

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DA *VIOLA OLEIFERA*
(Schott) A. C. Smith EM LESÕES CUTÂNEAS DE RATOS WISTAR

GLAUCIMEIRE ROCHA CARVALHO

VILA VELHA
JULHO/2020

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DA *VIOLA OLEIFERA*
(Schott) A. C. Smith EM LESÕES CUTÂNEAS DE RATOS WISTAR

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

GLAUCIMEIRE ROCHA CARVALHO

VILA VELHA
JULHO/2020

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C331a Carvalho, Glaucimeire Rocha
Avaliação do efeito cicatrizante da *Virola Oleifera* (Schott) A.
C. Smith em lesões cutâneas de ratos Wistar / Glaucimeire
Rocha Carvalho – 2020.
80 f.; il.

Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas),
Universidade Vila Velha, 2020.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia. 2. Antioxidante. 3. Pele – Ferimentos e
lesões – Tratamento. 4. Ratos como animais de laboratório. I.
Pereira, Thiago de Melo Costa. II. Universidade Vila Velha. III.
Título.

CDD 615.321

GLAUCIMEIRE ROCHA CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DA VIROLA OLEIFERA
(Schott) A. C. Smith EM LESÕES CUTÂNEAS DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 31 de julho de 2020.

Banca examinadora:



Prof. Dra. Carine Coneglian de Farias Colman - IFES



Prof. Dra. Girlandia Alexandre Brasil Amorim - UVV



Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira - UVV

Orientador

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus que permitiu vivenciar uma jornada incrível. Ao meu esposo, Luciano pelo amor e parceria incondicional, tornando este processo mais leve e prazeroso.

Às minhas “pequeninas” sobrinhas Stella, Catharina e afilhado Benjamin, por todos sorrisos e carinho.

Ao meu pai Glimar e meus irmãos Diogo e Karine pelo apoio e amor. À minha mãe do coração Mirian pelo suporte espiritual e emocional. E em especial à minha mãe Maria Lúcia (*in memoriam*) e avó Maria, (*in memoriam*) que sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial. Essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda experiência, aprendizado dessa jornada sempre me mostrando que tudo acontece por algum motivo e no seu tempo determinado, sempre com sua voz amorosa por meio do Espírito Santo me ajudou e acalentou meu coração diante das dificuldades, me permitindo concluir essa etapa.

Ao meu esposo Luciano que esteve sempre comigo, mesmo que nos bastidores me incentivando e apoiando para que eu pudesse concluir essa fase.

Ao professor Dr. Thiago de Melo Costa Pereira que me aceitou como sua aluna e concedeu esta oportunidade incrível de realizar um projeto tão promissor. Obrigada pela paciência, disponibilidade, dedicação, orientação e por todo crescimento acadêmico. Minha eterna admiração e gratidão.

À professora Dr^a. Bianca Prandi Campagnaro pelo conhecimento transmitido, sugestões pertinentes, sempre muito gentil e disposta a ajudar.

Agradeço as minhas amigas Maynara Marcarini, Rafaela Aires e Larissa Zambom, pela contribuição científica, suporte emocional e amizade.

Aos alunos de iniciação científica, em especial Débora Braz, Talita Carvalho e Alexandra Bicas pela colaboração e dedicação ao projeto.

Ao Marcio Guidoni e prof. Dr. Marcio Fronza pela colaboração com o projeto que fez toda diferença.

Ao Fernando Côco e Neuza pela generosidade em nos receber em sua propriedade em Afonso Claudio (ES) permitindo a coleta da resina de VO.

À Lucienne Souza técnica em histologia e ao professor/coordenador Dr. Breno Valentim Nogueira do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) da Universidade Federal do Espírito Santo pela colaboração permitindo a finalização do trabalho.

Aos integrantes do nosso Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Translacional pelo companheirismo e troca de conhecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Vila Velha (PPGCF-UVV) pela oportunidade de estudo, e aos professores por todo ensinamento.

Agradeço a parceria da Universidade Federal do Espírito Santo e Instituto Federal do Espírito Santo, que permitiram a realização de alguns experimentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pela bolsa de estudos concedida e apoio financeiro.

A banca examinadora composta pelas professoras Dr^a. Carine Colman e Dr^a. Girlandia Brasil pela disponibilidade, todas críticas construtivas e sugestões.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho. O meu eterno agradecimento.

“Confie Naquele que te conhece e conduz teus dias.”

