



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

WEMERSON DE SANTANA NERES

**EFEITO DO EXTRATO DE *Anadenanthera colubrina* NA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EXCISIONAIS
INDUZIDAS EM CAMUNDONGOS**

SÃO CRISTÓVÃO-SE

2021

WEMERSON DE SANTANA NERES	EFEITO DO EXTRATO DE <i>Anadenanthera colubrina</i> NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EXCISIONAIS INDUZIDAS EM CAMUNDONGOS	2021

WEMERSON DE SANTANA NERES

**EFEITO DO EXTRATO DE *Anadenanthera colubrina*
NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS
EXCISIONAIS INDUZIDAS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Grespan

SÃO CRISTÓVÃO-SE

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

N444e Neres, Wemerson de Santana
Efeito do extrato de *Anadenanthera colubrina* na cicatrização de feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos / Wemerson de Santana Neres ; orientadora Renata Grespan. – São Cristóvão, SE, 2021.
74 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Pele. 2. Ferimentos e lesões. 3. Inflamação. 4. Cicatrização de ferimentos. 5. Angico-de-carço. I. Grespan, Renata, orient. II. Título.

CDU 616-001-003.9:582.736.1

WEMERSON DE SANTANA NERES

**EFEITO DO EXTRATO DE *Anadenanthera colubrina*
NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS
EXCISIONAIS INDUZIDAS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Grespan

Examinador 1: Prof^a. Dr^a. Cristiane Bani Correa

Examinador 2: Prof^a. Dr^a. Claudia Rocha Carvalho

AGRADECIMENTOS

A todos que têm contribuído direta e indiretamente para o meu crescimento pessoal e profissional.

À minha família, especialmente minha mãe (Luciene), irmã (Wêmilla) e noiva (Taislane), três mulheres que sempre demonstraram apoio incondicional.

Ao meu grande amigo Osmário por todo incentivo e positividade nos bons e maus momentos.

Aos meus queridos “filhos” Miro, Biloca e Pérola, animais e companheiros que tornam o meu cotidiano mais cheio de vida.

Ao meu professor do ensino médio, Carlos Alexandre, pelo incentivo constante ao desenvolvimento profissional.

À professora Renata, um exemplo de orientadora que demonstrou paciência, atenção e credence na minha capacidade.

À doutoranda Jéssica, pessoa e profissional incomparável, com uma grande capacidade de persistência e amor incondicional pelos animais.

A Saulo, Luiz Felipe, Marciel, Sabrina, Adriana e Jileno, pela contribuição no desenvolvimento das análises e experimentos.

Aos professores Cláudia Rocha, Cristiane Bani, Emiliano Oliveira, Enilton Aparecido, José Ronaldo, Marcelo Cavalcante, Marcos Meiado e Tatiana Rodrigues que contribuíram na realização deste trabalho.

Ao Renivan, pessoa incomparável que sempre esteve disposta a ajudar do início ao fim na realização desta etapa da vida.

Aos grandes companheiros Sabrina, Matheus, André Luiz (meu fã), Camila, Jéssica, José Carlos, Karolina, Ingrede, Rodolfo e Luana que tornaram a pós-graduação mais descontraída.

A todos que compõem o Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas por toda a contribuição que permitiu a realização deste trabalho.

Aos servidores e funcionários do Hospital Veterinário Universitário e do Departamento de Medicina Veterinária da UFS pelo apoio.

Por fim, sinto-me eternamente grato a todos!

“Agradeço à vida por nada ter sido fácil para mim”

Sigmund Freud

RESUMO

EFEITO DO EXTRATO DE *Anadenanthera colubrina* NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EXCISIONAIS INDUZIDAS EM CAMUNDONGOS, Wemerson de Santana Neres, São Cristóvão, 2021.

Introdução: A cicatrização de feridas é um processo complexo de reparo da pele que pode ser prejudicado em virtude de inflamação exacerbada, ocasionando consequências físicas, psicológicas e econômicas. Nesse sentido, as plantas medicinais são alternativas promissoras no reparo de feridas, principalmente em virtude da modulação da inflamação. A *Anadenanthera colubrina*, popularmente conhecida como angico, tem sido amplamente utilizada na medicina tradicional e apresenta importantes propriedades medicinais anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas e cicatrizantes. No entanto, os estudos sobre o reparo da pele continuam escassos e os mecanismos cicatrizantes pouco explorados. **Objetivo:** Avaliar o efeito do Extrato Etanólico de *A. colubrina* (EEAc) na cicatrização de feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos. **Metodologia:** Camundongos Swiss fêmeas foram submetidas à excisão cutânea dorsotorácica com *punch* metálico de 6 mm e distribuídas em grupo controle, veículo ou EEAc 5%. A área das feridas foi mensurada nos dias 0, 3, 5, 7, 10 e 14 e os tecidos coletados nos dias 1, 3, 7 e/ou 14 para determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO), quantificação de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), mensuração de TNF- α e IL-10 e análise do infiltrado leucocitário, angiogênese, re-epitelização e deposição de colágeno nas lesões. **Resultados:** O EEAc 5% induziu redução ($p < 0,001$) da área das feridas no 3º, 5º e 7º dia e aumento na deposição de colágeno ($p < 0,01$) ao 14º dia. Além disso, o grupo EEAc 5% apresentou redução da atividade de MPO ao 3º dia, quando comparado ao controle ($p < 0,01$) ou veículo ($p < 0,001$), e aumento de NAG ao 7º dia ($p < 0,001$). Não foram observadas diferenças para TNF- α , mas houve aumento da quantidade de IL-10 ao 3º dia ($p < 0,01$). **Conclusão:** O EEAc 5% foi eficaz na cicatrização de feridas excisionais em camundongos mediante os efeitos de redução da área e do infiltrado de neutrófilos, aumento do infiltrado de macrófagos, da citocina anti-inflamatória IL-10 e da deposição de colágeno nas lesões.

Palavras-chave: Pele; Lesão; Inflamação; Reparo; Angico.

ABSTRACT

EFFECT OF *Anadenanthera colubrina* EXTRACT ON THE HEALING OF EXCISIONAL SKIN WOUND INDUCED IN MICE, Wemerson de Santana Neres, São Cristóvão, 2021.

Introduction: Wound healing is a complex skin repair process that can be impaired due to exacerbated inflammation, causing consequences physical, psychological and economic. In this sense, medicinal plants are promising alternatives in wound repair, mainly due to the modulation of inflammation. *Anadenanthera colubrina*, popularly known as angico, has been widely used in traditional medicine and has important medicinal properties anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial and healing. However, studies on skin repair remain scarce and scarring mechanisms are little explored. **Objective:** To evaluate the effect of the Ethanol Extract of *A. colubrina* (EEAc) on the healing of excision cutaneous wounds induced in mice. **Methodology:** Swiss female mice were submitted to dorsothoracic cutaneous excision with a 6 mm metallic *punch* and distributed in a control group, vehicle or EEAc 5%. The wound area was measured on days 0, 3, 5, 7, 10 and 14 and the tissues collected on days 1, 3, 7 and/or 14 to determine the activity of Myeloperoxidase (MPO), quantification of N-acetyl- β -D-glycosaminidase (NAG), measurement of TNF- α and IL-10 and analysis of leukocyte infiltrate, angiogenesis, re-epithelialization and collagen deposition in lesions. **Results:** The EEAc 5% induced a reduction ($p < 0.001$) of the wound area on the 3rd, 5th and 7th day and increased collagen deposition ($p < 0.01$) on the 14th day. In addition, the EEAc 5% group showed a reduction in MPO activity on the 3rd day, when compared to the control ($p < 0.01$) or vehicle ($p < 0.001$), and an increase in NAG on the 7th day ($p < 0.001$). No differences were observed for TNF- α , but there was an increase in the amount of IL-10 on the 3rd day ($p < 0.01$). **Conclusion:** The EEAc 5% was effective in healing excisional wounds in mice through the effects of reducing area and neutrophil infiltrate, increasing macrophage infiltrate, anti-inflammatory cytokine IL-10 and collagen deposition in lesions.

Keywords: Skin; Lesion; Inflammation; Repair; Angico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Divisão estrutural da pele em epiderme, derme, hipoderme e seus anexos.....	19
Figura 2- Fase de Hemostasia.....	21
Figura 3- Fase de inflamação.	22
Figura 4- Polarização de macrófagos.....	23
Figura 5- Fase de proliferação	24
Figura 6- Fase de remodelamento	25
Figura 7- Tipos de lesões realizadas em roedores para estudar a cicatrização de feridas	27
Figura 8- Árvore (A) e casca do caule (B) da espécie <i>A. colubrina</i>	36
Figura 9- Árvore adulta da espécie <i>A. colubrina</i> (A) e casca do caule (B) utilizada para obtenção do extrato	39
Figura 10- Processo de obtenção do extrato de <i>A. colubrina</i>	40
Figura 11- Modelo experimental de excisão cutânea circular com punch metálico de 6 mm	41
Figura 12- Delineamento experimental.....	42
Figura 13- Efeito do EEAc 5% sobre a área das feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos	45
Figura 14- Representação do efeito do EEAc 5% sobre os parâmetros histológicos das feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos....	47
Figura 15- Efeito do EEAc 5% sobre a atividade de Mieloperoxidase nas feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos	48
Figura 16- Efeito do EEAc 5% sobre a atividade de N-acetil-β-D-glicosaminidase nas feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos	49
Figura 17- Efeito do EEAc 5% sobre a quantidade de TNF-α nas feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos	50
Figura 18- Efeito do EEAc 5% sobre a quantidade de IL-10 nas feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Efeito do EEAc 5% sobre os parâmetros histológicos das feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos.	46
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ASE	Herbário da Universidade Federal de Sergipe
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
D	Derme
DAMP	Padrão Molecular Associado ao Dano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Epiderme
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EEAc 5%	Extrato Etanólico de <i>Anadenanthera colubrina</i> a 5%
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EPM	Erro Padrão da Média
FC	Folículo Capilar
Fd	Ferida Diária
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
Fi	Ferida Inicial
HE	Hematoxilina e Eosina
HIF-1α	Fator Induzível por Hipóxia-1 α
HTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamonio
i.p.	Intraperitoneal
IFN-γ	Interferon- γ
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-17	Interleucina-17
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
M1	Macrófagos de Ativação Clássica

M2	Macrófagos de Ativação Alternativa
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de Sódio
NAG	N-acetil- β -D-glicosaminidase
NETs	Redes Extracelulares de Neutrófilos
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear- κ B
NO	Óxido Nítrico
OD	Densidade Óptica
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógeno
PBS	Tampão Fostato de Sódio
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PG	Propilenoglicol
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
Q	Queratina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rpm	Rotações por Minuto
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador- β
TM	Tecido Muscular
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α
UFS	Universidade Federal de Sergipe
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Pele e cicatrização	19
2.2. Fases do reparo tecidual	20
2.2.1. Hemostasia.....	20
2.2.2. Inflamação	21
2.2.3. Proliferação	23
2.2.4. Remodelamento.....	24
2.3. Classificação das feridas cutâneas	25
2.4. Fatores que interferem na cicatrização.....	27
2.5. Tratamento de feridas.....	29
2.6. Plantas medicinais no tratamento de feridas	32
2.6.1. <i>Anadenanthera colubrina</i>	35
3. OBJETIVO.....	38
3.1. Objetivo geral	38
3.2. Objetivos específicos	38
4. METODOLOGIA.....	39
4.1. Coleta e identificação do material vegetal	39
4.2. Obtenção e formulação do extrato da casca de <i>A. colubrina</i>	39
4.3. Animais	40
4.4. Indução da ferida excisional	41
4.5. Delineamento experimental.....	41
4.6. Avaliação das feridas.....	42
4.6.1. Área da ferida em cicatrização	42
4.6.2. Coleta de tecido	43
4.6.3. Avaliação histológica	43
4.6.4. Mensuração da atividade da Mieloperoxidase	43
4.6.5. Mensuração da atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase	44
4.6.6. Quantificação de citocinas	44
4.7. Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS	45
5.1. Efeito do EEAc 5% sobre a área das feridas cutâneas excisionais.....	45
5.2. Efeito do EEAc 5% sobre os parâmetros histológicos das lesões.....	46

5.3.	Efeito do EEAc 5% sobre a atividade de MPO nas feridas	48
5.4.	Efeito do EEAc 5% sobre a atividade de NAG nas feridas	49
5.5.	Efeito do EEAc 5% sobre a quantidade de TNF- α nas lesões	50
5.6.	Efeito do EEAc 5% sobre a quantidade de IL-10 nas lesões	51
6.	DISCUSSÃO	52
7.	CONCLUSÃO	58
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
9.	REFERÊNCIAS	60
10.	ANEXO I	73
11.	APENDICE I	74

1. INTRODUÇÃO

A pele é um importante órgão com ação protetora contra agentes agressores externos para o organismo (PHILLIPSON; KUBES, 2019). Quando lesionado, esse órgão tem a capacidade de dar início a um processo de restabelecimento da barreira funcional conhecido como cicatrização de feridas (XU LANDÉN et al., 2016). No entanto, o processo natural de cicatrização pode ser prejudicado em virtude de inflamação exacerbada, resultando na formação de feridas crônicas (GANTWERKER; HOM, 2011; OGUNTIBEJU, 2019). Dessa forma, embora o processo inflamatório seja fundamental, sua ação acentuada é prejudicial ao reparo tecidual e resulta em complicações como dor acentuada, cicatrizes hipertróficas, queloides, infecções, amputações, sepse e, até mesmo, morte (DWIVEDI et al., 2017; LAROUCHE et al., 2018; TSIROGIANNI et al., 2006).

A finalidade do processo de cicatrização de feridas é promover o reparo tissular mediante a interação entre inúmeros tipos celulares, como neutrófilos, macrófagos, queratinócitos, fibroblastos, endoteliócitos e entre outros. Além de interação celular, deve haver resposta coordenada entre uma gama de moléculas envolvidas no reparo, como o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interleucina-10 (IL-10) e entre outras (BARRIENTOS et al., 2008; GURTNER et al., 2008; MIRZA; KOH, 2015; WANG et al., 2014). Em conjunto, esses fatores irão promover a cicatrização da lesão cutânea mediante as fases distintas de hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (VEITH et al., 2019).

Diante disso, o tratamento de feridas cutâneas é quase sempre indicado, pois a formação dessas lesões eventualmente predispõe a graves complicações. No Brasil, dados estatísticos sobre o impacto das feridas são escassos, mas se sabe que essas lesões são responsáveis por consequências psicológicas, sociais e econômicas (MANDELBAUM, 2003a). Nos Estados Unidos, estima-se que gastos com o tratamento de feridas crônicas representem custos de aproximadamente 25 bilhões de dólares por ano. E, além dos custos diretos, ocorre aumento indireto de despesas pela incapacitação dos indivíduos portadores e de familiares que passam a destinar cuidados específicos. Sendo assim, as feridas de pele representam uma grande ameaça à saúde pública e à economia mundial (SEN et al., 2009).

Diante da problemática, inúmeros recursos convencionais são amplamente utilizados para o tratamento tópico de feridas, mas para a maioria deles existem inúmeras limitações como baixa acessibilidade e alto custo, além de controvérsias sobre a segurança e a eficácia (MURPHY; EVANS, 2012; OKONKWO; DIPIETRO, 2017; ROSEN et al 2015). Embora se acredite que muito é conhecido sobre a cicatrização de feridas e que existem recursos em demasia, pesquisas são fundamentais para desenvolver tecnologias alternativas com melhor custo-benefício (MANDELBAUM, 2003a). Dessa forma, nos dias atuais a pesquisa e o emprego de terapias alternativas à base de plantas medicinais têm aumentado (PEREIRA; BÁRTOLO, 2013).

Uma gama de plantas medicinais tradicionais tem seu uso comprovado para o tratamento de feridas e, comumente, apresentam importante efeito modulador sobre o processo inflamatório (AMORIM et al., 2017; ATIBA et al., 2011; ESTEVÃO et al., 2017; PEREIRA et al., 2016). Sendo assim, nota-se uma tendência no estudo por produtos naturais que atuam na modulação de fases específicas do processo de reparo tecidual, particularmente na fase inflamatória. Gushiken et al. (2017), por exemplo, utilizaram o extrato hidroalcoólico das folhas e a oleorresina da *Copaifera langsdorffii* (Copaíba) no tratamento de feridas cutâneas excisionais em ratos. Os resultados foram promissores para essa planta medicinal, principalmente relacionadas à propriedade anti-inflamatória por promover diminuição da área das feridas associada à redução da quantidade de Interleucina-1 β (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6) e TNF- α e aumento da IL-10.

A *Anadenanthera colubrina*, popularmente conhecida como angico, é uma das plantas da Caatinga mais citada com efeitos terapêuticos, sendo amplamente utilizada na medicina tradicional e empregada na produção de fitoterápicos (AGRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007). A casca desta espécie é rica em compostos fenólicos como taninos e flavonoides, que são produzidos pelo metabolismo secundário vegetal e considerados os responsáveis por suas principais propriedades farmacológicas, particularmente os efeitos anti-inflamatório (SANTOS et al., 2013), antioxidante (MELO et al., 2010) e antimicrobiano (ARAÚJO et al., 2014). Em conjunto, tais efeitos sugerem que *A. colubrina* é promissora candidata para o desenvolvimento de uma alternativa no reparo de feridas (WEBER et al., 2011).

O efeito do tratamento tópico com o extrato da casca da *A. colubrina* a 5% no processo de cicatrização de feridas excisionais em ratos foi investigado anteriormente, onde Pessoa et al. (2012) verificaram aumento no número de vasos sanguíneos e Pessoa et al. (2015) observaram maior número de fibroblastos e aumento na deposição de colágeno, sem que houvessem diferenças para o percentual de redução da área das feridas. Contudo, os estudos sobre os efeitos da *A. colubrina* no reparo da pele continuam escassos e os mecanismos cicatrizantes merecem ser mais bem explorados. Dessa forma, será possível comprovar a segurança da eficácia na cicatrização de feridas e justificar sua utilização na medicina tradicional (WEBER et al., 2011).

Ademais, o interesse pela atividade cicatrizante da *A. colubrina* surgiu em virtude da ausência de um tratamento padrão ouro para o reparo de feridas cutâneas, associada à busca por uma terapia alternativa mais eficaz e com mecanismos anti-inflamatórios no processo de reparo (DURAZ; KHAN, 2011). Diante do exposto, torna-se fundamental explorar os efeitos da *A. colubrina* na cicatrização de feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos, investigando os possíveis mecanismos envolvidos no processo inflamatório mediante o grau de fechamento da área da lesão, qualidade microscópica da ferida em cicatrização e determinação indireta de neutrófilos e macrófagos e quantificação de TNF- α e IL-10.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Pele e cicatrização

A pele pode ser dividida estruturalmente em epiderme, derme, hipoderme e anexos (GANTWERKER; HOM, 2011) (Figura 1). Em conjunto, tais estruturas promovem funções fisiológicas de controle da temperatura e umidade, recepção e transmissão de sinais e, particularmente, de proteção do organismo contra agentes agressores físicos, químicos e biológicos (DELAVERY et al., 2011; PHILLIPSON; KUBES, 2019). Além disso, quando danificada, a pele possui a capacidade de restabelecer a sua barreira funcional mediante um processo de reparo tecidual complexo conhecido como cicatrização de feridas (XU LANDÉN et al., 2016).

