN, Panchatcharam; SUGUNA, Lochin. Efficacy of *Butea monosperma* on dermal wound healing in rats. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 3, p. 566-573, 2005.

TAN, L. et al. Synthesis, characterization, and acute oral toxicity evaluation of pH-sensitive hydrogel based on MPEG, poly ( $\epsilon$ -caprolactone), and itaconic acid. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

TARODA, N.; GIBBS, P.E. Studies on the genus *Cordia* L. (Boraginaceae) in Brazil. 1. A new infrageneric classification and conspectus. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, p. 31–42, 1986.

THAKUR, R. et al. Practices in Wound Healing Studies of Plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

THIRUPATHI, K., S. SATHESH KUMAR, V. S. RAJU, B. RAVIKUMAR, D. R. KRISHNA, G. KRISHNA MOHAN. **A review of medicinal plants of the genus *Cordia*: Their chemistry and pharmacological uses**. Journal Of Natural Remedies. v. 8/1. P. 1-10, 2008

VAZ, M. M. **Desenvolvimento de métodos por HPLC para isolamento de Flavonoides e Avaliação da atividade antibacteriana e analgésica de *Varronia multispicata* (Cham) Borhidi**. 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade de Federal do Pará, Belém. 2015.

VELNAR, T; BAILEY, T; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **Journal of International Medical Research**, v. 37, p.1528-1542, 2009.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB I. Basic physiology of the skin. **Surgery-Oxford International**, v. 28, p. 469-472, 2010.

VERSTEEG, H. H. et al. New fundamentals in hemostasis. **Physiological reviews**, v. 93, p. 327-358, 2013.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, I. C.G.; DA SILVA, J. M. C. Phenology, fruit set and dispersal of *Cordia multispicata* Cham., an important weed shrub of abandoned pastures in eastern Amazonia. **Rev. bras. Bot.**, v. 20, n. 1, p. 51–56, 1997.

VIEIRA, I.C.G., UHL, C.; NEPSTAD, D.C. The role of the shrub *Cordia multispicata* Cham. as a “succession facilitator” in an abandoned pasture, Paragominas, Amazônia, v.115, p. 91-99, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines. **WHO**, p.94, 1993.

XU, Z.; HSIA, H. C. The Impact of Microbial Communities on Wound Healing: A Review. **Annals of plastic surgery**, 2018.

YEH, C. et al. The effects of artocarpin on wound healing: in vitro and in vivo studies. **Scientific reports**, v. 7, p. 15599, 2017.

YOUNG, A.; MCNAUGHT C-E. et al. The physiology of wound healing. Basic science, 2011.

YUE, P. Y.; LEUNG, E. P.; MAK, N. K.; WONG, R. N. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **Journal of Biomolecular Screening**, 15: 427-33. 2010.

ZALA A. H., SAURABH S. P., HARIBHAI A. R. Wound healing activity of leaf extracts of *Cordia rothii* Roem & Schult. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**. v. 3, p. 2048–2054. 2012

ZHU, J. et al. Hyaluronic Acid and Polyethylene Glycol Hybrid Hydrogel Encapsulating Nanogel with Hemostasis and Sustainable Antibacterial Property for Wound Healing. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 10, p. 13304–13316, 2018.

## ANEXO I – PARECER DO CEPAE



**UFPA**  
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DE UMA ESPÉCIE VEGETAL DO GÊNERO CORDIA SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO E A TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA.", protocolada sob o CEUA nº 8678120917, sob a responsabilidade de **Enéas de Andrade Fontes Júnior e equipe; Paula Cardoso Ribera; Enéas de Andrade Fontes Júnior; Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva; Milton Nascimento da Silva; Enéas de Andrade Fontes Júnior** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 19/10/2017.