Salmos 139 v.1-3

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Estrutura da Pele	18
2.2 Processo de cicatrização de feridas – Visão geral	19
2.3 Fase de Hemostasia	19
2.4 Fase Inflamatória	21
2.5 Fase da Proliferativa	22
2.6 Fase de Remodelamento	23
3. Influência do Estresse Oxidativo na Cicatrização	24
4. Tratamentos Convencionais	26
5. Tratamentos com Produtos Naturais	28
6. <i>Virola oleifera</i> (Schott)	30
7. JUSTIFICATIVA	32
8. OBJETIVOS	33
8.1 Objetivo Geral	33
8.2 Objetivos Específicos	33
9. MATERIAIS E MÉTODOS	34
9.1 Coleta da resina de <i>Virola oleifera</i> (Schott)	34
9.2 Composição dos cremes utilizados nos grupos experimentais	35
9.3 Animais	36
9.4 Procedimento cirúrgico para indução das feridas	36
9.5 Padronização dos grupos experimentais	37
9.6 Coleta de material biológico e histológico	38
9.7 Fotografia e análise das imagens e índice de cicatrização	39
9.8 Método e pontuação para sangramento, evolução da borda e crosta da ferida	40
9.9 Histologia	41
9.10 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	41

9.11 Produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP)	42
9.12 Análise Estatística	42
10. RESULTADOS.....	43
10.1 Contração da ferida.....	43
10.2 Método de pontuação para o sangramento.....	45
10.3 Método de pontuação para evolução da borda da ferida	45
10.4 Método de pontuação da evolução da crosta.....	46
10.5 Histologia	47
10.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	48
10.7 Produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP)	49
10.8 Parâmetros séricos bioquímicos	50
10.9 Peso corporal dos grupos experimentais	51
11. DISCUSSÃO	52
12. CONCLUSÃO	57
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
14. ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE VILA VELHA.....	80
15. ANEXO B – TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGEM DA PELE.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem representativa das camadas da pele humana.

Figura 2: Publicações sobre o uso de extrato vegetais e antioxidantes para tratamento de feridas ao longo dos anos.

Figura 3: Fotografia representado as características da árvore *Virola oleifera* .

Figura 4: Foto representativa da extração da resina *Virola oleifera* até sua forma pulverizada.

Figura 5: Cremes utilizados para o tratamento dos grupos experimentais.

Figura 6: Tricotomia e confecção das lesões cutâneas.

Figura 7: FastPrep-24 utilizado para homogeneizar as amostras.

Figura 8: (A) Fotografia representativa da ferida por grupo e tempo de tratamento. (B) Análise quantitativa da contração da ferida após o uso tópico diário de CV, CP, VO e VO+Veg. (C) Área sob a curva dos grupos experimentais representando a contração da ferida entre os grupos.

Figura 9: À esquerda, fotografia representativa do sangramento no leito da ferida por grupo e tempo de tratamento. À direita, gráfico representado o esquema de pontuação para o sangramento no leito da ferida durante o tratamento.

Figura 10: À esquerda, fotografia representativa da borda por grupo e tempo de tratamento. À direita, representação gráfica de pontuação para a evolução da borda durante o tratamento nos grupos experimentais.

Figura 11: À esquerda, fotografia representativa da crosta por grupo e tempo de tratamento. À direita, representação gráfica de pontuação para a evolução da crosta durante o tratamento.

Figura 12: Fotografias microscópicas histológicas representativa do processo cicatrização de feridas dos grupos experimentais CV, CP, VO e VO+Veg.

Figura 13: Alteração (delta) dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos grupos experimentais.

Figura 14: Alteração (delta) dos níveis de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) no tecido grupos experimentais.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema de Pontuação para sangramento, borda e crosta da ferida.

Tabela 2: Parâmetros séricos bioquímicos avaliados nos quatro grupos experimentais de tratamento de cicatrização

Tabela 3: Peso corporal dos animais

LISTA DE ABREVIATÖES

ADP - Adenosina difosfato

CP - Controle positivo

CV – Controle veículo

DAMPs - Padrões moleculares associados a danos

DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco

EGF - Fator de crescimento epidérmico

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

GP - Glicoproteína

GPx - Glutathiona peroxidase

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

MEC - Componente da matriz extracelular

•O₂⁻ - Ânion superóxido

•OH - Radical hidroxila

PBS - Solução de tampão fosfato-salino

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

p/v - Peso por volume

i.p. - Intraperitoneal

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RNS - Espécies reativas de nitrogênio

SOD - Superóxido dismutase

TNF-α - Fator de necrose tumoral-α

TGF-β - Fator de crescimento transformador β

TGF-β1 - Fator de crescimento β-1

TxA2 – Tromboxano A2

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

VO – *Virola oleifera*

VO+Veg – *Virola oleifera* com vegeaderme

fvW - Fator de fator de von Willebrand

RESUMO

CARVALHO, Glauceire Rocha, M.Sc, Universidade Vila Velha- ES, julho de 2020. **Avaliação do efeito cicatrizante da *Virola Oleifera* (Schott) A. C. Smith em lesões cutâneas de ratos Wistar.** Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