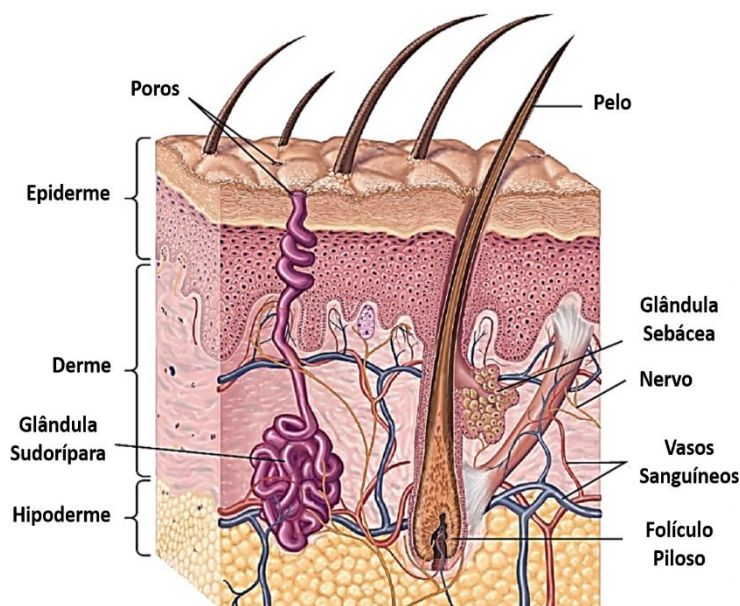


Figura 1- Divisão estrutural da pele em epiderme, derme, hipoderme e seus anexos. Fonte: Adaptado de Encyclopædia Britannica (2013). Disponível em: <https://www.britannica.com/science/human-skin>.

A formação de feridas pode prejudicar a qualidade de vida dos portadores por dor exacerbada, cicatrizes hipertróficas, queloides, infecções, amputações, sepse e morte (DWIVEDI et al., 2017; LAROCHE et al., 2018; TSIROGIANNI et al., 2006). Afora a ocorrência de complicações físicas e psicológicas, as lesões cutâneas são responsáveis por altos custos financeiros (SAMI et al., 2019; SEN et al., 2009; VEITH et al., 2019). Dessa forma, é fundamental que a resposta inflamatória aguda durante a cicatrização de feridas ocorra e seja finalizada o mais breve possível, sem deixar sequelas significativas (SERRA et al., 2017; XU LANDÉN et al., 2016).

O processo de cicatrização de feridas é um mecanismo de reparo que envolve a interação entre diversos tipos celulares e moleculares (HESKETH et al., 2017; MIRZA; KOH, 2015). Nesse sentido, em virtude de sua alta complexidade, a cicatrização de feridas é comumente investigada e dividida em quatro fases essenciais: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (VEITH et al., 2019). No entanto, essas fases se sobrepõem em espaço e tempo, além de apresentar características distintas que são fundamentais para o reparo adequado (GURTNER et al., 2008; PHILLIPSON; KUBES, 2019).

2.2. Fases do reparo tecidual

2.2.1. Hemostasia

A fase de hemostasia tem início com o dano tecidual, induzindo a vasoconstrição em resposta à liberação de moléculas vasoativas como catecolaminas e serotonina, com intuito de minimizar a perda de fluidos (GANTWERKER; HOM, 2011). Em virtude da lesão tissular, o colágeno subendotelial é exposto e estimula o início da cascata de coagulação, marcada por ativação e aderência de plaquetas ao endotélio. Além disso, as plaquetas liberam adenosina difosfato, estimulando ainda mais a agregação plaquetária de forma contínua (CHILDS; MURTHY, 2017).

O coágulo, formado por células como plaquetas, hemácias e leucócitos, e moléculas como fibrina, fibronectina, vitronectina e trombospondina, impede a perda de líquidos e protege o ambiente da ferida contra a invasão de microrganismos. Além disso, tais moléculas atuam como Matriz Extracelular (MEC) provisória, que é fundamental para a migração de inúmeros tipos celulares para o sítio inflamatório, como neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, endoteliócitos, queratinócitos e entre outros (DELAVERY et al., 2011; MANDELBAUM et al., 2003a; WERNER; GROSE, 2003).

Além de participar do processo de hemostasia, as plaquetas permitem a conexão com a fase inflamatória. Quando ativados, esses fragmentos celulares passam a liberar de seus grânulos moléculas como o PDGF, Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β) e VEGF, potencialmente quimiotáticos para neutrófilos, monócitos e fibroblastos (BARRIENTOS et al., 2008; QING, 2017) (Figura 2).

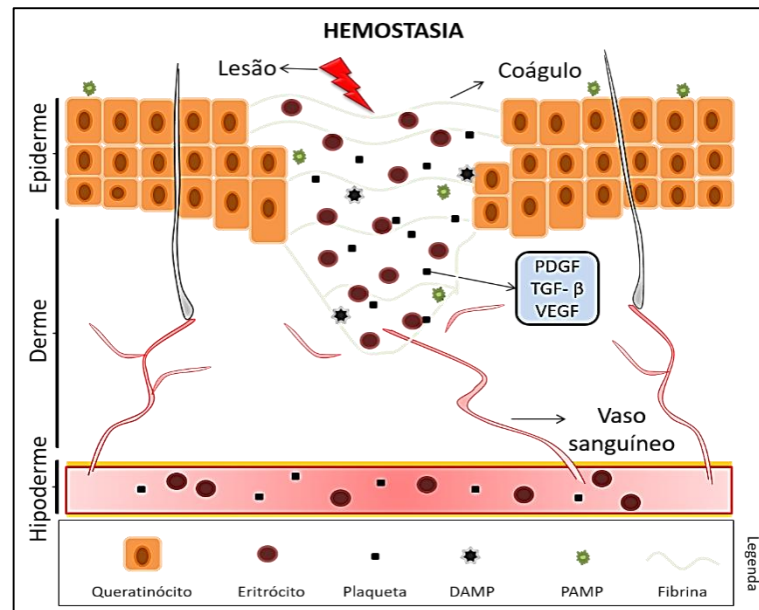


Figura 2- Fase de Hemostasia. DAMP- Padrão Molecular Associado ao Dano; PAMP- Padrão Molecular Associado a Patógeno; PDGF- Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas; TGF- β - Fator de Crescimento Transformador- β ; VEGF- Fator de Crescimento Endotelial Vascular. Fonte: Próprio autor, 2020.

2.2.2. Inflamação

Durante a fase inflamatória, os neutrófilos são os primeiros leucócitos recrutados a partir de mediadores como o Padrão Molecular Associado a Patógeno (PAMP), Padrão Molecular Associado ao Dano (DAMP) e PDGF (HESKETH et al., 2017). Esses fagócitos destroem microrganismos através da liberação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), elastase e Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) e liberam diversas moléculas como Metaloproteinases de Matriz (MMP), TNF- α , IL-1 β , IL-6 e Interleucina-17 (IL-17) que intensificam a inflamação e estimulam a ativação dos macrófagos pró-inflamatórios (BARRIENTOS et al., 2008; LAROCHE et al., 2018; PHILLIPSON; KUBES, 2019).

Posteriormente, inúmeros monócitos circulantes são mobilizados para o sítio inflamatório e se diferenciam em macrófagos (DELAVARY et al., 2011). Em virtude do ambiente rico inicialmente em PAMP, DAMP, Interferon- γ (IFN- γ) e TNF- α , os monócitos se diferenciam em macrófagos ativados classicamente, conhecidos como M1 (QING, 2017; WANG et al., 2014). Esses macrófagos realizam a fagocitose de microrganismos e de células mortas, inclusive dos neutrófilos. Além disso, os M1 liberam diversos mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF- α e ROS (HESKETH et al., 2017; WANG et al., 2014; WERNER; GROSE, 2003) (Figura 3).

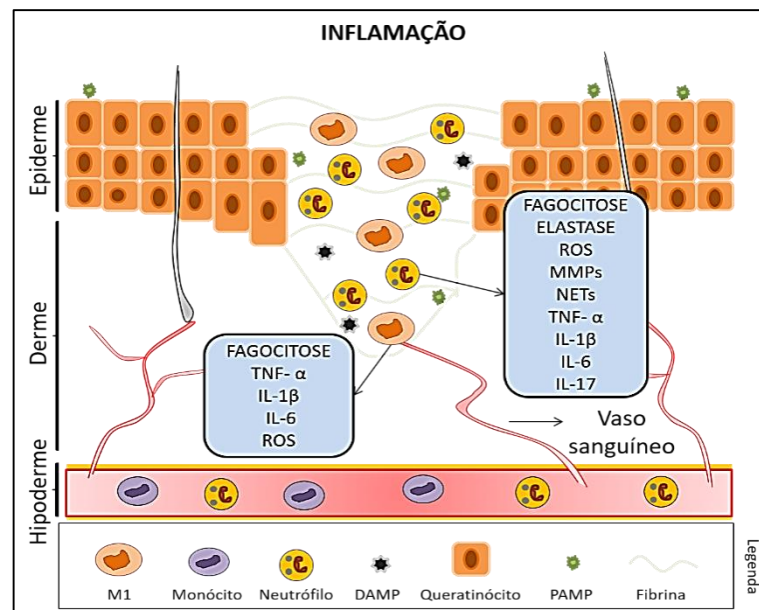


Figura 3- Fase de inflamação. DAMP- Padrão Molecular Associado ao Dano; IL-17- Interleucina- 17; IL-1 β - Interleucina- 1 β ; IL- 6- Interleucina- 6; M1- Macrófago Pró-inflamatório; MMPs- Metaloproteinases de Matriz; NETs- Redes Extracelulares de Neutrófilos; PAMP- Padrão Molecular Associado a Patógeno; ROS- Espécies Reativas de Oxigênio; TGF- β - Fator de Crescimento Transformador- β ; TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α . Fonte: Próprio autor, 2020.

Por outro lado, a Interleucina- 4 (IL-4), IL-10, Interleucina-13 (IL-13) e o TGF- β levam à formação de macrófagos de perfil alternativo, conhecidos como M2. Os macrófagos M2 apresentam atividade tipicamente anti-inflamatória como a produção de IL-10, TGF- β , VEGF e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1). Dessa forma, os macrófagos M2 promovem atividades pró-resolutivas como a proliferação de fibroblastos e diferenciação em miofibroblastos e a proliferação de queratinócitos e endoteliócitos (HESKETH et al., 2017; LA FLAMME et al., 2012; PHILLIPSON; KUBES, 2019; WANG et al., 2014; WERNER; GROSE, 2003).

Embora ambos os fenótipos M1 e M2 estejam presentes durante o processo de cicatrização de feridas, é sabido que suas proporções sofrem mudanças em função do tempo de evolução das lesões (HESKETH et al., 2017; XU LANDÉN et al., 2016). Obviamente, a polarização de macrófagos é uma etapa fundamental para a resolução do processo inflamatório. Dessa forma, além da via alternativa de ativação do perfil anti-inflamatório dos macrófagos, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos, conhecida como eferocitose, consiste em outra possibilidade para a ativação do perfil M2 benéfico à cicatrização (Figura 4).

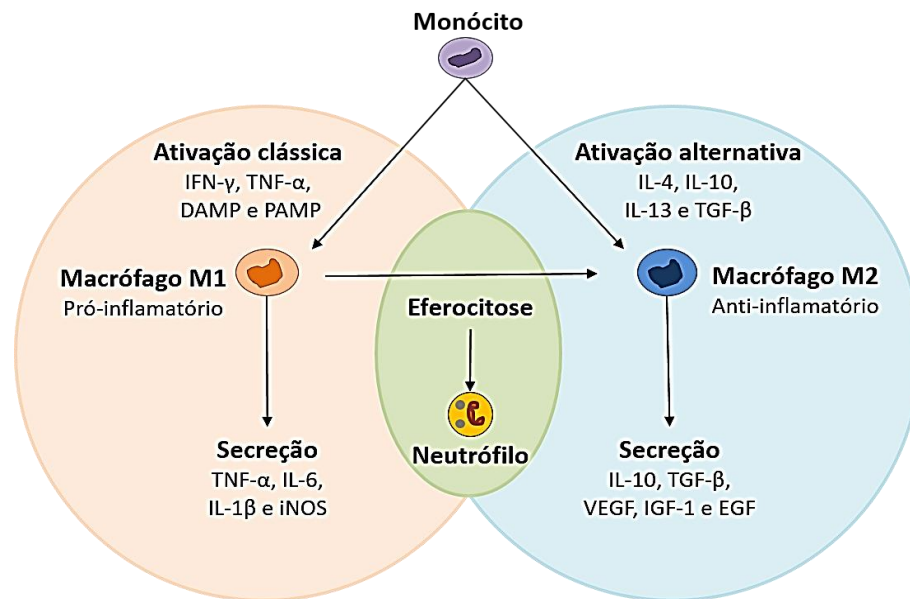


Figura 4- Polarização de macrófagos. DAMP- Padrão Molecular Associado ao Dano; EGF- Fator de Crescimento Epidérmico; IFN- γ - Interferon- γ ; IGF-1- Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1; IL-4- Interleucina-4; IL-6- Interleucina-6; IL-10- Interleucina-10; IL-13- Interleucina-13; IL-1 β - Interleucina-1 β ; IL-8- Interleucina-8; PAMP- Padrão Molecular Associado a Patógeno; ROS- Espécies Reativas de Oxigênio; TGF- β - Fator de Crescimento Transformador- β ; TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α ; VEGF- Fator de Crescimento Vascular Endotelial. Fonte: Adaptado de Hesketh et al., 2017.

O perfil M1 prevalece em estágios iniciais da inflamação e é responsável pelo ambiente pró-inflamatório. À medida em que o processo de reparo progride, o perfil M2 passa a prevalecer na ferida, sendo responsável pelo processo resolutivo (HESKETH et al., 2017). Nesse sentido, a polarização de macrófagos durante a cicatrização de feridas é fundamental para a transição entre inflamação e resolução, evitando a persistência da fase inflamatória e, conseqüentemente, atividade exacerbada de neutrófilos e macrófagos pró-inflamatórios (KLINKERT et al., 2017).

2.2.3. Proliferação

Na fase proliferativa ocorrem três eventos principais, a fibroplasia, angiogênese e re-epitelização (GURTNER et al., 2008) (Figura 5). Na fibroplasia, os fibroblastos migram através da MEC, proliferando e produzindo MMP, colágeno, proteoglicanos, ácido hialurônico, glicosaminoglicanos e fibronectina (SERRA et al., 2017). Posteriormente, os fibroblastos se diferenciam fenotipicamente em miofibroblastos, células com atividade de músculo liso contrátil que favorecem a contração da ferida por estímulo principal do TGF- β (WERNER; GROSE, 2003).

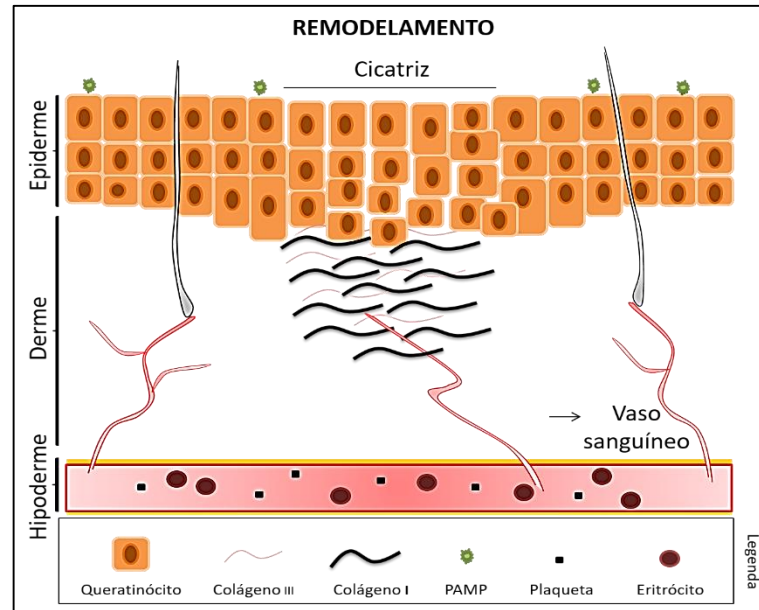


Figura 6- Fase de remodelamento. PAMP- Padrão Molecular Associado a Patógeno. Fonte: Próprio autor, 2020.

2.3. Classificação das feridas cutâneas

As feridas podem ser classificadas em função do tempo, tipo de fechamento, e causa base (ROBSON et al., 2001). Quando considerado o tempo, podem ser chamadas de feridas agudas ou crônicas. Quanto ao tipo de fechamento, podem ocorrer por primeira intenção, primeira intenção retardada ou segunda intenção. E, considerando a causa base, podem ser ocasionadas por úlceras por pressão, úlceras venosas, feridas diabéticas, feridas infectadas, feridas por queimadura, feridas cirúrgicas, entre outras (CHURCH et al., 2006; ENOCH; LEAPER, 2005; SEN et al., 2009; TAVERNER et al., 2011; VELNAR et al., 2009).

As feridas agudas apresentam como principal característica o reparo dentro do tempo previsto. Normalmente são feridas que cicatrizam dentro do período esperado, pois não apresentam fatores associados que resultem em maiores complicações. São exemplos de lesões cutâneas agudas as feridas cirúrgicas onde ocorre dano tecidual mínimo e são tomados os cuidados quanto a consequências como infecções. Em contrapartida, as feridas crônicas demandam maior tempo para que ocorra o reparo efetivo. Tais lesões comumente são passíveis de complicações que prolongam as fases de hemostasia, inflamação, proliferação e/ou remodelamento, estando associadas a comorbidades como diabetes *mellitus* ou infecção da ferida (VELNAR et al., 2009).

As lesões por primeira intenção são fechadas imediatamente após o dano, pois a perda tecidual é mínima e as feridas se reparam adequadamente. No fechamento por primeira intenção retardada a lesão é deixada aberta devido ao ambiente local contaminado e/ou risco potencial de infecção, sendo fechada após tratamento adequado e resposta do organismo. Por outro lado, no fechamento por segunda intenção as feridas são mais desafiadoras, pois houve extensa perda de tecido, as bordas das feridas não são aproximadas e a lesão é reparada por contração e subsequente re-epitelização, podendo gerar complicações devido ao tempo de reparo prolongado (ENOCH; LEAPER, 2005).

Em relação à causa base, as feridas podem ser classificadas em úlceras por pressão, causadas por pressão e/ou atrito que podem predispor à infecção (GORDON et al., 2004; REDDY et al., 2006), úlceras venosas que ocorrem em virtude de insuficiência venosa prolongada (TAVERNER et al., 2011), feridas diabéticas que são associadas à persistência inflamatória em pacientes com diabetes *mellitus* (BARSHEES et al., 2013; SALAZAR et al., 2016; WONG et al., 2015), feridas infectadas que estão associadas à colonização por patógenos como o *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa* (CARDONA et al., 2015; GUO; DIPIETRO, 2010), feridas por queimadura onde ocorrem lesões térmicas por contato direto com fontes de calor (CHURCH et al., 2006) e feridas cirúrgicas que são realizadas intencionalmente com finalidade terapêutica (BIGLIARDI et al., 2017).

Com base na classificação das feridas, diversos modelos experimentais são utilizados para mimetizar o processo de cicatrização que ocorre em humanos. Embora os animais sejam preferíveis e amplamente utilizados, aspectos éticos têm limitado sua utilização e estimulado outras formas de estudos como *in sílico* e *in vitro*. Nos estudos *in vivo*, particularmente, são utilizados principalmente os roedores como modelos experimentais de feridas cirúrgicas (excisionais e incisionais), por queimadura, infectadas, diabéticas, entre outras (Figura 7). As feridas excisionais, por exemplo, é o tipo mais utilizado e comum de lesão aguda em experimentos de cicatrização. E, ainda que cada modelo apresente características peculiares, todos podem ser utilizados para verificar o efeito de agentes cicatrizantes (SAMI et al., 2019).