We certify that the proposal "EVALUATION OF A VEGETABLE SPECIMEN OF THE CORDIAN GENDER ON THE PROCESS OF HEALING AND ACUTE SKIN TOXICITY.", utilizing 24 Heterogenics rats (24 females), 90 Heterogenics mice (90 females), protocol number CEUA 8678120917, under the responsibility of **Enéas de Andrade Fontes Júnior and team; Paula Cardoso Ribera; Enéas de Andrade Fontes Júnior; Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva; Milton Nascimento da Silva; Enéas de Andrade Fontes Júnior** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 10/19/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **11/2017** a **11/2019**

Área: **Farmacologia da Inflamação e do Comportamento - LAFICO**

Origem: **Biotério Central ICB/UFPA**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **35 a 60 dias**

N: **24**

Linhagem: **Rattus norvegicus**

Peso: **150 a 200 g**

Origem: **Biotério Central ICB/UFPA**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **30 a 35 dias**

N: **90**

Linhagem: **Mus musculus**

Peso: **20 a 25 g**

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento da faculdade de Farmácia

Belém do Pará, 20 de outubro de 2017

*M<sup>a</sup> Vivina B. Monteiro*

Profa. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará

*Vanessa Joia de Mello*

Profa. Dra. Vanessa Joia de Mello  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará

## ANEXO II – ARTIGO PUBLICADO



# Heavy Chronic Ethanol Exposure From Adolescence to Adulthood Induces Cerebellar Neuronal Loss and Motor Function Damage in Female Rats

Fernando B. R. da Silva<sup>1</sup>, Polyane A. Cunha<sup>1</sup>, Paula C. Ribera<sup>1</sup>, Mayara A. Barros<sup>1</sup>, Sabrina C. Cartágenes<sup>1</sup>, Luanna M. P. Fernandes<sup>1</sup>, Francisco B. Teixeira<sup>2</sup>, Enéas A. Fontes-Júnior<sup>1</sup>, Rui D. Prediger<sup>3</sup>, Rafael R. Lima<sup>2</sup> and Cristiane S. F. Maia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmacology of Inflammation and Behavior (LAFICO), Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil, <sup>2</sup>Laboratory of Functional and Structural Biology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil, <sup>3</sup>Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDCN), Department of Pharmacology, Center of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Liana Fattore,  
Consiglio Nazionale delle Ricerche  
(CNR), Italy

### Reviewed by:

John J. Woodward,  
Medical University of South Carolina,  
United States

Maria Cristina Mostallino,  
Consiglio Nazionale delle Ricerche  
(CNR), Italy

### \*Correspondence:

Cristiane S. F. Maia  
crismaia@ufpa.br

**Received:** 14 December 2017

**Accepted:** 20 April 2018

**Published:** 15 May 2018

### Citation:

da Silva FBR, Cunha PA, Ribera PC, Barros MA, Cartágenes SC, Fernandes LMP, Teixeira FB, Fontes-Júnior EA, Prediger RD, Lima RR and Maia CSF (2018) Heavy Chronic Ethanol Exposure From Adolescence to Adulthood Induces Cerebellar Neuronal Loss and Motor Function Damage in Female Rats. *Front. Behav. Neurosci.* 12:88. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00088

Over the last years, heavy ethanol consumption by teenagers/younger adults has increased considerably among females. However, few studies have addressed the long-term impact on brain structures' morphology and function of chronic exposure to high ethanol doses from adolescence to adulthood in females. In line with this idea, in the current study we investigated whether heavy chronic ethanol exposure during adolescence to adulthood may induce motor impairments and morphological and cellular alterations in the cerebellum of female rats. Adolescent female Wistar rats (35 days old) were treated with distilled water or ethanol (6.5 g/kg/day, 22.5% w/v) during 55 days by gavage. At 90 days of age, motor function of animals was assessed using open field (OF), pole, beam walking and rotarod tests. Following completion of behavioral tests, morphological and immunohistochemical analyses of the cerebellum were performed. Chronic ethanol exposure impaired significantly motor performance of female rats, inducing spontaneous locomotor activity deficits, bradykinesia, incoordination and motor learning disruption. Moreover, histological analysis revealed that ethanol exposure induced atrophy and neuronal loss in the cerebellum. These findings indicate that heavy ethanol exposure during adolescence is associated with long-lasting cerebellar degeneration and motor impairments in female rats.

**Keywords:** ethanol, adolescence, cerebellum, motor deficits, cerebellar atrophy

## INTRODUCTION

Ethanol is one of the most widely used psychoactive drugs in the world (Room et al., 2005). Some characteristics, such as the low cost, availability and easy access, contribute to high ethanol consumption among adolescents (Zarzar et al., 2012). Indeed, it has been observed a reduced sensitivity to the ethanol-induced motor impairments among adolescents, which may contribute to heavy drinking as well as the early development of alcohol dependence (Spear, 2000). Consequently,