Em regiões adjacentes à Mata Atlântica brasileira, o extrato da resina *Virola oleifera* (VO) tem sido utilizada popularmente há décadas como cicatrizante para pele e mucosas. Mais recentemente, estudos inéditos desenvolvidos em animais experimentais em nosso laboratório têm demonstrado o efeito protetor da VO em diversos distúrbios dependentes de estresse oxidativo. Entretanto, a VO ainda não foi investigada em cicatrização de feridas, cujo processo fisiológico também pode ser modulado por substâncias com potencial antioxidante. Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar se a VO apresenta efeitos cicatrizantes *in vivo* por meio de aplicações tópicas previamente preparadas na forma de creme (5%, p/v). Para isso, foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, adultos, divididos em quatro grupos: controle veículo (CV), controle positivo (CP, tratado com mistura convencional de ácidos graxos essenciais e triglicerídeos de cadeia média), virola (VO) e virola com uma base com efeito cicatrizante já caracterizado vegeaderme (VO+Veg), avaliados em 3 momentos classificados como dias 0, 4 e 10 de tratamento. Ao longo do processo, realizou-se a análise macroscópica da contração tecidual da ferida através do *Image J* e análise histológica dos parâmetros celulares inflamatórios e colagenização. Em relação à resposta cicatrizante, o grupo tratado com o creme de VO apresentou uma redução de 27% e 23% em relação aos grupos CV e CP, desenvolvendo importante contração da ferida (respectivamente, $p < 0,05$). Quanto à análise de sangramento, formação de borda e crosta da ferida, o tratamento com VO também apresentou superioridade aos demais grupos, nos diferentes tempos de análise ($p < 0,05$), sendo confirmada também por análise típica histológica. Em relação aos estudos de sobre o estresse oxidativo, os grupos VO e CP apresentaram redução expressiva dos níveis de oxidação proteica e peroxidação lipídica comparado aos grupos CV e VO+Veg ($p < 0,05$). Quanto a avaliação de possível impacto de toxicidade, os resultados bioquímicos não demonstram efeitos tóxicos da formulação preparada com VO ($p > 0,05$). Diante do exposto, nossos resultados demonstram a capacidade cicatrizante de uma formulação inédita preparada com VO, justificada, em parte, por mecanismos antioxidantes

contribuindo para a resposta de reepitelização, tornando-se um promissor dermocosmético para o tratamento de cicatrização de feridas.

Palavras chaves: Antioxidante, ferida, bicuiba, extrato vegetal, polifenol, reepitelização.

ABSTRACT

CARVALHO, Glauceire Rocha, M.Sc, University Vila Velha- ES, July de 2020. **Evaluation of the healing effect of *Viola oleifera* (Schott) A. C. Smith in cutaneous lesion of wistar rats.** Advisor: Thiago de Melo Costa Pereira.

In regions adjacent to the Brazilian Atlantic Forest, the extract of the *Viola oleifera* (VO) resin has been popularly used for decades as a healing agent for skin and mucous membranes. More recently, studies carried out on experimental animals in our laboratory have demonstrated the protective effect of VO on several disorders dependent on oxidative stress. However, VO has not yet been investigated in wound healing, whose physiological process can also be modulated by substances with antioxidant potential. Therefore, the aim of this study was to investigate whether VO presents healing effects *in vivo* through topical applications previously prepared in the form of cream (5% w/v). For this, male, adult Wistar rats were used, divided into four groups: vehicle control (CV), positive control (CP, treated with conventional mixture of essential fatty acids and medium chain triglycerides), virola (VO) and virola with a foundation with healing effect already characterized veederme (VO + Veg), evaluated in 3 moments classified as days 0, 4 and 10 of treatment. Throughout the process, macroscopic analysis of wound tissue contraction was performed using *Image J* and histological analysis of inflammatory cell parameters and collagenization. In relation to the healing response, the group treated with VO cream showed a reduction of 27% and 23% in relation to the CV and CP groups, developing an important wound contraction (respectively, $p < 0.05$). As for the analysis of dryness, border and crust formation treatment with VO also showed superiority to the other groups, at different times of analysis ($p < 0.05$), being also confirmed by typical histological analysis. Regarding studies on oxidative stress the VO and CP groups showed a significant reduction in the levels of protein oxidation and lipid peroxidation compared to the CV and VO+Veg groups ($p < 0.05$). Regarding the assessment of possible toxicity impact, the biochemical results do not demonstrate toxic effects of the formulation prepared with VO ($p > 0.05$). Our results demonstrated the healing capacity of an unprecedented formulation prepared with VO, partially justified by antioxidant mechanisms contributing to the reepithelization response, becoming a promising dermocosmetic for the treatment of wound healing.

Keywords: Antioxidant, healing, bicuiba, plant extract, polyphenols, reepithelization.