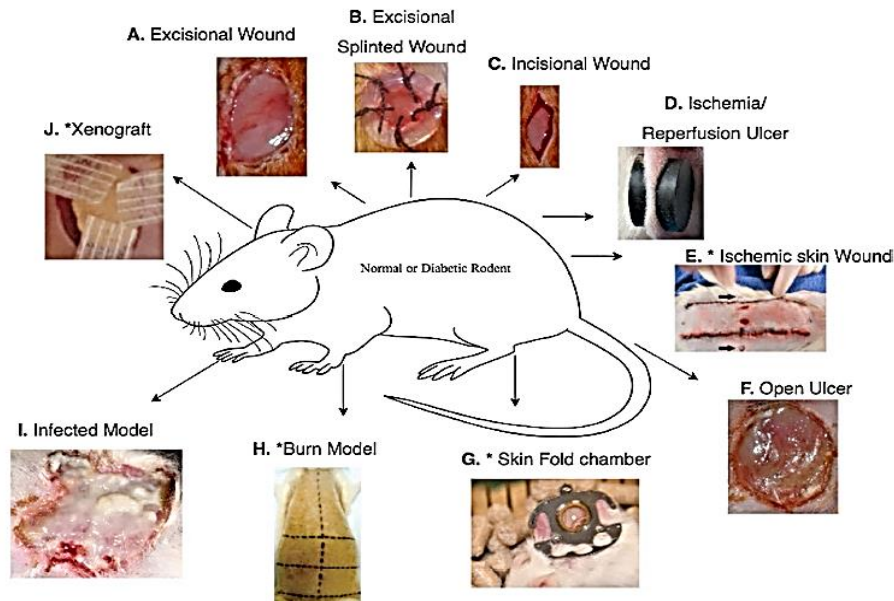


Figura 7- Tipos de lesões realizadas em roedores para estudar a cicatrização de feridas. Fonte: Sami et al., 2019.

2.4. Fatores que interferem na cicatrização

Diversas condições, inerentes ao organismo ou ao ambiente, podem prejudicar a cicatrização de feridas. Normalmente, esses fatores prejudicam o processo de reparo em virtude de potencialização da inflamação. Dentre os inúmeros fatores, exemplos que exigem melhor abordagem são idade, sexo, estresse, doenças sistêmicas, estado nutricional, infecção e utilização de medicamentos. Interessantemente, muitos podem estar associados e colaborar ainda mais para o surgimento de feridas não cicatrizantes (GANTWERKER; HOM, 2011; OGUNTIBEJU, 2019).

O processo de envelhecimento é classicamente prejudicial à cicatrização, pois retarda o reparo e afeta a qualidade da cicatriz (GANTWERKER; HOM, 2011). A redução de fibroblastos, da capacidade de contração e da produção do colágeno na ferida são os possíveis fatores nesse processo (OGUNTIBEJU, 2019). Por outro lado, a pele do feto tem grande poder de regeneração tecidual quando comparada a de adultos (WANG et al., 2018). Esse fator tem sido relacionado à atividade da IL-10, pois sua ausência na pele fetal exacerba a inflamação, resultando em estimulação contínua de fibroblastos e deposição anormal de colágeno, induzindo a formação de cicatrizes (LIECHTY et al., 2000).

O sexo pode interferir na resposta durante o reparo de feridas, em particular por efeito dos estrógenos que desempenham ação fundamental na homeostase da pele. Os estrógenos auxiliam no reparo tecidual e sua ausência implica na formação de feridas crônicas. A reposição hormonal, por exemplo, melhora a cicatrização pois reduz o infiltrado de neutrófilos, aumenta a deposição de colágeno, reduz a expressão de TNF- α e promove a polarização de macrófagos M2 (ASHCROFT et al., 1999; ROUTLEY; ASHCROFT, 2009). Nesse sentido, o sexo masculino tem sido associado a cicatrização deficiente, embora maiores taxas de cura e menores complicações foram observadas no reparo da mucosa oral (ENGELAND et al. 2009).

As respostas fisiológicas ao estresse têm sido associadas a efeitos maléficos sobre a cicatrização de feridas, principalmente por retardar a fase inflamatória. Durante a resposta a agentes estressores, muitas moléculas endógenas são liberadas, especialmente os glicocorticoides e catecolaminas. Ambas as substâncias podem prejudicar a cicatrização por reduzir a atividade de MMPs, aumentar a hipóxia tecidual, diminuir citocinas pró-inflamatórias e a infiltração de neutrófilos, reduzir a síntese de peptídeos antimicrobianos e predispor a ferida a infecções (GOUIN; KIECOLT-GLASER, 2011).

Ademais, uma diversidade de doenças pode influenciar no processo de cicatrização, mas atenção especial é dada ao diabetes *mellitus*. Embora a patogenia não seja totalmente compreendida, a formação de feridas diabéticas está associada à redução do fluxo sanguíneo, pois a hiperglicemia interrompe o equilíbrio vascular e, assim, a angiogênese, resultando em feridas crônicas não cicatrizantes (OKONKWO; DIPIETRO, 2017). Dessa forma, o modelo de ferida diabética animal tem sido amplamente utilizado em pesquisas científicas para o desenvolvimento de novos agentes cicatrizantes, pois mimetiza um processo desafiador de inflamação persistente, onde ocorre a formação de feridas crônicas (OGUNTIBEJU, 2019).

A desnutrição também pode influenciar negativamente na cicatrização, pois prejudica a produção de inúmeras moléculas essenciais ao reparo (GANTWERKER; HOM, 2011). A redução de aminoácidos na dieta, por exemplo, pode resultar na deficiência proteica, reduzindo a deposição de colágeno na lesão (OGUNTIBEJU, 2019; PALMIERI et al., 2019). Além disso, a vitamina A tem atividade anti-inflamatória, a vitamina C aumenta a migração de neutrófilos e o zinco atua na produção de DNA, síntese proteica e divisão celular (GANTWERKER; HOM, 2011; PALMIERI et al., 2019).

A infecção da ferida é um dos principais fatores que retardam a cicatrização por prolongar a inflamação, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (GUO; DIPIETRO, 2010). Assim, um dos objetivos no tratamento de feridas é a prevenção de infecções, sendo as cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* os principais microrganismos envolvidos (CARDONA et al., 2015). No entanto, a infecção da ferida por ambas as cepas bacterianas pode ser bastante desafiadora, pois além de infectar e causar graves danos ao organismo, podem adquirir resistência a inúmeros antimicrobianos (ALMEIDA et al., 2014; ROMHA et al., 2018).

Por fim, muitos medicamentos utilizados sistemicamente também podem interferir no reparo de lesões de pele. A utilização de glicocorticoides, particularmente, tem grande impacto sobre a cura de feridas. Esses esteroides são classicamente inibidores do processo cicatricial, pois suprimem a atividade de fibroblastos e a síntese de colágeno, além de favorecer a infecção da lesão (GUO; DIPIETRO, 2010). Interessantemente, a administração de glicocorticoides por via tópica parece acelerar a cicatrização de feridas, mas o uso crônico pode predispor à infecção da lesão (HOFMAN et al., 2007).

2.5. Tratamento de feridas

O interesse humano em intervir no processo de cicatrização de feridas tem sido observado desde os tempos antigos, onde utilizavam principalmente recursos naturais como argila, mel e ervas medicinais (SHAH, 2011). A partir disso, uma diversidade de recursos tem sido exaustivamente estudada, aprimorada e aplicada para o tratamento de feridas. Esses recursos convencionais apresentam diferentes indicações, sendo comumente utilizados produtos tópicos como ácidos graxos essenciais, alginatos, antissépticos, carvão ativado, enzimas proteolíticas, hidrocolóides, hidrogéis e hidropolímeros, sulfadiazina de prata, fatores de crescimento, substitutos da pele, entre outros (ABDEL-SAYED et al., 2020; MACIEL et al., 2019; MANDELBAUM et al., 2003b; MIR et al., 2018; MURPHY; EVANS, 2012; SILVA et al., 2018; STEEN et al., 2020).

Os ácidos graxos essenciais podem ser utilizados em todos os tipos de feridas, mas têm seu uso limitado em virtude do alto custo e controvérsias quanto à segurança e eficácia. Os mesmos podem induzir reações de hipersensibilidade e resposta inflamatória acentuada, necessitando assim de mais estudos para o uso

clínico (HUANG et al., 2018; LANIA et al., 2019; MANDELBAUM et al., 2003b). Em trabalho recente, Peng et al. (2018) avaliaram o efeito do óleo de peixe, produto rico em ácidos graxos essenciais e demonstraram efeitos cicatrizantes satisfatórios como reparo precoce e aumento da quantidade de IL-10 em feridas excisionais de ratos.

O alginato de cálcio é um composto natural à base de algas que apresenta como princípio ativo o ácido algínico e pode ser utilizado para a cicatrização de feridas. Esse tipo de curativo é utilizado para absorção do exsudato e umidificação local, sendo indicado em feridas agudas ou crônicas, principalmente quando infectadas e ricas em exsudato. De fato, Wang et al. (2015) verificaram que o alginato de cálcio promoveu aumento na contração e na deposição de colágeno de feridas em ratos diabéticos. No entanto, esse tipo de curativo é contraindicado em feridas secas, além de requerir cuidados com a procedência e possuir alto custo (BALAKRISHNAN et al., 2005; MANDELBAUM et al., 2003b).

Os antissépticos são exemplos de agentes cicatrizantes amplamente utilizados para a cura de diversas lesões cutâneas, principalmente com intuito de reduzir a carga bacteriana local. A clorexidina e a iodopovidona são os principais agentes antissépticos utilizados no tratamento de lesões infectadas, como em feridas por queimaduras, ou na prevenção de lesões potencialmente infectáveis, como as feridas cirúrgicas (ABDEL-SAYED et al., 2020; BIGLIARDI et al., 2017). No entanto, existem inúmeras limitações quanto ao uso de antissépticos, principalmente relacionados ao real efeito no reparo, pois costumam causar mais danos teciduais do que benefícios (MANDELBAUM et al., 2003b).

O curativo de carvão ativado e prata é uma cobertura antimicrobiana indicada principalmente para feridas infectadas e exsudativas, pois o carvão tem efeito de adsorção do exsudato e a prata possui ação bactericida. Sua principal limitação está associada à necessidade de monitoramento constante das feridas quanto ao tempo de reparo, pois não pode ser utilizado no tecido de granulação (MANDELBAUM et al., 2003b). Ainda assim, foi demonstrado recentemente que consiste em um dos curativos amplamente utilizados que apresenta melhor custo-efetividade (SPIRA et al., 2020).

As enzimas proteolíticas são muito utilizadas com intuito de realizar o desbridamento das lesões, sendo indicadas em todas as fases do reparo de feridas. No entanto, são contraindicadas em feridas que serão reparadas por primeira intenção e podem causar reações de hipersensibilidade (MANDELBAUM et al.,

2003b). A colagenase é o mais comum agente desbridante enzimático utilizado e atua degradando a molécula de colágeno desnaturado presente no tecido danificado. Porém, para lesões térmicas a colagenase utilizada isoladamente pode predispor a infecções, pois é ausente de propriedades antimicrobianas intrínsecas (PHAM et al., 2019).

Os hidrocolóides e hidrogéis são coberturas indicadas para feridas secas e com pouco exsudato, onde promovem manutenção da umidade e desbridamento autolítico. Os hidrocolóides são contraindicados em feridas graves por queimadura e infectadas, enquanto os hidrogéis não podem ser utilizados em feridas cirúrgicas fechadas. Os hidropolímeros, por outro lado, são indicados para a manutenção da umidade em feridas exsudativas e limpas, sendo contraindicados em feridas secas. Ademais, ambos devem ser utilizados com cautela devido à possibilidade de causar agressão tecidual grave e prejudicar a cicatrização (MANDELBAUM et al., 2003b; MURPHY; EVANS, 2012).

A sulfadiazina de prata é o antimicrobiano mais utilizado no tratamento tópico de feridas por queimaduras. Possui efeito bactericida por combinação do nitrato de prata com a sulfadiazina e, apesar de baixo custo, sua limitação pode ser observada pelo surgimento de bactérias resistentes e pela possibilidade de retardar a cicatrização das feridas em virtude da inibição do crescimento de queratinócitos e fibroblastos (CHURCH et al., 2006; MURPHY; EVANS, 2012). De fato, Rosen et al. (2015) estudaram o efeito tópico da sulfadiazina de prata em feridas queimadas em camundongos e verificaram fechamento tardio, associado à reduzida re-epitelização e deposição de colágeno, aumento do infiltrado de neutrófilos, redução de macrófagos e deficiente produção de citocinas pró-inflamatórias da família da IL-1.

Os fatores de crescimento são opções avançadas para o tratamento de feridas cutâneas que são utilizados em virtude dos efeitos endógenos reconhecidos. Embora sejam muito estudadas, tais moléculas apresentam pouca aplicabilidade na prática clínica para o reparo de feridas, pois possuem custo muito elevado e necessitam de mais estudos que determinem com clareza sua segurança e eficácia (MANDELBAUM et al., 2003b; MURPHY; EVANS, 2012). O VEGF, por exemplo, estimula a redução do tamanho de feridas diabéticas em humanos. Por outro lado, para o mesmo tipo de lesão, o FGF parece não exercer efeitos sobre a redução na área das feridas (EVERETT; MATHIOUDAKIS, 2018).

Os substitutos da pele são exemplos de terapias cicatrizantes atuais que apresentam boa eficácia e foram desenvolvidas principalmente para o tratamento de feridas ocasionadas por queimaduras. No entanto, ainda assim, apresentam inúmeras limitações que dificultam sua aplicabilidade. Para o autoenxerto, modalidade preferível, pode não haver tecido suficiente para a cobertura da lesão, enquanto no aloenxerto ou xenoenxerto podem ocorrer complicações como rejeição tecidual e transmissão de doenças. Por outro lado, os substitutos bio sintéticos da pele são opções mais avançadas e eficazes na cicatrização que apresentam vantagens como alta quantidade disponível e baixo risco de infecção ou reação imunológica, mas sua grande limitação está associada ao alto custo (MURPHY; EVANS, 2012).

Embora se tenha uma grande variedade de recursos disponíveis para o tratamento de feridas, não existe uma indicação única para a cura. As lesões devem ser avaliadas em relação à causa, tempo, tipo de fechamento, estágio do processo, localização e tamanho da lesão. Além disso, existe uma variedade de limitações que impedem a aplicabilidade de produtos convencionais na prática clínica. De forma geral, o desenvolvimento rápido de recursos terapêuticos tem resultado na ocorrência de agentes sem eficácia bem definida, sendo então utilizado na maioria das vezes por experiência clínica. Dessa forma, o campo de estudo por agentes cicatrizantes tem avançado com o intuito de se obter produtos mais eficazes, seguros, acessíveis e com produção mais simples e menos onerosa para a população (DAS; BAKER, 2016; DUQUE et al., 2016; MURPHY; EVANS, 2012).

2.6. Plantas medicinais no tratamento de feridas

Estima-se que grande parte da população mundial tem utilizado terapias alternativas para o reparo de feridas. Em países em desenvolvimento, cerca de 80% da população depende do uso de produtos de origem vegetal, sendo que o emprego de plantas medicinais para o tratamento em humanos tem aumentado consideravelmente. Assim, os métodos não convencionais têm sido cada vez mais pesquisados para comprovar seus benefícios clínicos e, com isso, desenvolver novas terapias para o uso prático na cicatrização de feridas. Para estes produtos, diferentemente dos convencionais, observam-se eficácia clínica associada a menor tempo de cura e maior qualidade no reparo, além de fácil obtenção, manipulação, acessibilidade e menores custos (JAIN et al., 2019; PEREIRA; BARTOLO, 2013).

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta e rico conhecimento tradicional associado à utilização de ervas medicinais. Sendo assim, o mais recente estímulo nacional à pesquisa por recursos terapêuticos oriundos de plantas medicinais foi criado, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. O intuito desse programa é estabelecer ações para a melhoria na qualidade de vida humana mediante a garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. Para isso, as diretrizes desenvolvidas estimulam a pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica, garantia de acessibilidade e eficácia para a saúde, utilização sustentável dos recursos e fortalecimento da indústria farmacêutica de fitoterápicos (BRASIL, 2016).

Aliado à tendência nacional para a utilização de recursos de origem vegetal, o desenvolvimento de novos agentes cicatrizantes está concentrado em produtos que modulam células e/ou moléculas que participam das distintas fases do reparo tecidual (GANTWERKER; HOM, 2011; JAIN et al., 2019). Nesse contexto, muitas pesquisas apresentam fortes evidências da eficácia de plantas medicinais no tratamento de feridas cutâneas, inclusive modulando células e moléculas, com efeitos benéficos principalmente sobre o processo inflamatório (ESTEVÃO et al., 2017; LUO et al., 2018; PEREIRA et al., 2018; TESSEMA et al., 2018). Dessa forma, diversas plantas amplamente utilizadas na medicina tradicional foram alvo de investigação científica e tiveram seu efeito cicatrizante comprovado (RIBEIRO et al., 2018).

A *Aloe vera* (Babosa) é uma das ervas terapêuticas mais utilizada na medicina tradicional desde os tempos antigos (VOGLER, 1999). Dessa forma, esse vegetal demonstrou efeito benéfico sobre o reparo de lesões dérmicas em modelo animal de cicatrização (ATIBA et al., 2011), sendo inclusive utilizada com eficácia cicatrizante no tratamento de feridas em humanos (MOLAZEM et al., 2015). Atiba et al. (2011) avaliaram o efeito da administração oral da *A. vera* em feridas excisionais em ratos diabéticos, com foco principal em investigar o possível mecanismo cicatrizante dessa espécie vegetal. Os autores comprovaram que a *A. vera* favoreceu o reparo de lesões excisionais em ratos diabéticos por atuar aumentando a expressão do VEGF e TGF- β 1, fundamentais para a estimulação de endoteliócitos e fibroblastos que favorecem o reparo tecidual.

A *C. langsdorffii*, conhecida popularmente como copaíba, é uma planta muito utilizada em virtude dos efeitos medicinais anti-inflamatório, antimicrobiano e cicatrizante. De fato, essas propriedades farmacológicas têm estimulado investigações sobre sua atividade e mecanismo associados ao reparo de lesões de pele (MASSON-MEYERS, 2013; PAIVA et al., 2002). Gushiken et al. (2017) observaram efeito cicatrizante da *C. langsdorffii* em feridas cutâneas excisionais de ratos por meio da redução das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α e aumento da citocina IL-10. Uma outra espécie de copaíba, a *C. paupera*, favoreceu a cicatrização de feridas diabéticas em camundongos mediante diminuição de TNF- α e IL-1 β e aumento de IL-10, importantes efeitos que promoveram melhor organização das fibras de colágeno nas lesões (AMORIM et al., 2017).

A *Schinus terebinthifolius*, conhecida como Aroeira, é uma planta medicinal amplamente utilizada pela população para o tratamento de feridas. Aliado às suas propriedades biológicas, a *S. terebinthifolius* demonstra grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos (CARVALHO et al., 2013). Dessa forma, na cicatrização de feridas, Estevão et al. (2017) reportaram que a *S. terebinthifolius* possui ação sobre o reparo de lesões excisionais em ratos mediante redução do tamanho das feridas, associado à diminuição do infiltrado de leucócitos (neutrófilos e macrófagos) e da quantidade de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , CXCL-1 e CCL-2). Além disso, os autores observaram maior número de vasos sanguíneos e na deposição de fibras de colágeno.

A *Calendula officinalis* (Margarida) é utilizada tradicionalmente para o tratamento de inúmeras doenças da pele. Em virtude disso, pesquisas foram realizadas para determinar seu efeito cicatrizante e mecanismo de ação. Parente et al. (2011) demonstraram que a *C. officinalis* favoreceu a angiogênese de feridas excisionais em ratas fêmeas sem relação direta com a expressão do VEGF. Outro mecanismo cicatrizante foi demonstrado por Hormozi et al. (2019), que observaram que a *C. officinalis* estimulou a proliferação de fibroblastos embrionários de camundongos mediante aumento da expressão de TGF- β 1 e bFGF, sugerindo que esse efeito pode melhorar a função de fibroblastos e favorecer a cicatrização de feridas. Além disso, um ensaio clínico demonstrou que a pomada de *C. officinalis* acelerou a cicatrização de feridas cesarianas em mulheres primíparas (JAHDI et al., 2018).

Nesse sentido, ervas medicinais como *A. vera*, *C. langsdorffii*, *S. terebinthifolius* e *C. officinalis* compõem os principais recursos naturais de origem vegetal que são amplamente utilizados na medicina popular brasileira e que foram alvo de estudos para determinar sua eficácia e mecanismo de ação na cicatrização de feridas. No entanto, para a *A. colubrina*, embora exista comprovação da atividade cicatrizante (PESSOA et al., 2012; PESSOA et al., 2015), os mecanismos de ação celulares e moleculares envolvidos no processo de reparo da pele permanecem pouco estabelecidos, principalmente no contexto do processo inflamatório (RIBEIRO et al., 2018).

2.6.1. *Anadenanthera colubrina*

De acordo com Altschul (1964), o gênero *Anadenanthera* é composto por duas espécies: *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. O autor descreve ainda duas variedades para a espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, a *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul, encontrada principalmente em regiões de Caatinga, e a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina*, menos comum em regiões de Caatinga e mais presente em florestas estacionais (QUEIROZ, 2009).

A *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul é comumente encontrada no bioma Caatinga brasileiro e apresenta crescimento arbustivo a arbóreo, com até 25 m de altura (Figura 8A). Exibe casca espessa lisa e espiculada, de coloração branca-acinzentada a cinza-escura, sendo avermelhada internamente (Figura 8B). As folhas são bipinadas, as flores brancas a amareladas e os frutos em formato de vagens delgadas marrom-escuras, com sementes achatadas e escuras (ALBUQUERQUE et al., 2007; CARTAXO et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2018).

Conhecida popularmente como angico, *A. colubrina* é comumente utilizada para construções de cercas, combustível para a culinária e madeira para o artesanato (MONTEIRO et al., 2006a). Outras utilidades são de suas folhas secas ou fenadas para alimentação animal, pólen e néctar de flores para a produção apícola, paisagismo, reflorestamento de terrenos (CARVALHO, 2002), curtimento de couro pelo alto teor de tanino na casca (QUEIROZ, 2009) e, principalmente, é uma das plantas mais citadas com efeitos medicinais em regiões onde é endêmica (AGRA et al., 2007).

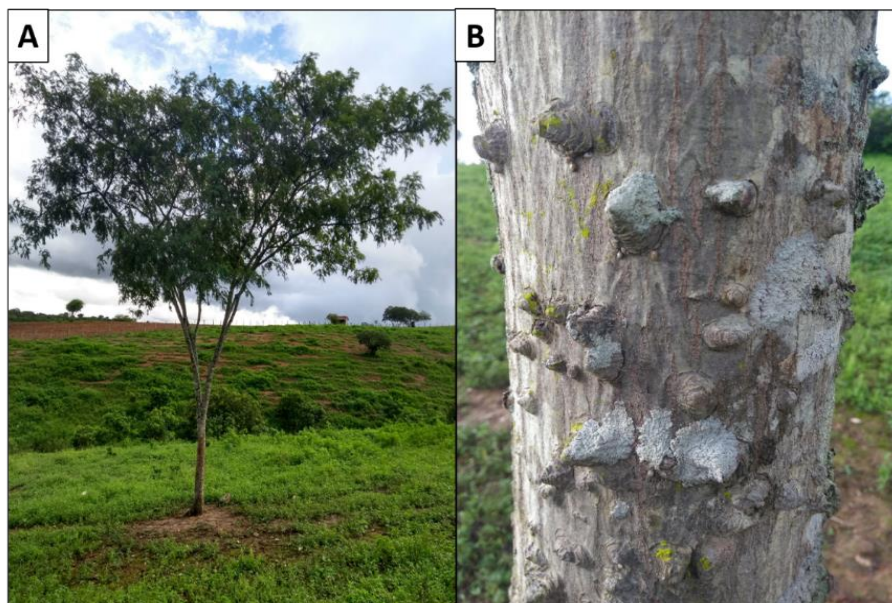


Figura 8- Árvore (A) e casca do caule (B) da espécie *A. colubrina*. Fonte: Próprio autor, 2020.

A *A. colubrina* é amplamente utilizada na medicina popular e empregada na produção de fitoterápicos para o tratamento de afecções respiratórias, oncológicas, dermatológicas, digestivas, infecciosas e inflamatórias (ALBUQUERQUE et al., 2007; CARTAXO et al., 2010). Geralmente é utilizada em preparações de uso oral em forma de xarope, infusão, maceração, decocção, tintura, garrafada e chá e, para uso tópico, é aplicada em forma de cataplasma e decocção (AGRA et al., 2007; CARVALHO, 2002; MONTEIRO et al., 2006a; MONTEIRO et al., 2006b). A casca é a parte mais utilizada em preparações medicamentosas, sendo rica em compostos fenólicos, como os taninos e flavonoides, relacionados como os principais responsáveis pelas propriedades farmacológicas atribuídas à *A. colubrina* (WEBER et al., 2011).

Diversos metabólitos secundários são encontrados na *A. colubrina*, incluindo alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, terpenoides e esteroides (WEBER et al., 2011). Gutierrez-Lugo et al. (2004) reportaram flavonoides (anadantoflavona e apigenina), terpenoides (alnusenol, β -amirina, α -amirina, lupeol, lupeona, ácido betulínico) e esteroides (β -sitosterol e estigmasterol) em partes aéreas. A casca é rica em compostos fenólicos (flavonoides e taninos). Os flavonoides representam cerca de 45%, enquanto os taninos 10% do extrato da casca (MOTA et al., 2017). Pessoa et al. (2012) identificaram na casca proantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas, açúcares redutores, flavonoides (glicosídeos quercetínicos), saponinas, triterpenos e esteroides.

Os efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo da *A. colubrina* administrada por via oral foram observados por Santos et al. (2013) em modelo murino de inflamação induzida por carragenina e nocicepção induzida por ácido acético. Os autores ainda ressaltaram que esse vegetal possui componentes ativos candidatos ao desenvolvimento de agentes terapêuticos para inflamação e dor, mas os mecanismos envolvidos devem ser melhor investigados. Guarneire et al. (2019) também reportaram potencial anti-inflamatório do extrato de *A. colubrina* mediante a inibição da produção de TNF- α e NO (Óxido Nítrico) por macrófagos *in vitro*.

Além dos efeitos anti-inflamatórios, foi demonstrado anteriormente que a *A. colubrina* apresenta atividade antioxidante por reduzir radicais livres *in vitro*, sendo essa propriedade associada à rica quantidade de taninos no vegetal (MELO et al., 2010). Ademais, outro potencial farmacológico importante para a *A. colubrina* já observado foi o seu efeito antimicrobiano, demonstrando potencial contra a bactéria *S. aureus in vitro* (ARAÚJO et al., 2014) e no controle e crescimento do biofilme da bactéria *P. aeruginosa* (TRENTIN et al., 2013).

Nesse contexto, a *A. colubrina* é uma planta medicinal candidata à produção de fitoterápicos, mas necessita de mais estudos farmacológicos. Segundo Weber e colaboradores (2011), a *A. colubrina* apresenta grande potencial terapêutico com base na medicina popular, porém são necessárias mais investigações científicas dos mecanismos de ação dessa espécie. Os autores afirmam que é uma planta medicinal muito explorada do ponto de vista etnobotânico e econômico, mas pouco investigada farmacologicamente.

Na cicatrização de feridas, o extrato da casca da *A. colubrina* a 5% foi eficiente no reparo de feridas excisionais em ratos, aumentando o número de vasos sanguíneos (PESSOA et al., 2012), de fibroblastos e da deposição de colágeno, sem que houvessem diferenças para o percentual de redução da área das feridas (PESSOA et al., 2015). No entanto, os estudos sobre o efeito da *A. colubrina* no reparo da pele continuam escassos e os mecanismos cicatrizantes devem ser mais bem explorados, com intuito de comprovar a segurança da eficácia na cicatrização de feridas e justificar sua utilização na medicina tradicional.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Investigar o efeito do extrato etanólico de *A. colubrina* na cicatrização de feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito do extrato etanólico de *A. colubrina* sobre:

- O grau de redução da área das feridas cutâneas excisionais durante o processo de cicatrização;
- O infiltrado leucocitário, vascularização, re-epitelização e deposição de colágeno nas lesões;
- A atividade da Mieloperoxidase para determinação indireta do infiltrado de neutrófilos nas feridas;
- A atividade da N-acetil- β -D-glicosaminidase para quantificação indireta do infiltrado de macrófagos nas feridas;
- As citocinas pró-inflamatória TNF- α e anti-inflamatória IL-10 nas lesões em processo de cicatrização.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta e identificação do material vegetal

Cascas e entrecascas do caule de uma árvore adulta de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul (Fabaceae) foram coletadas entre 50 e 120 cm acima do nível do solo (MORIM, 2015) (Figura 9). A coleta foi realizada em 25 de novembro de 2018, durante o período de estiagem, no município de Monte Alegre de Sergipe, Sergipe, Brasil (226 m de altitude, latitude 10° 2' 44" S e longitude 37° 35' 4" W). A espécie foi autenticada pelo Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, do Departamento de Biociências da Universidade Federal de Sergipe (UFS), e depositada no Herbário da UFS (ASE) (Av. Marechal Rondon S/N, São Cristóvão-SE, 49100-000, Brasil, sob o nº ASE 42361).

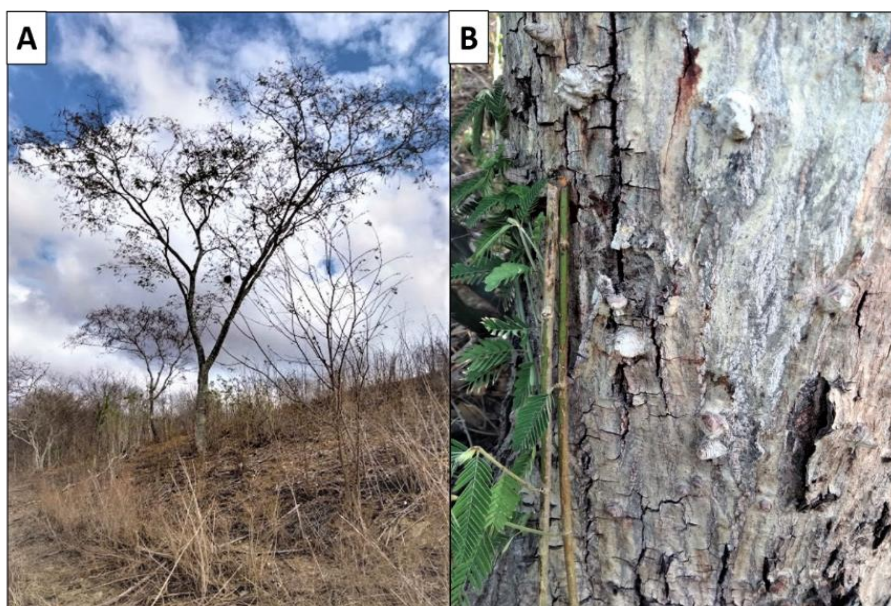


Figura 9- Árvore adulta da espécie *A. colubrina* (A) e casca do caule (B) utilizada para obtenção do extrato. Fonte: Próprio autor, 2018.

4.2. Obtenção e formulação do extrato da casca de *A. colubrina*

Após a coleta, as cascas e entrecascas foram acondicionadas em estufa de secagem a 40°C (± 2) por 72 horas (Figura 10A). Posteriormente, foi realizada a redução das partículas em moinho de facas e pesagem, sendo obtido 1,1 kg de pó (Figuras 10B e 10C). O material obtido foi submetido à maceração exaustiva em etanol absoluto, permanecendo em contato com o solvente por 72 horas (processo repetido por três vezes consecutivas) (Figura 10D).

Posteriormente, o líquido foi filtrado, resultando em 8,2 L que foi submetido à evaporação rotativa a 40-45°C (Fisatom®, São Paulo/SP, Brasil) (Figura 10E). O extrato seco resultante foi de 338 g, com o rendimento de 30,73%, que foi embalado em recipiente âmbar e armazenado a 2-8°C (Figura 10F). Para a formulação tópica, 5 g do extrato seco foi diluído em 100 mL de veículo contendo Dimetilsulfóxido (DMSO) a 2% em Propilenoglicol (PG), resultando no Extrato Etanólico de *A. colubrina* a 5% (EEAc 5%) (GAO et al., 2015; PESSOA et al., 2012).

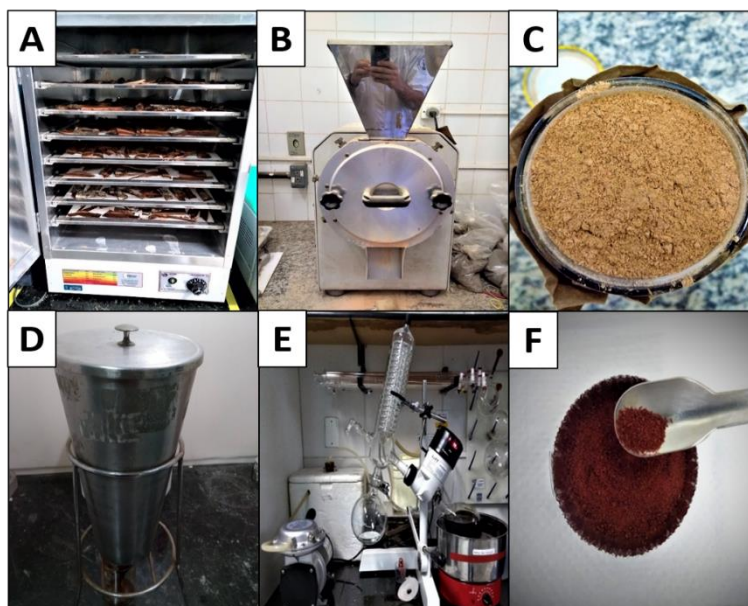


Figura 10- Processo de obtenção do extrato de *A. colubrina*. Secagem (A), moagem (B), pó obtido (C), maceração exaustiva (D), evaporação rotativa (E) e obtenção do extrato seco (F). Fonte: Laboratório de Ensaios Farmacêuticos e de Toxicidade da UFS, 2019.

4.3. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*), fêmeas, não prenhes, híginas, pesando entre 25-30 g e com 8-12 semanas de idade. Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de polipropileno, com $21 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, $60 \pm 5\%$ de umidade e ciclo de 12 horas claro/escuro, além de alimentação e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes adotadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFS sob o nº de protocolo 07/2019 (Anexo I).

4.4. Indução da ferida excisional

Antes da realização do experimento, os animais foram submetidos a um período de sete dias para ambientação (ALKAFIFY et al., 2014). Foram utilizadas como medicações anestésicas quetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Foi realizada tricotomia da região dorsotorácica, seguida de antissepsia com clorexidina alcoólica a 0,5%. Posteriormente, a excisão cutânea foi produzida de forma circular com *punch* metálico de 6 mm (Figura 11) (CANESSO et al., 2014; PESSOA et al., 2012).

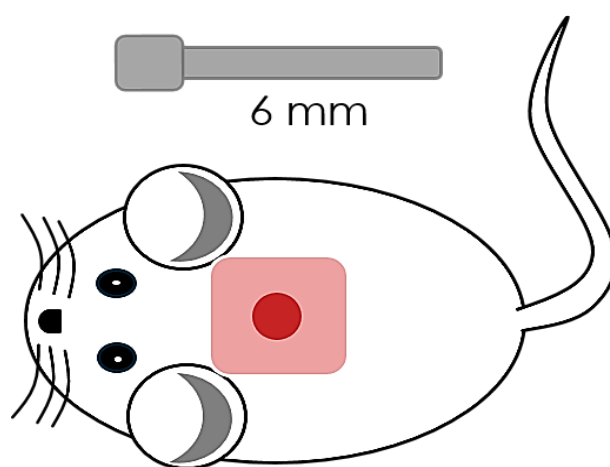


Figura 11- Modelo experimental de excisão cutânea circular com punch metálico de 6 mm.
 Fonte: Próprio autor, 2020.

4.5. Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: salina estéril a 0,9% (controle), DMSO a 2% em PG (veículo) ou EEAc 5%. Os tratamentos foram realizados imediatamente após a confecção das feridas e a cada 24 horas, durante 14 dias, sendo a quantidade determinada por 30 μ L (1,5mg de EEAc/ferida/dia). Os animais foram eutanasiados para a coleta do tecido em função do tempo de cicatrização nos dias 1, 3, 7 e/ou 14 (Figura 12).

A concentração do tratamento foi escolhida considerando estudos anteriores com o extrato da casca de *A. colubrina* a 5% na cicatrização de feridas cutâneas em ratos (PESSOA et al., 2012; PESSOA et al., 2015). Associado a isso, foi realizado experimento piloto com a *A. colubrina* a 5% e 10%, obtendo melhores taxas de contração das feridas a 5% (dados não mostrados) e optando por utilizar essa concentração para reduzir a utilização de animais de experimentação.

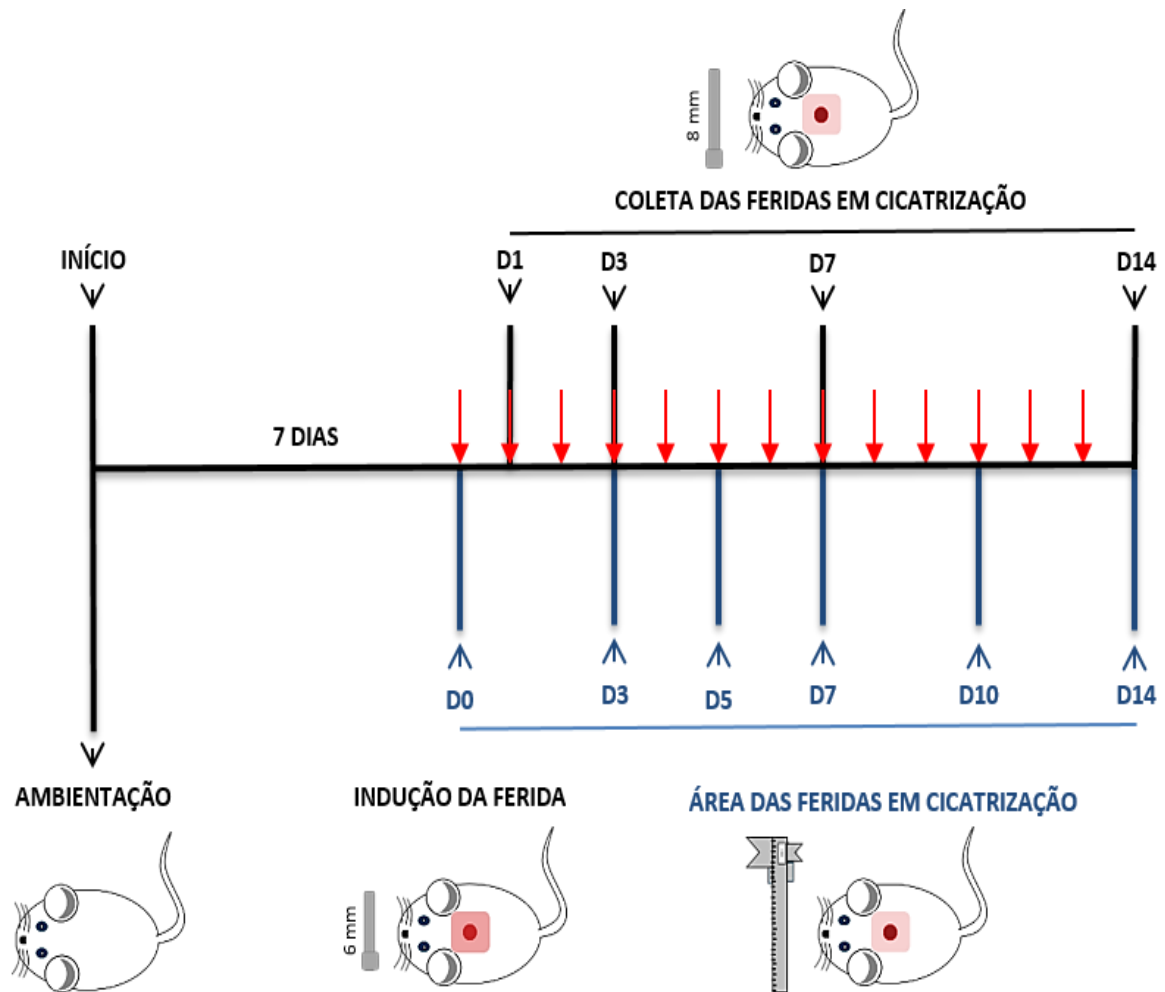


Figura 12- Delineamento experimental. Os animais foram ambientados 7 dias antes da indução das lesões, os tecidos coletados nos dias 1, 3, 7 e/ou 14 (realce preto), as feridas mensuradas nos dias 0, 3, 5, 7, 10 e 14 (realce azul) e o tratamento tópico realizado a cada 24 horas (setas vermelhas), durante 14 dias. D= dia. Fonte: Próprio autor, 2020.