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo e compõe uma barreira importante e eficaz de proteção contra danos externos, mecânicos, químicos, biológicos e por patógenos (Par, 1825; Guo; Dipietro, 2010; Su; Richmond, 2015; Rousselle et al., 2018). Quando há interrupção dessa homeostase, como por exemplo em lesão cutânea, o corpo inicia uma série de eventos complexos para restabelecer essa proteção. A cicatrização é representada por quatro fases distintas, entretanto, contínuas e sobrepostas (Clark, 1996; Shah et al., 2017; El Ayadi et al., 2020): (1) hemostasia é o primeiro evento, em que a cascata de coagulação é ativada, seguida de (2) resposta inflamatória, caracterizada por influxo de neutrófilos liberadores de citocinas pró-inflamatórias no local da ferida que geralmente produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) promovendo a proteção contra microrganismos invasores (Babior, 1978; Serra et al., 2017; Esposito et al., 2019); uma nova epitelização acontece na (3) fase proliferativa, caracterizada por uma nova epitelização reestabelecendo novos vasos sanguíneos e componentes da matriz extracelular (MEC) durante um período de semanas a meses, até que (4) na fase de remodelamento, a MEC é reconstituída com colágeno tipo III, promovendo a contração da ferida (Buffoni et al., 1993; Sorg et al., 2016; Koyama et al., 2019).

O sucesso de uma boa regeneração tecidual está relacionado aos processos celulares, humorais e moleculares que são altamente regulados. Desequilíbrios em um ou mais destes pilares podem comprometer o processo cicatricial. Como por exemplo, feridas crônicas não cicatrizantes, caracterizada com excesso de infiltração de neutrófilos favorecem a superprodução de ROS, resultando em atraso nas demais fases com *déficit* tecidual, redução na deposição de colágeno, angiogênese prejudicada e proliferação celular diminuída (Leibovich; Ross, 1975; Salazar et al., 2016; Okonkwo; Dipietro, 2017). Portanto, o desequilíbrio entre os agentes antioxidantes e pró-oxidantes, pode culminar com estresse oxidativo prejudicando diretamente os mecanismos cicatriciais (Wlaschek; Kochanek, 2005; Nouvong et al., 2016).

Embora a área de cuidados de feridas esteja em pleno crescimento em vários países (inclusive o Brasil), o tratamento eficaz desses indivíduos ainda é um desafio a três fatores principais: Comprometimento da angiogênese, inflamação exacerbada e estresse oxidativo (Zhu et al., 2018; Zinder et al., 2019; Gouzos et al., 2020). Para

resolver esses problemas, os esforços de pesquisa e desenvolvimento recente se concentram na liberação local de fármaco ou proteínas, terapias genicas ou uso de células autólogas para fabricar equivalentes de tecido de pele (Gwak; Sohn, 2017; Srivastava et al.,2019; Huang et al., 2020). Embora sejam linhas promissoras, produtos que resultem dessas estratégias enfrentam regulamentações e obstáculos substanciais que complicam e atrasam a tradução para a clínica, devido à sua classificação como fármacos, produtos biológicos ou combinação de produtos por órgãos como o FDA (Estados Unidos) ou ANVISA (Brasil). Outro agravante é que quando aprovado para uso humano, estreitas indicações de uso, elevados custos e efeitos colaterais negativos passam a limitar seu consumo pela população geral (Dreifke et al., 2014; Zhu et al., 2018; Srivastava et al.,2019; Tan et al.,2019).

Em virtude de interessantes respostas cicatriciais com os produtos naturais, as plantas medicinais têm ganhado destaque no âmbito da pesquisa nacional. Por ser um dos países com maior riqueza em biodiversidades naturais e conhecimento popular o uso de plantas medicinais com potencial antioxidante, o Brasil reúne fortes características para a investigação de espécies que beneficiem a recuperação tecidual (Barreto et al., 2016; Serra et al., 2017). A espécie *Virola oleifera*, alvo de investigação neste estudo reúne as clássicas características acima mencionadas.

A *Virola oleifera* uma planta nativa da Mata Atlântica do Espírito Santo, provida de um exsudado avermelhado ao interior da casca, dotada atividade antioxidante (Bôa et al., 2015; Aguilar et., al 2019; Rodrigues, 1980). Nos últimos 5 anos, tem ganhado destaque em nosso grupo de pesquisa por apresentar uma mistura de vários compostos fenólicos e flavonoides (justificando a atividade antioxidante), além de propriedades anti-inflamatória, ateroprotetora (Coutinho et al., 2017), nefroprotetora (Bôa et al., 2015) e gastroprotetora (Pereira et al., 2017) publicado em diversos trabalhos realizados em nosso laboratório e em parceria com outros da Universidade Vila Velha, Universidade Federal do Espírito Santo e Instituto Federal do Espírito Santo. Entretanto, até o momento, os estudos com o potencial cicatrizante ainda não foram investigados. Diante do exposto acima e a fim de buscar novas alternativas terapêuticas em recursos naturais, investigar a VO como recurso natural faz com que esta pesquisa translacional seja de elevada aplicabilidade, oportuna e de baixo custo para possíveis desenvolvimentos de produtos farmacêuticos tópicos de origem nacional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura da Pele

A pele é o maior órgão do corpo e promove uma barreira fisiológica contra danos externos, mecânicos, químicos, biológicos e patógenos, além de proporcionar termorregulação, modulação imuno-neuroendócrina e capacidade de regeneração tecidual (Par, 1825; Landén et al., 2016; Rousselle et al., 2018).