4.6. Avaliação das feridas

4.6.1. Área da ferida em cicatrização

As feridas foram mensuradas através de paquímetro digital nos dias 0 (ferida inicial), 3, 5, 7, 10 e 14 (n=7/grupo) (Figura 12). Foi calculada a área da ferida de acordo com a equação: Área da ferida (mm²) = $\pi \cdot R \cdot r$, onde $\pi = 3,1416$, R= raio crânio-caudal e r= raio látero-lateral (RAMSEY et al., 1995). Todas as feridas foram fotografadas nos tempos mencionados, com os animais contidos manualmente e câmera fixada à distância padrão de 10 cm, a fim de realizar comparações entre os grupos e os tempos de cicatrização.

4.6.2. Coleta de tecido

Os animais foram eutanasiados com sobredose de quetamina (300 mg/kg, i.p.) e xilazina (30 mg/kg, i.p.) e submetidos à coleta de fragmentos de pele com o auxílio de *punch* de 8 mm, incluindo a área íntegra e da lesão (CANESSO et al., 2014). Os tempos de coleta foram escolhidos com base em estudos anteriores (CANESSO et al., 2014; ESTEVÃO et al., 2017) e priorizando os tempos que correspondem à fase inflamatória da cicatrização para mensuração de MPO e NAG (1º, 3º e 7º dia) e quantificação de TNF- α e IL-10 (1º e 3º dia) (n=5-7/tempo/grupo). Ademais, a análise dos parâmetros histológicos (n=5/grupo) foi realizada com objetivo de verificar a qualidade da cicatriz ao final do experimento (14º dia). Afora isso, houve criteriosa escolha dos tempos em virtude de aspectos éticos, com intuito de reduzir a utilização de animais de experimentação (SAMI et al., 2019).

4.6.3. Avaliação histológica

Para a avaliação histológica, os tecidos foram seccionados ao meio em dois fragmentos, permanecendo a cicatriz da ferida centralizada. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em álcool, diafinizados em xilol, impregnados em parafina (60°C) e cortados em micrótomo (5 μ m). Foram preparadas lâminas em duplicata para coloração por Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricromo de Masson. Os cortes foram observados em 10 áreas diferentes ao microscópio óptico (Nikon, Japão) e as imagens captadas por câmera digital (coolpix 4500, Roper Scientific, Japão). As análises foram realizadas por dois indivíduos de maneira cega e utilizando uma escala de 0 a 3, conforme adaptação realizada a partir de Estevão et al. (2019), para: infiltrado leucocitário, vascularização, re-epitelização e deposição de colágeno, onde: 0- ausente, 1- leve, 2- moderado e 3- acentuado (Apendice I).

4.6.4. Mensuração da atividade da Mieloperoxidase

Foi realizada a quantificação da atividade de Mieloperoxidase (MPO) para avaliação indireta do infiltrado de neutrófilos. Os tecidos foram homogeneizados em Tampão Fostato de Sódio (PBS) e Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB) a 0,5%, na proporção de 1mL/100mg de tecido. Após isso, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 14000 rpm. Foram utilizados 20 μ L de sobrenadante para a reação juntamente com 200 μ L da solução de O-dianisidina e, por fim, a absorbância das amostras foi determinada em 460 nm (BRADLEY et al., 1982).

4.6.5. Mensuração da atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase

Para a determinação indireta do infiltrado de macrófagos nas lesões, foi realizada a quantificação da atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG). As amostras foram homogeneizadas em tampão de extração de citocinas (PBS contendo coquetel de inibidor de protease, Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF), Cloreto de sódio (NaCl), Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) e Tween 20) e centrifugadas. O *pellet* foi ressuspensionado em Buffer e homogeneizado, sendo adicionado em seguida o NaCl 0,2% e NaCl 1,6% com glicose 5%. Em seguida, foi realizada homogeneização, centrifugação e ressuspensão do *pellet* em NaCl 0,9% e Triton x-100 0,1% (1:1). O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de NAG juntamente com 0,767 mg/mL de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminida. A placa, contendo o substrato e as amostras, foi incubada a 37°C por 30 minutos e, após isso, a reação foi parada com tampão contendo glicina 0,2 M. As amostras foram analisadas em 405 nm. Por fim, o resultado foi normalizado pelo peso do tecido e expresso em Densidade Óptica (OD) (BAILEY, 1988).

4.6.6. Quantificação de citocinas

As amostras foram homogeneizadas em tampão de extração de citocinas (PBS contendo coquetel de inibidor de protease, PMSF, NaCl, EDTA e Tween 20) e centrifugadas. Posteriormente, o sobrenadante foi utilizado para a quantificação das citocinas TNF- α e IL-10 por kits para ELISA de acordo com o protocolo do fabricante (Peprotech®, USA).

4.7. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, ANOVA de uma ou duas vias e pós-teste de Bonferroni. As análises foram realizadas no GraphPad Prism 8 e os dados expressos como média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM) ou mediana e intervalo interquartil para os escores dos parâmetros histológicos. Por fim, os resultados de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do EEAc 5% sobre a área das feridas cutâneas excisionais

As áreas das feridas tratadas com o EEAc 5% foram significativamente menores ($p < 0,001$) nos tempos de 3 (10,47 mm² ± 0,31), 5 (5,97 mm² ± 0,16) e 7 dias (4,42 mm² ± 0,31), quando comparadas às lesões tratadas com controle (14,92 mm² ± 0,98, 11,42 mm² ± 0,99 e 11,01 mm² ± 0,81, respectivamente) ou veículo (15,15 mm² ± 1,41, 10,50 mm² ± 0,26, e 9,12 mm² ± 0,65, respectivamente) (Figura 13).

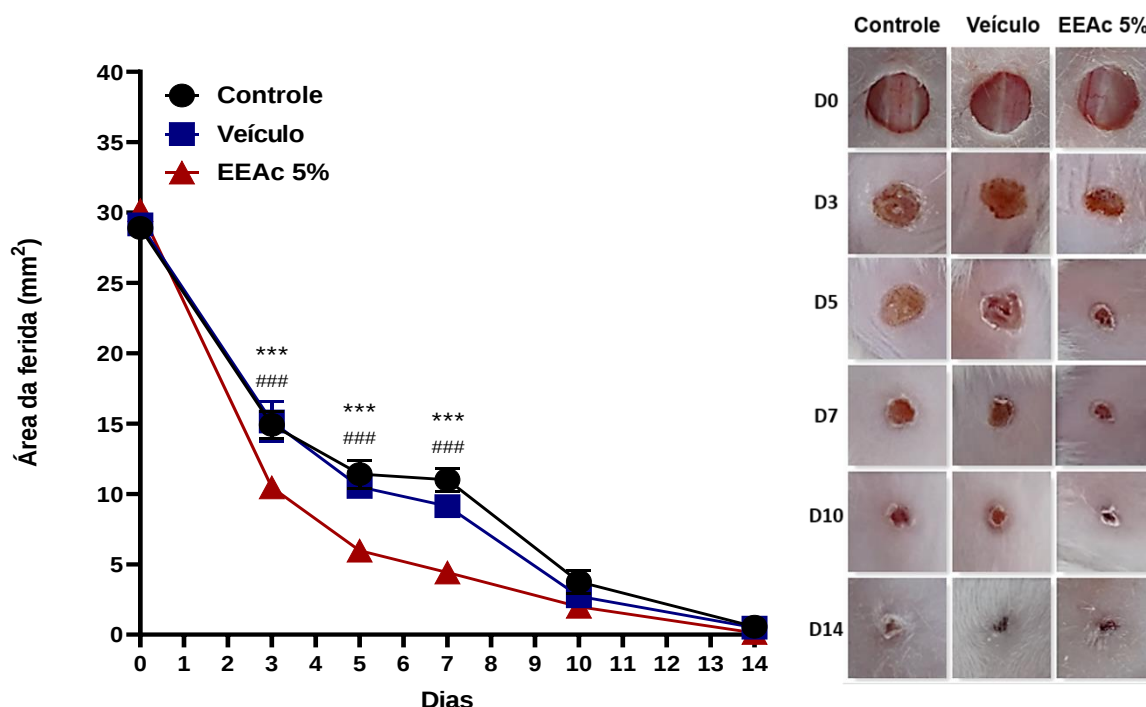


Figura 13- Efeito do EEAc 5% sobre a área das feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos. Os animais foram tratados topicamente e divididos em grupos: Controle (salina 0,9%), Veículo (DMSO 2% em PG) ou EEAc 5% (Extrato Etanólico de *A. colubrina* 5%). A área das lesões foi determinada mediante a equação Área da ferida (mm²) = $\pi \cdot R \cdot r$. (esquerda) e representada em fotografias (direita) nos tempos de 0, 3, 5, 7, 10 e 14 dias. D= Dia. n= 7 por grupo. Resultados expressos como média ± EPM, analisados pela ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. Dados com ***p<0,001 e ####p<0,001 são considerados significativos quando comparados ao controle ou veículo, respectivamente.

5.2. Efeito do EEAc 5% sobre os parâmetros histológicos das lesões

As lesões do 14º dia de cicatrização foram avaliadas em escores para infiltrado leucocitário, vascularização, re-epitelização e deposição de colágeno. Não foram observadas diferenças para infiltrado leucocitário, vascularização e re-epitelização entre os tratamentos. No entanto, observou-se aumento na deposição de colágeno ($p < 0,01$) em feridas tratadas com EEAc 5%, quando comparadas ao controle ou veículo (Tabela 1 e Figura 14).

Tabela 1- Efeito do EEAc 5% sobre os parâmetros histológicos das feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos.

Grupo	Parâmetro Histológico (Escore 0-3)			
	Infiltrado Leucocitário	Vascularização	Re-epitelização	Deposição de Colágeno
Controle	1,30 (0,30)	1,95 (0,50)	2,30 (0,45)	1,8 (0,50)
Veículo	1,35 (0,27)	1,77 (0,74)	2,45 (0,79)	1,7 (0,20)
EEAc 5%	1,25 (0,52)	2,35 (1,45)	2,30 (0,71)	2,5 (0,20) ^{ab}

Os animais foram tratados topicamente e divididos em grupos: Controle (salina 0,9%), Veículo (DMSO 2% em PG) ou EEAc 5% (Extrato Etanólico de A. colubrina 5%). Os tecidos foram coletados ao 14º dia de cicatrização para determinação, mediante escores, do infiltrado leucocitário, vascularização, re-epitelização e deposição de colágeno. n= 5 por grupo. Resultados expressos como mediana e intervalo interquartil, analisados pela ANOVA de uma via e pós-teste de Bonferroni. Dados com a= $p < 0,01$ ou b= $p < 0,01$ são considerados significativos quando comparados ao controle ou veículo, respectivamente.

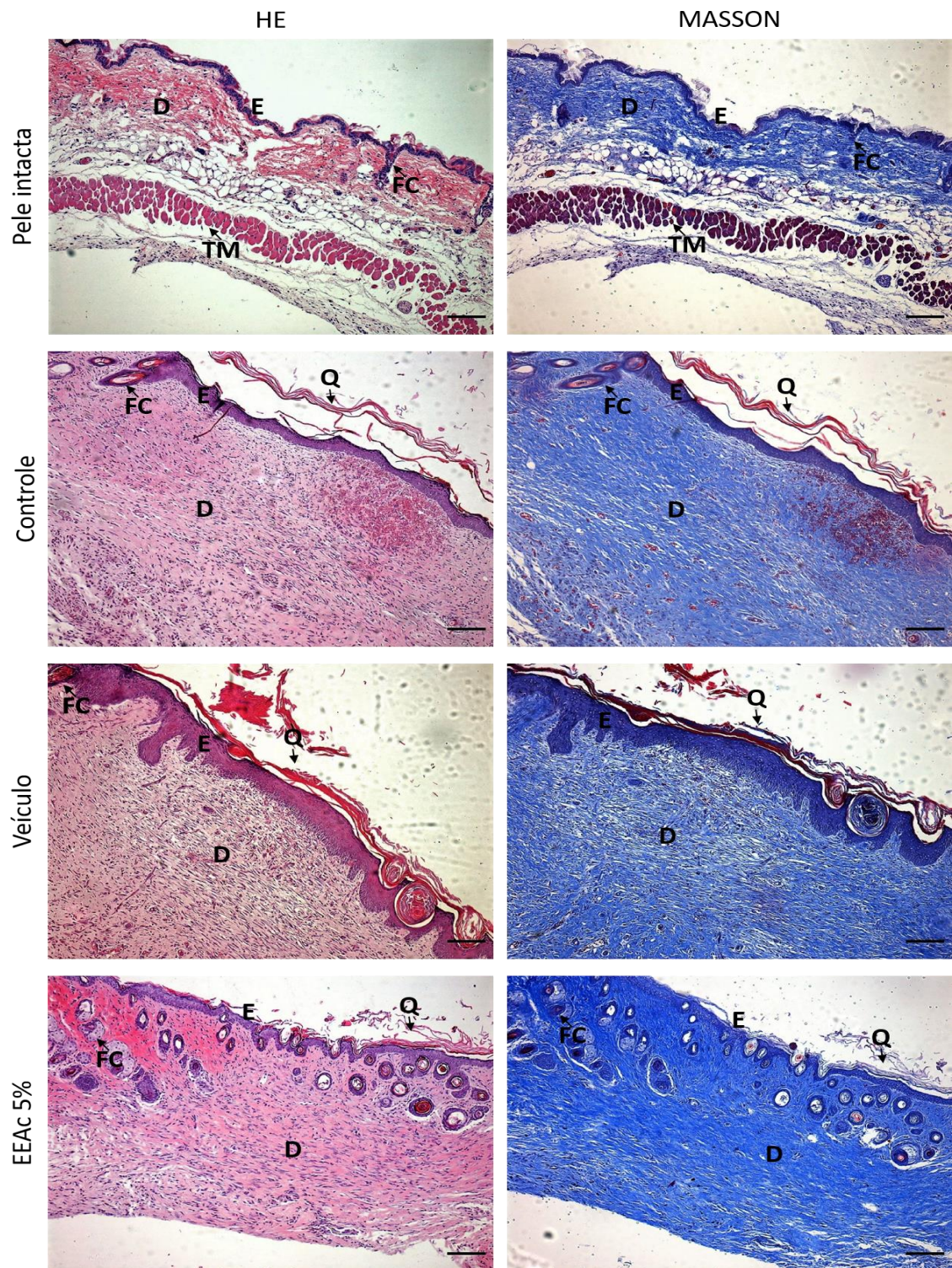


Figura 14- Representação do efeito do EEAc 5% sobre os parâmetros histológicos das feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos. Os animais foram tratados topicamente e divididos em grupos: Controle (salina 0,9%), Veículo (DMSO 2% em PG) ou EEAc 5% (Extrato Etanólico de *A. colubrina* 5%). Os tecidos foram coletados ao 14º dia de cicatrização para análise histológica e as fotomicrografias, coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricromo de Masson (MASSON), em aumento de 100x (100µm), representam a Pele intacta e os grupos Controle, Veículo e EEAc 5%, respectivamente. D- Derme; E- Epiderme; FC- Folículo Capilar; Q- Queratina; TM- Tecido Muscular.

5.3. Efeito do EEAc 5% sobre a atividade de MPO nas feridas

A atividade da enzima MPO foi avaliada nos dias 1, 3 e 7 em todos os grupos para determinar o infiltrado de neutrófilos nas feridas. Foi observada redução significativa nas lesões tratadas com EEAc 5% no tempo de 3 dias (7,90 uMPO/mg de tecido $\pm$ 1,12), quando comparadas ao controle (14,08 uMPO/mg de tecido $\pm$ 3,81, $p < 0,01$) ou veículo (15,92 uMPO/mg de tecido $\pm$ 4,46, $p < 0,001$) (Figura 15).

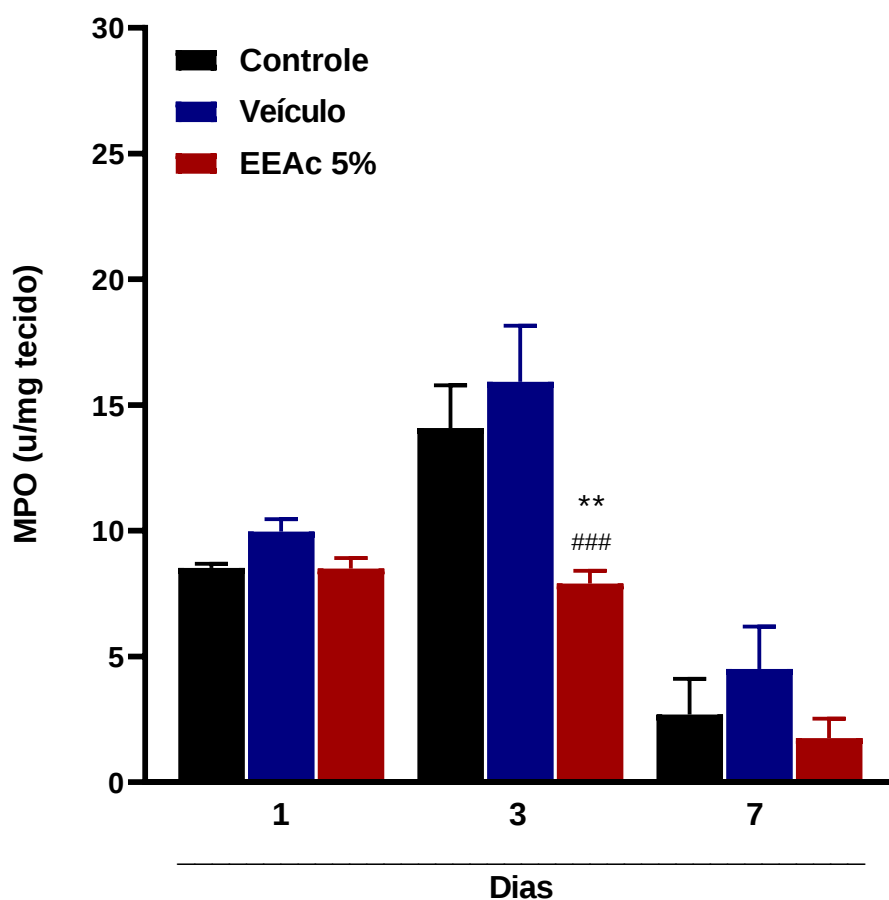


Figura 15- Efeito do EEAc 5% sobre a atividade de Mieloperoxidase nas feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos. Os animais foram tratados topicamente e divididos em grupos: Controle (salina 0,9%), Veículo (DMSO 2% em PG) ou EEAc 5% (Extrato Etanólico de *A. colubrina* 5%). As lesões foram coletadas nos dias 1, 3 e 7 para verificar a atividade da enzima MPO, representada em uMPO/mg de tecido. $n = 5-7$ por grupo e tempo. Resultados expressos como média $\pm$ EPM, analisados pela ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. Dados com ** $p < 0,01$ ou ### $p < 0,001$ são considerados significativos quando comparados ao controle ou veículo, respectivamente.