De acordo com a Figura 1, a pele é dotada de três camadas: 1) Epiderme, sendo a camada externa, constituída por cinco subcamadas estratificadas (estrato córneo, lucidum, granuloso, espinhoso e basal) e células como os queratinócitos, células-tronco residentes e células de Langerhans e Merkel (Hew et al., 2016; Belokhvostova et al., 2018; Bocheva et al., 2019); 2) Derme, que corresponde ao componente mesenquimal da pele, separado da epiderme pela membrana basal. É formada por papilas dérmicas, contendo fibras de colágeno, terminações nervosas e vasos microvasculares que promove nutrição e oxigenação. Possui mastócitos, linfócitos, células dendríticas e células endoteliais vasculares, com predomínio de fibroblastos que tem a capacidade de sintetizar e remodelar o componentes da matriz extracelular (Zuo; Lu, 2017; Atiti et al., 2018; Rippa et al., 2019); 3) Hipoderme ou tecido subcutâneo, cuja camada é a mais interna e consiste principalmente de tecido adiposo que é separado em lóbulos por uma rede fibrovascular de septos do tecido conjuntivo, ligando a derme à fáscia profunda. Os componentes celulares da hipoderme incluem essencialmente adipócitos e, em menor quantidade, os fibroblastos e macrófagos. Fisiologicamente, também atua como adsorvente de impacto, reservatório de armazenamento de nutrientes e energia (Wong et al., 2016; Ye; De, 2017; Randall et al., 2018).

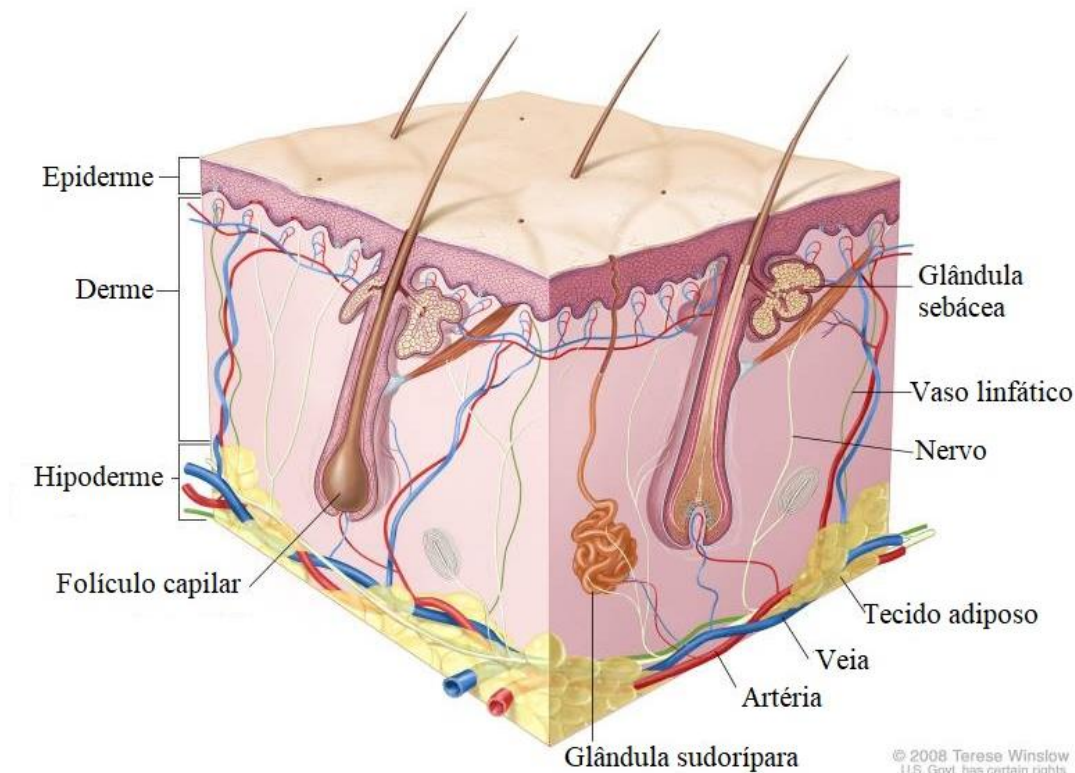


Figura 1: Imagem representativa das camadas da pele humana. (Adaptado de Terese Winslow LLC, U.S 2008)