5.4. Efeito do EEAc 5% sobre a atividade de NAG nas feridas

A quantificação da enzima NAG foi avaliada nos dias 1, 3 e 7 de todos os grupos para determinar o infiltrado de macrófagos nas feridas. Para tanto, foi observado aumento significativo nas lesões tratadas com EEAc 5% no tempo de 7 dias (1,16 NAG OD $\pm$ 0,10), quando comparadas ao controle (0,64 NAG OD $\pm$ 0,03, $p < 0,001$) ou veículo (0,73 NAG OD $\pm$ 0,03, $p < 0,001$) (Figura 16).

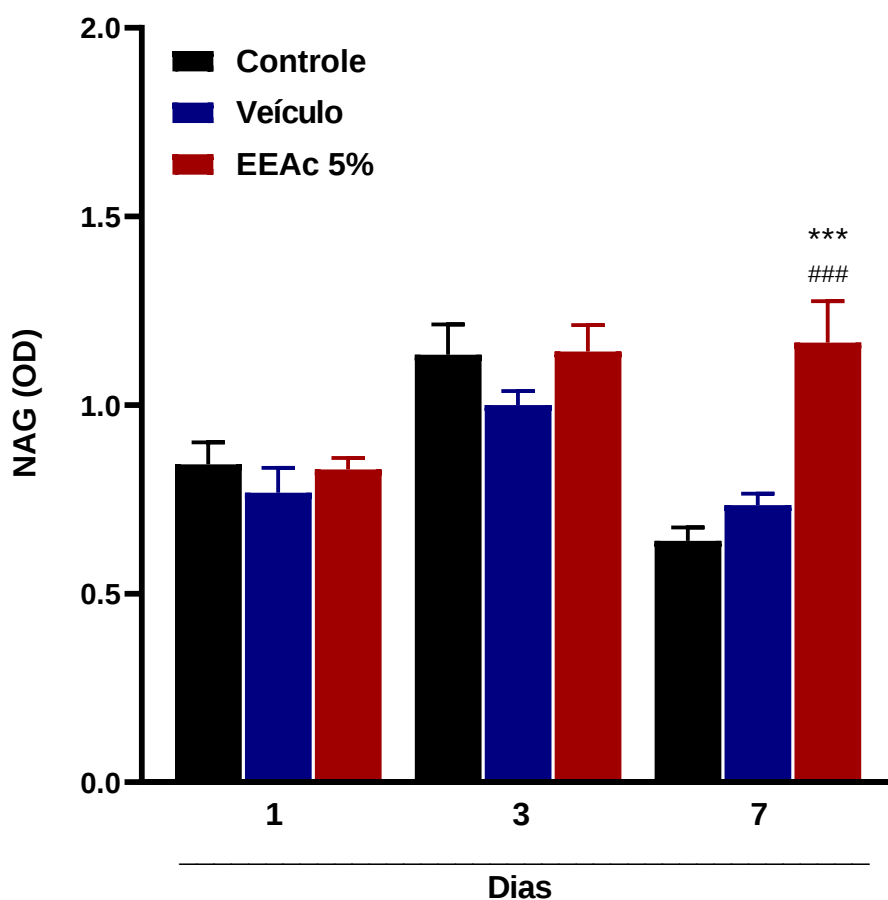


Figura 16- Efeito do EEAc 5% sobre a atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase nas feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos. Os animais foram tratados topicamente e divididos em grupos: Controle (salina 0,9%), Veículo (DMSO 2% em PG) ou EEAc 5% (Extrato Etanólico de *A. colubrina* 5%). As lesões foram coletadas nos dias 1, 3 e 7 para verificar a atividade da enzima NAG, representada em OD. OD= Densidade Ótica. n= 5-7 por grupo e tempo. Resultados expressos como média $\pm$ EPM, analisados pela ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. Dados com *** $p < 0,001$ ou ### $p < 0,001$ são considerados significativos quando comparados ao controle ou veículo, respectivamente.

5.5. Efeito do EEAc 5% sobre a quantidade de TNF- α nas lesões

Para a avaliação do perfil pró-inflamatório foi realizada a quantificação de TNF- α nas lesões em cicatrização para ambos os grupos nos tempos de 1 e 3 dias. Contudo, não foram observadas diferenças significativas para a quantidade de TNF- α nas feridas tratadas com o EEAc 5% (Figura 17).

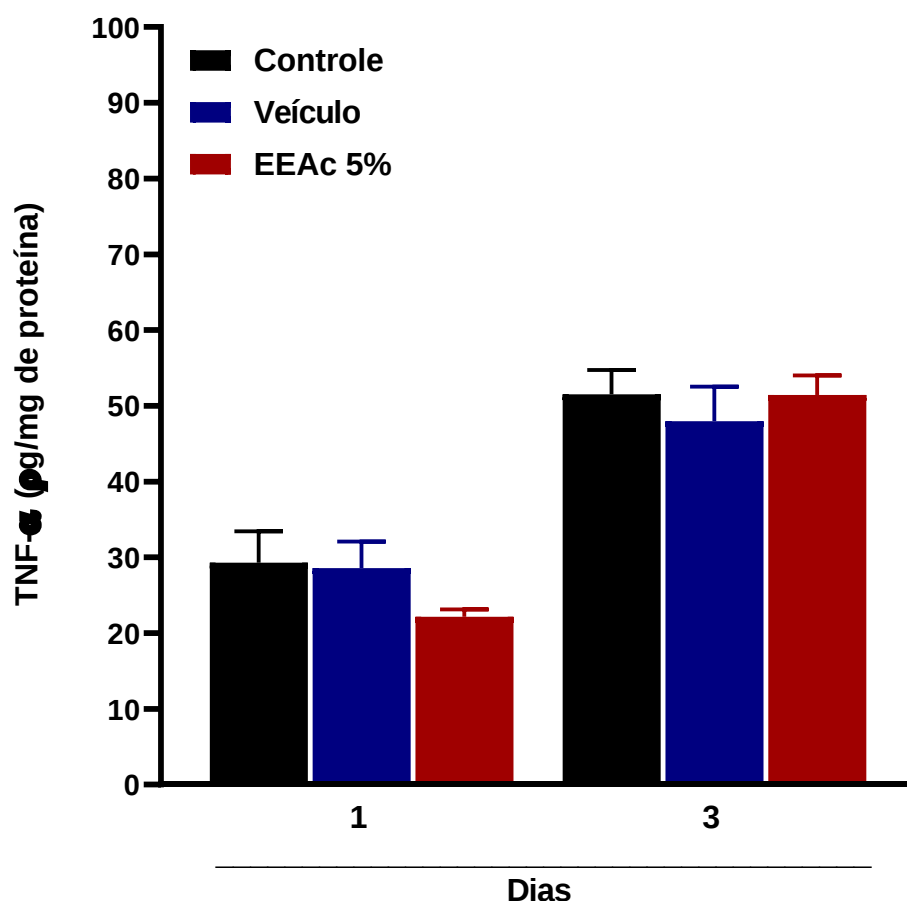


Figura 17- Efeito do EEAc 5% sobre a quantidade de TNF- α nas feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos. Os animais foram tratados topicamente e divididos em grupos: Controle (salina 0,9%), Veículo (DMSO 2% em PG) ou EEAc 5% (Extrato Etanólico de *A. colubrina* 5%). As lesões foram coletadas nos dias 1 e 3 para quantificação de TNF- α tecidual, que está representada em pg/mg de proteína. n= 5-7 por grupo e tempo. Resultados expressos como média $\pm$ EPM, analisados pela ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni.

5.6. Efeito do EEAc 5% sobre a quantidade de IL-10 nas lesões

Para a avaliação do perfil anti-inflamatório foi realizada a quantificação de IL-10 nas lesões em cicatrização para todos os grupos nos tempos de 1 e 3 dias. Foi observado aumento significativo ($p < 0,01$) de IL-10 no tempo de 3 dias em feridas tratadas com EEAc 5% (86,92 pg/mg de proteína $\pm$ 3,63), quando comparadas ao controle (67,09 pg/mg de proteína $\pm$ 4,31) ou veículo (66,95 pg/mg de proteína $\pm$ 5,33) (Figura 18).

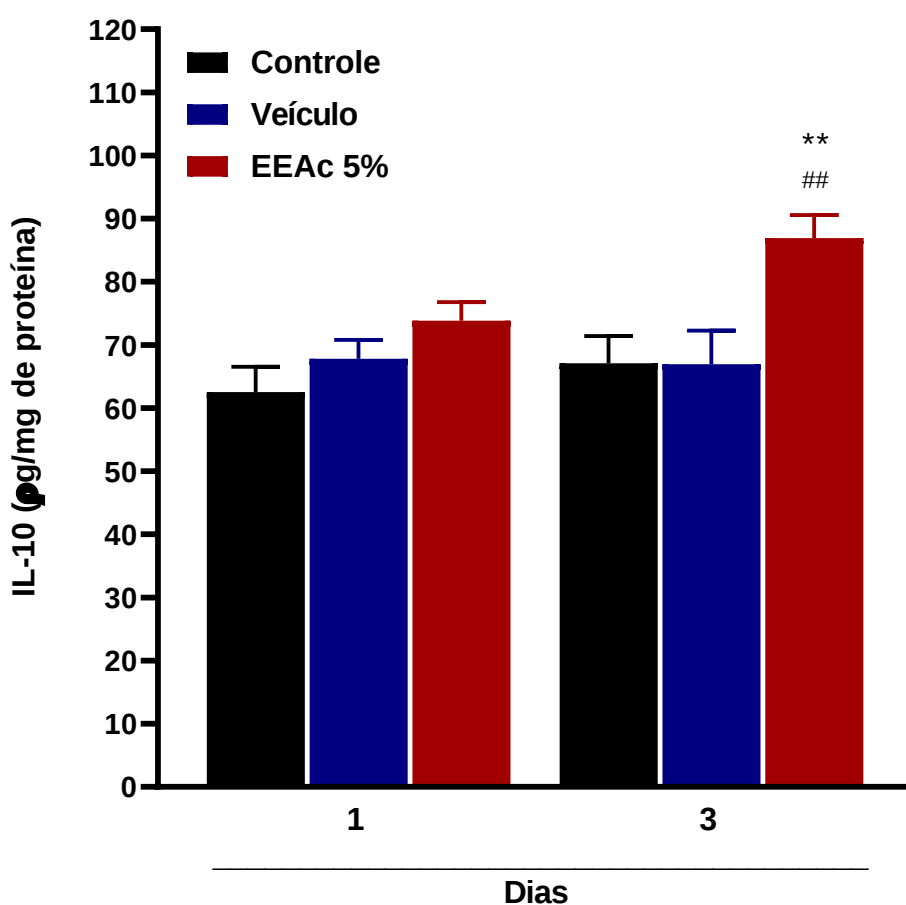


Figura 18- Efeito do EEAc 5% sobre a quantidade de IL-10 nas feridas cutâneas excisionais induzidas em camundongos. Os animais foram tratados topicamente e divididos em grupos: Controle (salina 0,9%), Veículo (DMSO 2% em PG) ou EEAc 5% (Extrato Etanólico de *A. colubrina* 5%). As lesões foram coletadas nos dias 1 e 3 para quantificação de IL-10 tecidual, que está representada em pg/mg de proteína. $n = 5-7$ por grupo e tempo. Resultados expressos como média $\pm$ EPM, analisados pela ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. Dados com $**p < 0,01$ ou $##p < 0,01$ são considerados significativos quando comparados ao controle ou veículo, respectivamente.

6. DISCUSSÃO

O modelo de ferida cutânea excisional em camundongos foi utilizado nesse estudo com o intuito de avaliar o efeito do extrato de *A. colubrina* em lesões agudas que permitem determinar o grau de fechamento mediante a cicatrização por segunda intenção (SAMI et al., 2019; THAKUR et al., 2011). Embora tenha sido observado que animais tratados com o EEAc 5% apresentaram redução precoce da área das feridas excisionais nos tempos de 3, 5 e 7 dias de cicatrização, é importante ressaltar que a tradução desses resultados de camundongos para humanos ainda é questionável (SEOK et al., 2013). Nesse sentido, ainda, o modelo experimental de ferida excisional em camundongos se limita em virtude de o reparo ocorrer principalmente por contração, enquanto em humanos se dá por re-epitelização (SAMI et al., 2019).

Sabe-se que diversas condições podem interferir na cicatrização de feridas e tais fatores devem ser avaliados criteriosamente no estudo de agentes cicatrizantes em modelos experimentais. Nesse estudo, foram utilizados animais adultos, ambientados e com bom estado nutricional (ALKAFAY et al., 2014; GANTWERKER; HOM, 2011; OGUNTIBEJU, 2019). Ademais, optou-se pela utilização de camundongos fêmeas em virtude do comportamento harmonioso para minimizar o estresse, considerando ainda trabalhos anteriores que utilizaram fêmeas e obtiveram bons resultados (ALKAFAY et al., 2014; GAO et al., 2015). Embora o sexo seja um fator limitante nesse estudo, visto que os estrógenos auxiliam no reparo tecidual (ROUTLEY; ASHCROFT, 2009), ainda existe controvérsias sobre o efeito do sexo na cicatrização de feridas (ENGELAND et al. 2009).

Pessoa et al. (2015) avaliaram o efeito do extrato da casca de *A. colubrina* a 5% na cicatrização de feridas excisionais cutâneas de ratos e não observaram diferenças na contração da área das lesões. Por outro lado, Lima et al. (2006) encontraram redução na área das feridas de ratos tratados com o Sanativo®, um fitoterápico composto pela associação de *A. colubrina*, *S. terebinthifolius*, *Physalis angulata* (Camapu) e *Cereus peruvianus* (Mandacaru). No entanto, é importante ressaltar que o efeito do Sanativo® se deve à associação das plantas mencionadas e não confirma que *A. colubrina*, especificamente, foi a responsável pelo efeito cicatrizante. A *S. terebinthifolius*, presente no Sanativo®, por exemplo, apresenta efeito sobre o fechamento precoce de feridas excisionais em camundongos (ESTEVÃO et al., 2017).

O EEAc 5% reduziu a área das feridas excisionais em determinado período de cicatrização, mas não acelerou o reparo em relação aos grupos controle e veículo até o final do tempo de experimento (14 dias). Particularmente, verificou-se uma atividade predominante no período que corresponde à duração da fase inflamatória (3º, 5º e 7º dia), que pode ser explicada em virtude da propriedade anti-inflamatória da *A. colubrina* (SANTOS et al., 2013). Pereira et al. (2016) utilizaram polissacarídeos totais da casca de *Caesalpinia férrea* (Pau-ferro) em modelo de ferida excisional em ratos e verificaram redução na área das lesões nos dias 2, 5, 7 e 10, sem que houvessem diferenças ao 14º e 21º dias. Os autores destacaram que os efeitos concentrados na fase inflamatória podem ser justificados pela modulação de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , NO e TGF- β .

Embora seja comum a mensuração da área das feridas para verificar o efeito no reparo de feridas, este parâmetro isolado não esclarece a eficácia dos agentes cicatrizantes (PAZYAR et al., 2014). Diante disso, foi avaliada a qualidade do reparo das feridas ao final do experimento (14 dias) em animais tratados com EEAc 5% mediante análise histológica. Nesta, verificou-se aumento na deposição e organização do colágeno, sem que houvessem diferenças para os parâmetros de infiltrado de leucócitos, vascularização e re-epitelização. Manzoureh e Farahpour (2020) observaram aumento na deposição de colágeno no tratamento tópico com o extrato hidroetanólico de *Trifolium pratense* em feridas excisionais de ratos. Os autores ressaltaram que esse efeito favoreceu o processo de cicatrização, pois estimulou o avanço da proliferação para o remodelamento.

Estudos anteriores utilizando a *A. colubrina* a 5% no tratamento de feridas cutâneas excisionais de ratos demonstraram alterações histológicas nas lesões que comprovam efeitos importantes dessa espécie na cicatrização de feridas. Pessoa et al. (2012) verificaram maior número de vasos sanguíneos ao 7º e 14º dia, mas não ao 21º dia. Em 2015, Pessoa e colaboradores observaram aumento na deposição de colágeno ao 14º dia de cicatrização. Assim, embora não tenha sido verificado efeito sobre a vascularização nesse estudo, o EEAc 5% foi eficaz no aumento da deposição de colágeno das feridas. Nesse sentido, a *A. colubrina* parece estar envolvida na otimização das etapas iniciais do processo de cicatrização, permitindo uma adequada e benéfica transição entre as fases de inflamação, proliferação e remodelamento, resultando na formação de feridas de melhor qualidade ao 14º dia.

Considerando o efeito do EEAc 5% sobre a área das feridas, optou-se por mensurar os biomarcadores celulares MPO e NAG, utilizados comumente para verificar o acúmulo de neutrófilos e macrófagos no reparo de feridas, respectivamente (BARCELOS et al., 2005). Dessa forma, o infiltrado de neutrófilos foi verificado indiretamente por quantificação da atividade da MPO, uma enzima presente em grande concentração nos grânulos desses leucócitos (BRADLEY et al., 1982). Já o infiltrado de macrófagos foi determinado indiretamente pela mensuração da atividade de NAG, uma enzima presente no lisossomo de macrófagos ativados (BAILEY, 1988). Os tipos celulares foram quantificados no 1º, 3º e 7º dias, considerando o comportamento fisiológico e a cinética do infiltrado dessas células em feridas excisionais (CANESSO et al., 2014; ESTEVÃO et al., 2017).

Os neutrófilos são leucócitos relacionados a inflamações descontroladas e reparo tecidual prejudicado (BARRIENTOS et al., 2008; LAROUCHE et al., 2018; PHILLIPSON; KUBES, 2019), podendo ser dispensáveis e desfavoráveis ao reparo (DOVI et al., 2003). No entanto, ainda assim, é importante ressaltar que o papel dos neutrófilos deve levar em consideração o tipo de ferida, pois podem ser fundamentais para o reparo de lesões infectadas (BRUBAKER et al., 2011). No presente trabalho, observou-se aumento gradual do infiltrado de neutrófilos do 1º ao 3º dia, reduzindo ao 7º dia de cicatrização. No 3º dia, onde verificou-se o pico neutrofílico, as feridas tratadas com o EEAc 5% apresentaram reduzida atividade de MPO, sugerindo uma redução na infiltração de neutrófilos que correlaciona diretamente com a cicatrização precoce das lesões excisionais no início do reparo.

Efeitos de produtos naturais sobre a redução da atividade de MPO e, conseqüentemente, o infiltrado de neutrófilos em feridas, foi observado anteriormente por McLennan et al. (2008) estudando o efeito da própolis por via tópica em lesões diabéticas de ratos. Os autores verificaram que o aumento persistente de MPO nas lesões controle (PBS) foi atenuado pela própolis, caracterizando uma redução do infiltrado de neutrófilos que contribuiu para maior taxa de fechamento das feridas. Além disso, Corrêa et al. (2017) estudaram o efeito da própolis oral sobre a cicatrização de feridas cutâneas excisionais em camundongos e demonstraram que o tratamento suprimiu o processo inflamatório e promoveu melhor reparo tecidual mediante o rápido fechamento das lesões, menor infiltrado de neutrófilos e macrófagos e redução de fatores pró-inflamatórios como TGF- β , TNF- α e IL-6.

Os macrófagos são indispensáveis para a cicatrização, pois com sua depleção em camundongos foi observado reduzido grau de contração, deficiente re-epitelização, deposição de colágeno e angiogênese e aumento de neutrófilos (GOREN et al., 2009; MIRZA et al., 2009). No entanto, os perfis de polarização dos macrófagos devem ser considerados, pois em feridas crônicas ocorre a persistência do perfil M1, enquanto o M2 se torna responsável pela resolução tecidual (HESKETH et al., 2017; KLINKERT et al., 2017; KRZYSZCZYK et al., 2018). Neste trabalho foi evidenciado aumento gradual da atividade de NAG do 1º ao 3º dia em todos os grupos. Porém, embora ocorra redução ao 7º dia nos grupos controle e veículo, os níveis se mantiveram elevados no grupo EEAc 5%. Sugere-se que esse aumento de macrófagos em período tardio de cicatrização auxiliou no processo de reparo, pois o ambiente é tipicamente rico em macrófagos anti-inflamatórios (KRZYSZCZYK et al., 2018).