2.2 Processo de cicatrização de feridas – Visão geral

A cicatrização de feridas é um processo multifacetado e importante, com a finalidade de restaurar a integridade da pele (Shukla et al., 1998; Lindley et al., 2016; El Ayadi et al., 2020). Esse mecanismo desencadeia uma série de processos biológicos que incluem hemostasia, inflamação, proliferação, migração de diferentes tipos celulares, angiogênese, síntese de matriz, deposição de colágeno e processo de remodelamento que depende das condições do tecido se restabelecendo entre vinte e um dias ou até em um ano (Broughton et al., 2006; Ellis et al., 2018; Valleé; Lecarpentier, 2019).

2.3 Fase de Hemostasia

A resposta hemostática é o primeiro evento após o dano tecidual e pode durar até três dias. É um eficiente mecanismo fisiológico composto por vasos, proteínas

da coagulação, plaquetas e componentes da parede vascular, que formarão um tampão hemostático localizado evitando o sangramento (Boon,1993; Ridiandries et al., 2018; Kiya; Kubo, 2019).

Em condições fisiológicas a circulação de plaquetas é mantida por propriedades não trombogênicas da monocamada de células endoteliais. Entretanto, são ativadas quando ocorre a interrupção da camada endotelial ou exposição da matriz subendotelial que é rica em fibras de colágeno, resultando em vasoconstrição desencadeado por vasoconstritores (endotelina, catecolaminas, adrenalina, noradrenalina e prostaglandinas) e ativação de células mesenquimais (Godo; Shimokawa, 2017; Opneja et al., 2019). A vasoconstrição desencadeia o aumento da hipóxia e acidose da ferida, resultando em relaxamento passivo e sangramento, o que impulsiona uma nova vasoconstrição mediada por bradicinina, fibrinopeptídeo, serotonina, tromboxano mediada pelo receptor 2 (TxA2) e adenosina difosfato (ADP) (Welsh et al., 2014; Stalker et al., 2013; Lindley et al., 2016; Tomaiuolo et al., 2017; Nosenko et al., 2019).

As plaquetas circulantes são recrutadas para o local da lesão através de interações adesivas entre o fator de von Willebrand (fvW) e fibras de colágeno na parede do vaso e o complexo receptor de plaquetas GPIb / IX / V. As interações do complexo fvW-GPIb são fracas, assim ligações adicionais como da integrina $\alpha 2\beta 1$ ao colágeno e $\alpha IIb \beta 3$ ao fvW são fundamentais para a fixação das plaquetas no local da lesão (Sen; Roy, 2008; Qiao et al., 2018; Nosenko et al., 2019). Além disto, as espécies reativas de oxigênio geradas nas plaquetas ativadas, também desempenham um papel importante na regulação das respostas plaquetárias à formação de colágeno e trombo (Qiao et al., 2018; Holinstat, 2017; Rodríguez et al., 2019; Lim et al., 2019). Após a adesão na parede do vaso, as plaquetas sofrem modulação no citoesqueleto, deixando sua forma mais esférica resultando na formação inicial de coágulo ou trombo.

Essa agregação permite uma forte ligação plaquetária ao MEC, estimulando à adesão de outras plaquetas a matriz, para liberar citocinas pró-inflamatórias, fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), além de secretar agonistas de plaquetas, ADP e TxA2 reforçando a formação e a agregação plaquetária (Coller, 2011; Golebiewska; Poole, 2015; Lisman; Moerloose, 2016; Ellis et al., 2018). A ativação das vias de coagulação

intrínsecas e extrínsecas induzem a ativação do fator X, onde a protrombina é convertida em trombina, que por sua vez hidrolisa o fibrinogênio em fibrina. Paralelamente, o fator XIII estabiliza a fibrina possibilitando agregação das plaquetas e formando um tampão que serve como matriz provisória da ferida para a infiltração de outras células nos estágios subseqüentes da cicatrização (Sen; Roy, 2008; Coller, 2011; Matowicka, 2016; Nosenko et al., 2019).

2.4 Fase Inflamatória

Após controlar o sangramento local, ocorre a infiltração sequencial de neutrófilos, macrófagos e linfócitos promovendo a fase inflamatória, a fim de evitar danos ao tecido e eliminar organismos patogênicos, um processo que dura de quatro a seis dias (Singer; Clark, 1999; Larouche et al., 2018; Ellis et al., 2018). O recrutamento das células inflamatórias ocorre em resposta as células hospedeiras que sofrem apoptose e liberam o conteúdo celular como DNA, RNA ou componentes da matriz extracelular, proteínas modificadoras associadas a patógenos (PAMPs) e/ou proteínas modificadoras associadas a danos (DAMPs), sinalizando um processo inflamatório (Matowicka, 2016; Minutti et al., 2017; Baron et al., 2020).

Os neutrófilos, células predominantes na fase inflamatória, são células efetoras do sistema imunológico inato, é mediado por IL-8 ou CXCL8, e produzem altos níveis ROS, proteases e citocinas pró-inflamatórias para limpar a ferida. Ao final desse processo os neutrófilos sofrem apoptose e são fagocitados pelos macrófagos (derivados de monócitos) recém-chegado (Cassatella, 1999; Mantovani et al., 2011; Oliveira et al., 2016; Butin et al., 2019).

Os macrófagos atuam no reconhecimento aos DAMPs/PAMPs, liberando peróxido de hidrogênio e iniciando a cascata pró-inflamatória. As duas formas predominantes de macrófagos são M1 (pró-inflamatório), a forma ativada clássica que atua como “scavenger” de detritos, além de realizar fagocitose do patógeno e remover as células danificadas (Kotwal; Chien, 2017; Veremeyko et al., 2018; Krzyszczyk et al., 2018), a medida que o tecido se recupera, a população de macrófagos muda para a forma M2 (anti-inflamatório), que possui funções de reparo e regeneração, e estão envolvidos na eferocitose, síntese de mediadores anti-inflamatórios, produção de matriz extracelular, proliferação de fibroblastos e processos angiogênicos (Mantovani et al., 2011; Smigiel; Parks, 2018; Hwang et al.,

2019). A polarização de M1 a M2, reflete o processo de diferenciação de macrófagos que altera as células das funções de inflamação para proliferação, sendo um passo vital na cicatrização de feridas causada por IL-4, IL-10, glicocorticoides, prostaglandinas e moduladores do metabolismo de glicose e lipídios (Landén et al., 2016; Singh et al., 2017; Julier et al., 2017). Convém salientar que os clássicos moduladores biológicos da cicatrização também estão presentes no ambiente da matriz extracelular tais como os eicosanoides (Baker, 1990; Ramirez et al., 2018; Bieren, 2019), autacóides (Melmon et al., 1981; Keppel, 2017; Hesselink et al., 2016), fator de crescimento (Ridiandries et al., 2018; Patel et al., 2016) e outras moléculas derivadas de ROS-dependentes (lipídios, proteínas e DNA oxidados), presentes no ambiente da matriz extracelular também em quantidades excessivas podem paradoxalmente prejudicar a qualidade e quantidade do tecido de granulação (Tonnesen et al., 2000; Dunnill et al., 2015; Oliveira et al., 2016; Shedoeva et al., 2019). Quando bem sucedida, ao final do processo inflamatório, os fatores de crescimento e angiogênese derivados de macrófagos, atingem sua maturidade e favorecem o influxo de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos na ferida, promovendo a fase proliferativa (Qing, 2017; Ellis et al., 2018)

2.5 Fase Proliferativa

A transição da fase inflamatória para a proliferativa representa um passo fundamental durante a cicatrização de feridas com o objetivo de reduzir a área lesada por contração e fibroplastia, fornecendo uma barreira epitelial viável para ativar os queratinócitos (Martin, 1997; Sorg et al., 2016; Koyama et al., 2019).

Durante a fase proliferativa, o novo crescimento capilar acontece juntamente com os reparos dérmicos, e o endotélio é preenchido com células acessórias e células musculares lisas, que possibilita o transporte de fluido, oxigênio e nutrientes (Ridley; Hall, 1992; Rittié, 2016). A matriz provisória formada durante a hemostasia é substituída pelo tecido de granulação composto por fibroblastos, granulócitos, macrófagos, novos capilares emergentes e feixes de colágeno formado através do aumento da proliferação fibroblástica, biossíntese colágena e elástica, criando uma rede extracelular de tecido conjuntivo e a produção de fatores quimiotáticos. Os receptores de integrina expressos nos fibroblastos e nas células promovem a invasão no tecido coagulado (Tonnesen et al., 2000; Liu et al., 2008; Gonzalez et al.,

2016). Uma característica da fase proliferativa da cicatrização de feridas é a angiogênese robusta em resposta a fatores pró-angiogênicos em especial o VEGF, produzido em resposta a hipóxia e guiando o crescimento vascular para áreas de baixo oxigênio a partir da periferia em direção ao leito da ferida (Gurtner et al., 2008; Koh; DiPietro, 2011; Okonkwo; Dipietro, 2017).