Daley et al. (2010) demonstraram que no dia 1 de reparo da ferida cerca de 85% dos macrófagos expressam genes do fenótipo M1 e apenas 15% expressam genes do fenótipo M2. À medida em que o processo de cicatrização avança, por volta de 7 dias após a lesão, as concentrações de macrófagos com genes do fenótipo M1 reduzem para 20%, enquanto a ferida passa a ser composta por 80% de células com genes do fenótipo M2. Uma teoria semelhante foi proposta por Reis et al. (2017), que verificaram cicatrização precoce de feridas excisionais em ratos tratados com Lipoxina A4 associada ao aumento do infiltrado de macrófagos e elevação da IL-4 ao 14º dia. Os autores sugeriram que ocorreu melhora no reparo das feridas devido ao aumento do infiltrado por macrófagos de perfil anti-inflamatório e produtores de IL-4.

Além disso, outro ponto a se ressaltar é que a redução de neutrófilos no sítio inflamatório por eferocitose estimula a polarização de macrófagos M2, sendo um evento fundamental para que ocorra o reparo da ferida (HESKETH et al., 2017). Então, sugere-se que o efeito do EEAc 5% na redução de neutrófilos, observado ao 3º dia de reparo, pode aumentar a concentração de macrófagos anti-inflamatórios na ferida. Contudo, para a confirmação do efeito do EEAc 5% sobre os perfis de macrófagos na cicatrização de feridas excisionais em camundongos, seriam necessárias novas investigações de marcadores para a polarização de macrófagos, como a quantificação do receptor de manose-1 e óxido nítrico sintase induzida, para M1, e arginase-1, para M2 (NEGREIROS-LIMA et al., 2020).

Sabe-se que muitos produtos naturais apresentam atividade anti-inflamatória que beneficiam o processo de cicatrização, seja por inibição da produção de fatores pró-inflamatórios, como o TNF- α , e/ou estimulação da síntese de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10 (RIBEIRO et al., 2018). Assim, para explorar ainda mais o efeito do EEAc 5% na cicatrização de feridas, particularmente sobre o processo inflamatório, investigou-se as concentrações das citocinas TNF- α , classicamente pró-inflamatória, e IL-10, tipicamente anti-inflamatória. Os tempos de 1 e 3 dias foram escolhidos por se tratarem de um período intimamente relacionado à fase inflamatória e de acordo com a cinética dessas citocinas na cicatrização de feridas (CANESSO et al., 2014). Sendo assim, não foi observado efeito do EEAc 5% sobre a quantidade de TNF- α , mas houve aumento significativo da quantidade de IL-10 ao 3º dia de reparo.

Após a lesão tecidual, o TNF- α é produzido imediatamente por endoteliócitos, queratinócitos e fibroblastos, e mais tarde por neutrófilos e macrófagos recrutados (MAST; SCHULTZ, 1996). Essa molécula potencializa a inflamação mediante a ativação do Fator de Transcrição Nuclear- κ B (NF- κ B) e produção de inúmeros mediadores pró-inflamatórios como a IL-1 β , IL-6 e o próprio TNF- α (NOSENKO et al., 2019). Dessa forma, foi demonstrado anteriormente que feridas excisionais de ratos diabéticos apresentam aumento da expressão de TNF- α . Adicionalmente, quando administrado um inibidor de TNF- α local (etanercepte), foi observado aumento na taxa de fechamento das feridas. Sendo assim, níveis elevados de TNF- α são classicamente conhecidos por prejudicar a cicatrização de feridas diabéticas, sendo a inibição dessa molécula um possível alvo terapêutico (HUANG et al., 2019).

A IL-10 é produzida durante o reparo tecidual e consiste em um mediador do processo de cicatrização em virtude dos efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos (PERANTEAU et al., 2008). A IL-10 tem sido relacionada ao processo regenerativo da pele que ocorre na vida fetal (LIECHTY et al., 2000), sendo uma citocina de perfil anti-inflamatório que, além de reduzir a inflamação, promove um ambiente propício à polarização de macrófagos M2 (PERANTEAU et al., 2008). Semelhante às propriedades observadas nesse estudo para o EEAc 5%, Amorim et al. (2017) investigaram o efeito da oleorresina de *C. paupera* (Copaíba) em feridas excisionais diabéticas de camundongos e encontraram redução do tamanho das feridas e aumento na deposição de colágeno associados à maior quantidade de IL-10 nas lesões, quando comparadas ao tratamento com a colagenase.

Os efeitos cicatrizantes de plantas medicinais estão intimamente associados à presença dos compostos secundários produzidos pelo metabolismo vegetal como os flavonoides, polifenóis, proantocianidinas, alcaloides, terpenóides e esteróides, que geralmente induzem resposta anti-inflamatória (ATAIDE et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018). A *Punica granatum* (Romã), por exemplo, é rica em taninos, principais metabólitos associados às suas propriedades cicatrizantes (ARUN et al., 2012). No reparo de feridas, o extrato da flor da *P. granatum* promoveu diminuição na área e aumento de colágeno em feridas térmicas em ratos, quando comparadas às lesões tratadas com a sulfadiazina de prata (NASIRI; HOSSEINIMEHR, 2017). Por outro lado, para a *C. officinalis* (Margarida), os triterpenos, saponinas e flavonoides são tidos como responsáveis pelos efeitos antiedematoso, anti-inflamatório, antioxidante e cicatrizante (AHMED et al., 2003; LEACH, 2008).

Os flavonoides são os principais compostos de vegetais que induzem resposta anti-inflamatória, principalmente em virtude de suas propriedades antioxidantes (RIBEIRO et al., 2018). Para a *A. colubrina*, os efeitos cicatrizantes podem estar associados à presença dos metabólitos secundários mais abundantes em sua casca, como os flavonoides e taninos (MOTA et al., 2017). Os taninos, como as proantocianidinas, têm demonstrado efeitos benéficos sobre a cicatrização cutânea, particularmente na regulação da transcrição gênica e expressão do VEGF, fundamental para a angiogênese (KHANNA et al., 2001; KHANNA et al., 2002). Contudo, além dos taninos e flavonoides, a casca de *A. colubrina* apresenta saponinas, triterpenos e esteroides (PESSOA et al., 2012), que comumente contribuem para atenuar o processo inflamatório e beneficiar a cicatrização (ATAIDE et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018; WEBER et al., 2011).

7. CONCLUSÃO

O EEAc 5% foi eficaz na cicatrização de feridas excisionais em camundongos mediante os efeitos de redução da área e do infiltrado de neutrófilos, aumento do infiltrado de macrófagos, da citocina anti-inflamatória IL-10 e da deposição de colágeno nas lesões.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugere-se que a *A. colubrina* está envolvida na redução do processo inflamatório que pode prejudicar a cicatrização de feridas. Nesse sentido, espera-se investigar outros aspectos relacionados à propriedade cicatrizante da *A. colubrina*, como os compostos bioativos presentes e responsáveis pelo reparo tecidual e seu efeito sobre outros modelos de lesões cutâneas mais desafiadoras, como as feridas térmicas, diabéticas e infectadas. Ademais, é fundamental determinar o efeito da *A. colubrina* sobre a modulação de outras células, como mastócitos, fibroblastos e queratinócitos, e moléculas, como IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-4, VEGF e TGF- β .

9. REFERÊNCIAS

ABDEL-SAYED, P.; TORNAY, D.; HIRT-BURRI, N.; ROESSINGH, A.B.; RAFFOUL, W.; APPLGATE, L.A. Implications of chlorhexidine use in burn units for wound healing. **Burns**, p.1-7, 2020.

AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K.; BRASÍLIO, I.J.L.D.; COELHO, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano". **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.2, p.383-395, 2007.

AHMED, S.; QADIRUDDIN, M.; QURESHI, S. Elemental analysis of *Calendula officinalis* plant and its probable therapeutic role in health. **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research**, v.46, n.4, p.283-287, 2003.

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; NETO, E.M.F.L.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p.325-354, 2007.

ALKAFAYY, M.; MONTASER, M.; EL-SHAZLYY, S.; BAZID, S.; AHMED, M.M. Ethanolic extract of sharah, *Plectranthus aegyptiacus*, enhances healing of skin wound in rats. **Acta Histochemica**, v.116, p.627-638, 2014.

ALMEIDA, G.C.M.; SANTOS, M.M.; LIMA, N.G.M.; CIDRAL, T.A.; MELO, M.C.N.; LIMA, K.C. Prevalence and factors associated with wound colonization by *Staphylococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients in inland northeastern Brazil: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v.14, n.328, p.1-8, 2014.

ALTSCHUL, S.V.R. **A taxonomic study of the genus *Anadenanthera***. Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University, Cambridge, v.193, p.3-65, 1964.

AMORIM, J.L.; FIGUEIREDO, J.B.; AMARAL, A.C.F.; BARROS, E.G.O.; PALMERO, C.; MPALANTINOS, M.A.; RAMOS, A.S.; FERREIRA, J.L.P.; SILVA, J.R.A.; BENJAMIM, C.F.; BASSO, S.L.; NASCIUTTI, L.E.; FERNANDES, P.D. Wound healing properties of *Copaifera paupera* in diabetic mice. **Plos One**, v.12, n.10, p.1-14, 2017.

ARAÚJO, D.R.C.; SILVA, L.C.N.; SILVA, A.G.; ARAÚJO, J.M.; MACÊDO, A.J.; CORREIA, M.T.S.; SILVA, M.V. Comparative analysis of anti-*Staphylococcus aureus* action of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina*. var. *cebil* (Griseb.) Altschul. **African Journal of Microbiology Research**, v.8, n.28, p.2690-2696, 2014.

ARAÚJO, T. A. S.; ALENCARA, N. L.; AMORIM, E. L. C. de; ALBUQUERQUE, U. P. de. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.72-80, 2008.

ARUN, N.; SINGH, D. *Punica granatum*: A review on pharmacological and therapeutic properties. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.3, n.5, p.1240-1245, 2012.

ASHCROFT, G.S.; GREENWELL-WILD, T.; HORAN, M.A.; WAHL, S.M.; FERGUSON, M.W. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. **The American Journal of Pathology**, v.155, n.4, p.1137-1146, 1999.

ATAIDE, J.A.; CEFALI, L.C.; CROISFELT, F.M.; SHIMOJO, A.A.M.; OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; MAZZOLA, P.G. Natural actives for wound healing: A review. **Phytotherapy Research**, v.32, n.9, p. 1-11, 2018.

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

BAILEY, P.J. Sponge implants as models. **Methods Enzymol**, v.162, p.327-334, 1988.

BALAKRISHNAN, B.; MOHANTY, M.; UMASHANKAR, P.R.; JAYAKRISHNAN, A. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. **Biomaterials**, v.26, p.6335-6342, 2005.

BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; VIEIRA, L.Q.; CASSALI, G.D.; ANDRADE, S.P.; TEIXEIRA, M.M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **Journal of Leukocyte Biology**, v.78, 352-358, 2005.

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

BARSHEES, N.; SIGERIDDI, M.; WROBEL, J.; Mahankali, A.; Robbins, J.M.; Koungias, P.; Armstrong, D.G. The system of care for the diabetic foot: objectives, outcomes and opportunities. **Diabetic Foot & Ankle**, v. 4, n.21847, p.1-12, 2013.

BIGLIARDI, P.L.; ALSAGOFF, S.A.L.; EL-KAFRAWI, H.Y.; PYON, J-K.; WA, C.T.C.; VILLA, M.A. Povidone iodine in wound healing: A review of current concepts and practices. **International Journal of Surgery**, v.44, p.260-268, 2017.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.78, p.206-209, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p.

BRUBAKER, A.L.; SCHNEIDER, D.F.; KOVACS, E.J. Neutrophils and natural killer T cells as negative regulators of wound healing. **Expert Review Dermatology**, v.6, n.1, p.5-8, 2011.

CAÑEDO-DORANTES, L.; CAÑEDO-AYALA, M. Skin acute wound healing: a comprehensive review. **International Journal of Inflammation**, v.2019, p.1-15, 2019.

CANESSO, M.C.C.; VIEIRA, A.T.; CASTRO, T.B.R.; SCHIRMER, B.G.A.; CISALPINO, D.; MARTINS, F.S.; RACHID, M.A.; NICOLI, J.R.; TEIXEIRA, M.M.; BARCELOS, L.S. Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota. **The Journal of Immunology**, v.193, p.5171-5180, 2014.

CARDONA, A.F.; WILSON, S.E. Skin and soft-tissue infections: A critical review and the role of telavancin in their treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v.61, p.69-78, 2015.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.131, p.326-342, 2010.

CARVALHO, M.G.; MELO, A.G.N.; ARAGÃO, C.F.S.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, n.1, p.158-169, 2013.

CARVALHO, P.E.R. **Angico-Branco**. Embrapa Florestas- Circular Técnica n. 56. 2002. 10 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/306306/1/CT0056.pdf>. Acesso em: 19 de abril de 2020.

CHILDS, D.R.; MURTHY, A.S. Overview of wound healing and management. **Surgical Clinics of North America**, v.97, p.189-207, 2017.

CHURCH, D.; ELSAYED, S.; REID, O.; WINSTON, B.; LINDSAY, R. Burn Wound Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.2, p. 403-434, 2006.

CORRÊA, F.R.S.; SCHANUEL, F.S.; MOURA-NUNES, N.; MONTE-ALTO-COSTA, A.; DALEPRANE, J.B. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFκB. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.86, p.162-171, 2017.

DAS, S.; BAKER, A.B. Biomaterials and Nanotherapeutics for enhancing Skin wound Healing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.4, n.82, p.1-20, 2016.

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

DOVI, J.V.; HE, L.K.; DIPIETRO, L.A. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v.73, n.4, p.448-455, 2003.

DUQUE, A.P.N.; PINTO, N.C.C.; MENDES, R.F.; SILVA, J.M.; ARAGÃO, D.M.O.; CASTANÕN, M.C.M.N.; SCIO, E. In vivo wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.68, n.1, p. 128-138, 2016.

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

DWIVEDI, D.; DWIVEDI, M.; MALVIYA, S.; SINGH, V. Evaluation of wound healing, anti-microbial and potential of *Pongamia pinnata* in wistar rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v.7, 79-85, 2017.

ENGELAND, C.G.; SABZEHEI, B.; MARUCHA, T. Sex hormones and mucosal wound healing. **Brain Behav Immunity**, v.23, p.629–635, 2009.

ENOCH, S.; LEAPER, D.J. Basic science of wound healing. **Surgery**, v.23, n.2, p.37-41, 2005.

ESTEVIÃO, L.R.M.; CASSINI-VIEIRA, P.; LEITE, A.G.B.; BULHÕES, A.A.V.C.; BARCELOS, L.S.; EVÊNCIO-NETO, J. Morphological Evaluation of Wound Healing Events in the Excisional Wound Healing Model in Rats. **Bio-protocol**, v.9, n.13, p.1-12, 2019.

ESTEVIÃO, L.R.M.; SIMÕES, R.S.; CASSINI-VIEIRA, P.; CANESSO, M.C.C.; BARCELOS, L.S.; RACHID, M.A.; CÂMARA, C.A.G.; EVÊNCIO-NETO, J. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) leaves oil attenuates inflammatory responses in cutaneous wound healing in mice. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.32, n.9, p.726-735, 2017.

EVERETT, E.; MATHIOUDAKIS, N. Update on management of diabetic foot ulcers. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1411, n.1, p.153-165, 2018.

GANTWERKER, E.A.; HOM, D.B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v.19, p.441-453, 2011.

GAO, M.; NGUYEN, T.T.; SUCKOW, M.A.; WOLTER, W.R.; GOOYIT, M.; MOBASHERY, S.; CHANG, M. Acceleration of diabetic wound healing using a novel protease–anti-protease combination therapy. **PNAS**, v.102, n.49, p. 15226-15231, 2015.

GORDON, M.D.; GOTTSCHLICH, M.M.; HELVIG, E.I.; MARVIN, J.A.; RICHARD, R.L. Review of evidenced-based practice for the prevention of pressure sores in burn patients. **Journal Burn Care Rehabil**, v.25, p.388–410, 2004.

GOREN, I.; ALLMANN, N.; YOGEV, N.; SCHÜRMAN, C.; LINKE, A.; HOLDENER, M.; WAISMAN, A.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. **The American Journal of Pathology**, v.175, n.1, p.132-147, 2009.

GOUIN, J-P.; KIECOLT-GLASER, J.K. The impact of psychological stress on wound healing: methods and mechanisms. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.31, p.81-93, 2011.

GUARNEIRE, G.J.; JUNIOR, O.C.; LIMA, N.M.; SANTOS, E.A.; SCHULZE, C.A.; SILVA, W.P.; BATISTA, J.P.O.; CARLI, G.P.; CASTRO, S.B.; ALVES, C.C.S.; CARLI, A.P. Effect of *anadenanthera colubrina* protease inhibitors a Paulinos an inflammatory mediator. **Natural Product Research**, p.1-6, 2019.

GUO, S.; DIPIETRO, L.A. Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v.89, n.3, p.219-229, 2010.

GURTNER, G.C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M.T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 15, p. 314-321, 2008.

GUSHIKEN, L.F.S.; HUSSNI, C.A.; BASTOS, J.K.; ROZZA, A.L.; BESERRA, F.P.; VIEIRA, A.J.; PADOVANI, C.R.; LEMOS, M.; JUNIOR, M.P.; SILVA, J.J.M.; NÓBREGA, R.H.; MARTINEZ, E.R.M.; PELLIZZON, C.H. Skin wound healing potential and mechanisms of the hydroalcoholic extract of leaves and oleoresin of *Copaifera langsdorffii* desf. kuntze in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2017, p.1-16, 2017.

GUTIERREZ-LUGO, M.T.; DESCHAMPS, J.D.; HOLMAN, T.R.; SUAREZ, E.; TIMMERMAN, B.N. Lipoxxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. **Planta Medica**, v.70, p.263-265, 2004.

HESKETH, M.; SAHIN, K.B.; WEST, Z.E.; MURRAY, R.Z. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, p. 1-10, 2017.

HOFMAN, D.; MOORE, K.; COOPER, R.; EAGLE, M.; COOPER, S. Use of topical corticosteroids on chronic leg ulcers. **Journal of Wound Care**, v.16, p.227-230, 2007.

HORMOZI, M.; GHOLAMI, M.; BABANIAZI, A.; GHARRAVI, A.M. *Calendula officinalis* stimulate proliferation of mouse embryonic fibroblasts via expression of growth factors TGFβ1 and bFGF. **Inflammation and Regeneration**, v.39, n.7, p.1-7, 2019.

HUANG, S-M.; WU, C-S.; CHIU, M-H.; WU, C-H.; CHANG, Y-T.; CHEN, G-S.; LAN, C-C.E. High glucose environment induces M1 macrophage polarization that impairs keratinocyte migration via TNF-α: An important mechanism to delay the diabetic wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v.96, n.3, p.159-167, 2019.

HUANG, T-H.; WANG, P-W.; YANG, S-C.; CHOU, W-L.; FANG, J-Y. Cosmetic and Therapeutic Applications of Fish Oil's Fatty Acids on the Skin. **Marine Drugs**, v.16, n.256, p. 1-20, 2018.

JAHDI, F.; KHABBAZ, A.H.; KASHIAN, M.; TAGHIZADEH, M.; HAGHANI, H. The impact of calendula ointment on cesarean wound healing: A randomized controlled clinical trial. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v.7, n.5, p.893-897, 2018.

JAIN, C.; KHATANA, S.; VIJAYVERGIA, R. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.10, n.2, p.494-504, 2019.

KHANNA, S.; ROY, S.; BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; SEN, C. K. Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n.1, p.38-42, 2001.

KHANNA, S.; VENOJARVI, M.; ROY, S.; SHARMA, N.; TRIKHA, P.; BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; SEN, C. K. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, n.8, p.1089-1096, 2002.

KLINKERT, K.; WHELAN, D.; CLOVER, A.J.P.; LEBLOND, A.L.; KUMAR, A.H.S.; CAPLICE, N.M. Selective M2 macrophage depletion leads to prolonged inflammation in surgical wounds. **European Surgical Research**, v.58, p.109-120, 2017.

KRZYSZCZYK, P.; SCHLOSS, R.; PALMER, A.; BERTHIAUME, F. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote wound healing phenotypes. **Frontiers in Physiology**, v.9, n.419, p.1-22, 2018.

LA FLAMME, A.C.; KHARKRANG, M.; STONE, S.; MIRMOEINI, S.; CHULUUNDORJ, D.; KYLE, R. Type II-activated murine macrophages produce IL-4. **Plos One**, v.7, n.10, p.1-9, 2012.

LANIA, B.G.; MORARI, J.; ALMEIDA, A.R.; SILVA, M.N.; VIEIRA-DAMIANI, G.; LINS, K. A.; CÉSAR, C.L.; VELLOSO, L.A.; MAIA, N.B.; CINTRA, M.L.; VELHO, P.E.N.F. Topical essential fatty acid oil on wounds: Local and systemic effects. **PLoS ONE**, v.14, n.1, p.1-15, 2019.

LAROUCHE, J.; SHEORAN, S.; MARUYAMA, K.; MARTINO, M.M. Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. **Advances in wound care**, v.7, n.7, p.209-231, 2018.

LEACH, M. J. *Calendula officinalis* and wound healing: A systematic review. **Wounds**, v.20, n.8, p.236-243, 2008.

LIECHTY, K.W.; KIM, H.B.; ADZICK, N.S.; CROMBLEHOLME, T.M. Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair. **Journal of Pediatric Surgery**, v.35, n.6, p.866-872, 2000.

LIMA, C. R.; COSTA SILVA, J. H.; LYRA, M. M. A.; ARAÚJO, A. V.; ARRUDA, V. M.; DIMECH, G. S.; BARATELLA EVÊNCIO, L.; FRAGA, M. C. C. A.; LAFAYETTE, S. S.

L.; WANDERLEY, A. G. Atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico Sanativo®. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25, n.4, p.544-549, 2006.

LUO, P.; LIA, X.; YE, Y.; SHU, X.; GONG, J.; WANG, J. Castanea mollissima shell prevents an over expression of inflammatory response and accelerates the dermal wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.220, p.9-15, 2018.

MACIEL, A.B.S.; ORTIZ, J.F.; SIQUEIRA, B.S.; ZANETTE, G.F. Tissue healing efficacy in burn patients treated with 1% silver sulfadiazine versus other treatments: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.94, n.2, p.204-210, 2019.

MANDELBAUM, S.H.; SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, n.4, p.393-410, 2003a.

MANDELBAUM, S.H.; SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, n.5, p.525-542, 2003b.

MANZOUREH, R.; FARAHPOUR, M.R. Topical administration of hydroethanolic extract of *Trifolium pratense* (red clover) accelerates wound healing by apoptosis and re-epithelialization, **Biotechnic & Histochemistry**, p.1-11, 2020.

MASSON-MEYERS, D.; ENWEMEKA, C.S.; BUMAH, V.; ANDRADE, T.; FRADE, M.A. Topical treatment with *copaifera langsdorffii* oleoresin improves wound healing in rats. **International Journal of Phytomedicine**, v.5, n.3, p. 378-386, 2013.

MAST, B.A.; SCHULTZ, G.S. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v.4, p.411-420, 1996.

MCLENNAN, S.V.; BONNER, J.; MILNE, S.; LO, L.; CHARLTON, A.; KURUP, S.; JIA, J.; YUE, D.K.; TWIGG, S.M. The anti-inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. **Wound Repair and Regeneration**, v.16, n.5, p.706-713, 2008.

MELO, J.G.; ARAÍJO, T.A.S.; CASTRO, V.T.N.A.; CABRAL, D.L.V.; RODRIGUES, M.D.; NASCIMENTO, S.C.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid Northeastern Brazil. **Molecules**, v.15, p.8534-8542, 2010.

MIR, M.; ALI, M.N.; BARAKULLAH, A.; GULZAR, A.; ARSHAD, M.; FATIMA, S.; ASAD, M. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. **Progress in Biomaterials**, v.7, p.1-21, 2018.

MIRZA, R.; DIPIETRO, L. A.; KOH, T.J. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. **The American Journal of Pathology**, v.175, n.6, p.2454-2462, 2009.

MIRZA, R.E.; KOH, T.J. Contributions of cell subsets to cytokine production during normal and impaired wound healing. **Cytokine**, v.71, p. 409-412, 2015.

MOLAZEM, Z.; MOHSENI, F.; YOUNESI, M.; KESHAVARZI, S. *Aloe vera* gel and cesarean wound healing; a randomized controlled clinical trial. **Global Journal of Health Science**, v.7, n.1, p.203-209, 2015.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E. M. F.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural 34 communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.173-183, 2006a.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; NETO, E.M.F.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; AMORIM, E.L.C. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.3, p.338-344, 2006b.

MORIM, M.P. *Anadenanthera* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Acesso em: 01 de junho de 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB18072>.

MOTA, G.S.; SARTORI, C.J.; MIRANDA, I.; QUILHO, T.; MORI, F.A.; PEREIRA, H. Bark anatomy, chemical composition and ethanol-water extract composition of *Anadenanthera peregrina* and *Anadenanthera colubrina*. **Plos One**, v.12, n.12, p.1-14, 2017.

MURPHY, P.S.; EVANS, G.R.D. Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products. **Plastic Surgery International**, v.2012, p.1-9, 2012.

NASCIMENTO, J.P.B.; BISPO, J.S.; DANTAS, B.F. *Angico- Anadenanthera colubrina var. cebil (Vell.) Brenan*. Nota Técnica n.10, 2018. 6p. Disponível em: https://www.abrates.org.br/img/technical_notes/17c1a78e-43cc-4530-bc86-4d0cca626528_Nota_T%C3%A9cnica_10.pdf. Acesso em: 19 de abril de 2020.

NASIRI, E.; HOSSEINIMEHR, S.J. The effects of *Punica granatum* flower extract on skin injuries induced by burn in rats. **Advances in Pharmacological Sciences**, p.1-8, 2017.

NEGREIROS-LIMA, G.L.; LIMA, K.M.; MOREIRA, I.Z.; JARDIM, B.L.O.; VAGO, J.P.; GALVÃO, I.; TEIXEIRA, L.C.R.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M.M.; SUGIMOTO, M.A.; SOUSA, L.P. Cyclic AMP Regulates Key Features of Macrophages via PKA: Recruitment, Reprogramming and E_erocytosis. **Cells**, v.9, n.128, p.1-26, 2020.

NOSENKO, M.A.; AMBARYAN, S.G.; DRUTSKAYA, M.S. Proinflammatory cytokines and skin wound healing in mice. **Molecular Biology**, v.53, n.5, p.653-664, 2019.

OGUNTIBEJU, O.O. Medicinal plants and their effects on diabetic wound healing. **Veterinary World**, v.12, n.5, p.653-663, 2019.

OKONKWO, U.A.; DIPIETRO, L.A. Diabetes and wound angiogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.7, p.1-15, 2017.

PAIVA, L.A.F.; ALENCAR-CUNHA, K.M.; SANTOS, F.A.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V.S.N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**, v.16, n.8, p. 737-739, 2002.

PALMIERI, B.; VADALÀ, M.; LAURINO, C. Nutrition in wound healing: investigation of the molecular mechanisms, a narrative review. **Journal Wound Care**, v.28, n.10, p.683-693, 2019.

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

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

PENG, Y.C.; YANG, F.L.; SUBEQ, Y.M.; TIEN, C.C.; CHAO, Y.C.; LEE, R.P. Lipid emulsion enriched in omega-3

PERANTEAU, W.H.; ZHANG, L.; MUVARAK, N.; BADILLO, A.T.; RADU, A.; ZOLTICK, P.W.; LIECHTY, K.W. IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. **Journal of Investigative Dermatology**, v.128, n.7, p.1852-1860, 2008.

PEREIRA, L.O.M.; VILEGAS, W.; TANGERINA, M.M.P.; ARUNACHALAM, K.; BALOGUN, S.O.; ORLANDI-MATTOS, P.E.; COLODEL, E.M.; MARTINS, D.T.O. Lafoensia pacari A. St.-Hil.: Wound healing activity and mechanism of action of standardized hydroethanolic leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.219, p.337-350, 2018.

PEREIRA, L.P.; MOTA, M.R.L.; BRIZENO, L.A.C.; NOGUEIRA, F.C.; FERREIRA, E.G.M.; PEREIRA, M.G.; ASSREUY, A.M.S. Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: Role of TNF- α , IL-1 β , NO, TGF- β . **Journal of Ethnopharmacology**, v.187, p.213-223, 2016.

PEREIRA, R.F.; BÁRTOLO, P.J. Traditional therapies for skin wound healing. **Advances in wound care**, v.5, n.5, p.208-229, 2013.

PESSOA, W.S.; ESTEVÃO, L.R.M.; SIMÕES, R.S.; BARROS, M.E.; MENDONÇA, F.S.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; EVÊNCIO-NETP, J. Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.27, n.10, p.655-670, 2012.

PESSOA, W.S.; ESTEVÃO, L.R.M.; SIMÕES, R.S.; MENDONÇA, F.S.; EVÊNCIO-LUZ, L.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; FLORENCIO-SILVA, R.; DE SÁ, F.B.; EVÊNCIO-NETO, J. Fibrogenesis and epitelial coating of skin wounds in rats treated with angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.30, n.5, p.353-358, 2015.

PHAM, C.H.; COLLIER, Z.J.; FANG, M.; HOWELL, A.; GILLENWATER, T.J. The role of collagenase ointment in acute burns: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Wound Care**, v.28, n., p.9-15, 2019.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The healing power of neutrophils. **Trends in Immunology**, v.40, n.7, p.635-647, 2019.

PUFA accelerates wound healing: A placebo-controlled animal study. **World Journal Surgery**, v.42, 1714-1720, 2018.

QING, C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. **Chinese Journal of Traumatology**, v.20, p.189-193, 2017.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da Caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana: Editora Multimídia, 2009. 467p.

RAMSEY, D.T.; POPE, E.R.; WAGNER, C.; BERG, J.N.; SWAIM, S.F. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wound sin dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, n.7, p. 941-949, 1995.

REDDY, M.; GILL, S.S.; ROCHON, P.A. Preventing pressure ulcers: a systematic review. **Journal of the American Medical Association**, v.296, n.8, p.974-984, 2006.

REIS, M.B.; PEREIRA, P.A.T.; CAETANO, G.F.; LEITE, M.N.; GALVÃO, A.F.; PAULA-SILVA, F.W.G.; FRADE, M.A.C.; FACCIOLI, L.H. Lipoxin A4 encapsulated in PLGA microparticles accelerates wound healing of skin ulcers. **Plos One**, v.12, n.7, p.1-15, 2017.

RIBEIRO, V.P.; ARRUDA, C.; EL-SALAM, M.A.; BASTOS, J.K. Brazilian medicinal plants with corroborated antiinflammatory activities: a review. **Pharmaceutical Biology**, v.56, n.1, p.253-268, 2018.

ROBSON, M.C.; STEED, D.L.; FRANZ, M.G. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. **Current Problems in Surgery**, v.38, n.2, p.72-140, 2001.

ROMHA, G.; ADMASU, B.; GEBREKIDAN, T.H.; ALEME, H.; GEBRU, G. Antibacterial Activities of Five Medicinal Plants in Ethiopia against Some Human and Animal Pathogens. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-10, 2018.

ROSEN, J.; LANDRISCINA, A.; KUTNER, A.; ADLER, B.L.; KRAUSZ, A.E.; NOSANCHUK, J.D.; FRIEDMAN, A.J. Silver sulfadiazine retards wound healing in

mice via alterations in cytokine expression. **Journal of Investigative Dermatology**, v.135, p.1459-1462, 2015.

ROUTLEY, C.E.; ASHCROFT, G.S. Effect of estrogen and progesterone on macrophage activation during wound healing. **Wound Repair Regen**, v.17, p.42-50, 2009.

SALAZAR, J.J.; ENNIS, W.J.; KOH, T.J. Diabetes Medications: Impact on Inflammation and Wound Healing. **Journal of Diabetes and its Complications**, v.30, n.4, p.746-752, 2016.

SAMI, D.G.; HEIBA, H.H.; ABDELLATIF, A. Wound healing models: A systematic review of animal and non-animal models. **Wound Medicine**, v.24, p.8-17, 2019.

SANTOS, J.S.; MARINHO, R.R.; EKUNDI-VALENTIM, E.; RODRIGUES, L.; YAMAMOTO, M.H.; TEIXEIRA, S.A.; MUSCARA, M.N.; COSTA, S.; THOMAZZI, S. Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.148, p.218-222, 2013.

SEN, C.K.; GORDILLO, G.M.; ROY, S.; KIRSNER, R.; LAMBERT, L.; HUNT, T.K.; GOTTRUP, F.; GURTNER, G.C.; LONGAKER, M.T. Human Skin Wounds: A Major and Snowballing Threat to Public Health and the Economy. **Wound Repair and Regeneration**, v.17, n.6, p.763-771, 2009.

SEOK, J.; WARREN, H.S.; CUENCA, A.G.; et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. **PNAS**, v.110, n.9, p.3507-3512, 2013.

SERRA, M.B.; BARROSO, W.A.; SILVA, N.N.; SILVA, S.N.; BORGES, A.C.R.; ABREU, I.C.; BORGES, M.O.R. From inflammation to current and alternative therapies involved in wound healing. **International Journal of Inflammation**, v. 2017, p.1-17, 2017.

SHAH, J.B. The history of wound care. **Journal of the American College of Certified Wound Specialists**, v.3, n.3, p.65-66, 2011.

SILVA, J.R.; BURGER, B.; KÜHL, C.M.C.; CANDREVA, T.; ANJOS, M.B.P.; RODRIGUES, H.G. Wound healing and omega-6 fatty acids: from inflammation to repair. **Mediators of Inflammation**, p.1-17, 2018.

SPIRA, J.A.O.; BORGES, E.L.; JÚNIOR, J.F.J.; MONTEIRO, D.S.; KITAGAWA, K.Y. Estimated costs in treating sickle cell disease leg ulcer. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.54, p.1-7, 2020.

STEEN, E.H.; WANG, X.; BOOCHOON, K.S.; EWING, D.C.; STRANG, H.E.; KAUL, A.; MASRI, L.; BALAJI, S.; HOLLIER, L.H.; KESWANI, S. Wound healing and wound care in neonates: current therapies and novel options. **Advances in Skin & Wound Care**, v.33, n.6, p.294-300, 2020.

TAVERNER, T.; CLOSS, S. J.; BRIGGS, M. Painful leg ulcers: community nurses knowledge and beliefs, a feasibility study. **Primary health care research & development**, v. 12, n. 4, p. 379-392, 2011.

TESSEMA, Z.; MAKONNEN, E.; DEBELLA, A.; MOLLA, Y. Evaluation of in vivo wound healing and anti-inflammatory activity of crude extract of the fruits of *Brucea antidysentrica* in mice. **Wound Medicine**, v.21, p.16-21, 2018.

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

TRENTIN, D.S.; SILVA, D.B.; AMARAL, M.W.; ZIMMER, K.R.; SILVA, M.V.; LOPES, N.P.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. **Plos One**, v.8, n.6., p.1-13, 2013.

TSIROGIANNI, A.K.; MOUTSOPOULOS, N.M.; MOUTSOPOULOS, H.M. Wound healing: Immunological aspects. **Injury, International Journal of The Care of The Injured**, v.37, p. 5-12, 2006.

VEITH, A.P.; HENDERSON, K.; SPENCER, A.; SLIAR, A.D.; BAKER, A.B. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.146, p.97-125, 2019.

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

VOGLER, B. K. Aloe vera: a systemic review of its clinical effectiveness. **British Journal of General Practice**, v.49, p.823-828, 1999.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. **Frontiers in Immunology**, v.5, p.1-9, 2014.

WANG, P-H.; HUANG, B-S.; HORNG, H.C.; YEH, C-C.; CHEN, Y-J. Wound healing. **Journal of the Chinese Medical Association**, v.81, p.94-101, 2018.

WANG, T.; GU, Q.; ZHAO, J.; MEI, J.; SHAO, M. PAN, Y.; ZHANG, J.; WU, H.; ZHANG, Z.; LIU, F. Calcium alginate enhances wound healing by up-regulating the ratio of collagen types I/III in diabetic rats. **International Journal Clinical and Experimental Pathology**, v.8, n.6, p.6636-6645, 2015.

WEBER, C.R.; SOARES, C.M.L.; LOPES, A.B.D.; SILVA, T.S.; NASCIMENTO, M.S.; XIMENES, E.C.P.A. *Anadenanthera colubrina*: a therapeutic potential study. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v.92, n.4, p.235-244, 2011.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v.83, p.835-870, 2003.

WONG, S.L.; DEMERS, M.; MARTINOD, K.; GALLANT, M.; WANG, Y.; GOLDFINE, A.B.; KAHN, C.R.; WAGNER, D.D. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. **Nature Medicine**, v.21, n.7, p.815-819, 2015.

XU LANDÉN, N.; LI, D.; STAHL, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.73, p.3861-3885, 2016.

10. ANEXO I

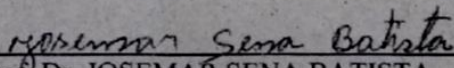


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DO EXTRATO DE ANGICO (ANADENANTHERA COLUBRINA) NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS INFECTADAS EM CAMUNDONGOS", registrada com o nº 07/2019, sob a responsabilidade da Profª. Drª. RENATA GRESPAN ALMEIDA que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo: Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de **25/03/2019**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início:01/04/2019, Término:01/04/2021
Espécie/linhagem/raca	Mus musculus/ Swiss albinos
Nº de animais	360
Peso/Idade	20 a 30g / 8-12
Sexo	F
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS.


 Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
 Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
 Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE
 49100-000
 Fones: 3212 6661/6606

11. APENDICE I

Padronização para a análise histológica de feridas excisionais induzidas em camundongos

a) Infiltrado leucocitário: avaliação do infiltrado leucocitário em cortes corados com HE utilizando a objetiva de 40x

Escore	Descrição
0	Ausente- ausência de células inflamatórias
1	Leve- presença de algumas células inflamatórias, com 1-5 leucócitos/campo
2	Moderado- muitas células inflamatórias, com 6-10 leucócitos/campo
3	Acentuado- presença exacerbada de células inflamatórias, com >10 leucócitos/campo

b) Vascularização: avaliação da quantidade de vasos sanguíneos em cortes corados com HE utilizando a objetiva de 40x

Escore	Descrição
0	Ausente- 1-2 vasos/campo
1	Leve- com 3-4 vasos/campo
2	Moderado- 4-5 vasos/campo
3	Acentuado- >5 vasos/campo

c) Re-epitelização: avaliação da nova camada epitelial formada nos cortes corados com HE utilizando a objetiva de 10x

Escore	Descrição
0	Ausente- ausência de re-epitelização
1	Leve- re-epitelização parcial (língua epitelial ocupando até 1/3 da lacuna da ferida)
2	Moderado- re-epitelização parcial (língua epitelial ocupando > 1/3 da lacuna da ferida)
3	Acentuado- completa re-epitelização (língua epitelial cobre toda a lacuna da ferida)

d) Deposição de colágeno: avaliação da quantidade de colágeno depositada nos cortes corados com Tricromo de Masson utilizando a objetiva de 40x

Escore	Descrição
0	Ausente- ausência da deposição de fibras colágenas
1	Leve- incompleta deposição de colágeno (muitos fibroblastos, fibras de colágeno finas e baixa densidade)
2	Moderado- completa deposição de colágeno (muitos fibroblastos, fibras de colágeno finas e alta densidade)
3	Acentuado- completa deposição de colágeno (poucos fibroblastos, fibras de colágeno espessas e organizadas, resultando em altíssima densidade)

Fonte: Adaptado de ESTEVÃO et al. (2019).