Inicialmente, o processo de reparo é modulado pela resposta inflamatória nas bordas da ferida (queratinócitos), citocinas, fatores de crescimento que irão influenciar na migração, proliferação e diferenciação celular local (Mason et al., 2002; (Tonnesse et al., 2000; Gonzalez et al., 2016). A migração de fibroblasto, o principal responsável pela construção da nova matriz extracelular (Gonzalez et al., 2016; Atit et al., 2018), sua migração é regulada por mediadores inflamatórios tais como: fibronectina, PDGF, FGF e TGF- β que também favorecem a angiogênese (Zheng et al., 1997; Shook et al., 2016; Koyama et al., 2019). Os fibroblastos são recrutados na derme da borda da ferida para sintetizar colágeno, inicialmente do tipo III. A produção de uma membrana basal intacta entre a epiderme e a derme são fundamentais para seu restabelecimento e função. A contração da ferida, tem início nessa fase pelos fibroblastos, que são ricos em alfa actina de músculo liso (miofibroblastos), o acúmulo delas na borda da ferida executam atividades contráteis direcionadas ao centro da ferida. Citocinas específicas estimulam a proliferação e migram das bordas da ferida para promover o fechamento (reepitelização). Assim enquanto novos capilares respondem às necessidades de oxigênio e nutrientes dos tecidos em proliferação, as células epiteliais estimuladas produzem VEGF para estimular o crescimento capilar (Gabbiani, 1992; Tracy et al., 2016; Mescher, 2017; Hu et al., 2019).

É importante destacar que dificuldades cicatriciais podem ser desencadeadas pelo comprometimento da angiogênese visto que a formação de novos vasos sanguíneos é o que garante a perfusão do tecido, promovendo o acesso de nutrientes e células imunes ao tecido lesionado, auxiliando diretamente na regeneração e formação do tecido de granulação no local da ferida (Majno, 1998; Nowarski et al., 2017; Wang et al., 2018; Nagaraja et al., 2019).

2.6 Fase de Remodelamento

A fase de remodelação inicia-se entre a segunda e terceira semana após a lesão, com o objetivo de resitência à tração tecidual através da reorganização, degradação e ressíntese da matriz extracelular (Martin, 1997; Li et al., 2007; Valleé; Lecarpentier, 2019). O tecido de granulação é gradualmente remodelado, formando um tecido avascular e acelular com aumento progressivo das fibras de colágeno. Neste estágio ocorrem alterações na MEC, resolução da inflamação inicial e regressão da neovasculatura (Billingham; Russell, 1956; Yannas et al., 2017; Rodrigues et al., 2019). A superfície da lesão é coberta por uma monocamada de queratinocitos e uma nova epiderme estratificada com uma lâmina basal subjacente é restabelecida das bordas da ferida até sua porção interna (Darby et al., 2014; Ellis et al., 2018; Cañedo-Dorantes; Cañedo-Ayala, 2019). Os miofibroblastos contribuem para a remodelação pela liberação de metaloproteinases que degradam o colágeno depositado durante a formação do tecido de granulação, a síntese da matriz diminui significativamente e o colágeno III encontrado no tecido de granulação é gradualmente diminuído e substituído pelo colágeno I mais espessas, dispostas paralelamente para resultar em maior resistência à tração tecidual (Landén et al., 2016; Barnes et al., 2018).

Em grande parte, a fase de remodelação é impulsionada por miofibroblastos, sinalização de fator de crescimento beta-1 (TGF- β 1) e fator de crescimento pró-fibrótico, responsáveis pela contração da ferida (Clark, 1993; Water et al., 2013; El Ayadi et al., 2020). A medida que a ferida completa o processo de cicatrização, muitas células sofrem apoptose ou migram da ferida, diminuindo consideravelmente o colágeno tipo I/ tipo III, proteínas da MEC, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, culminando com o estágio de resolução que é essencial para a restauração da funcionalidade e a aparência "normal" do tecido lesionado (Xue; Jackson, 2015; Morton; Phillips, 2016; Ridiandries et al., 2018).

É importante ressaltar que fatores exógenos e edógenos podem modular tais eventos e influenciar no processo de cicatrização, como por exemplo distúrbios sistêmicos, corticoterapia entre outros, que dificultam a resolução desta fase (Fonseca et al., 2012; Gonzalez et al., 2016).

3. Influência do Estresse Oxidativo na Cicatrização

Ao longo de décadas, a literatura tem enfatizado que o processo de cicatrização de feridas pode ser regulado por mecanismos celulares, humorais e moleculares. Cada vez mais enfatiza-se a participação de ROS também atuam como sinalizadores intracelulares e moduladores da resposta cicatricial (Darr; Fridovich, 1994; Wlaschek; Kochanek, 2005; Childs; Murthy, 2017). Embora durante o processo de cicatrização o oxigênio seja necessário, o aumento da demanda energética tecidual durante o processo de cicatrização induz a um estado hipermetabólico, em que a energia adicional é gerada a partir do metabolismo oxidativo, aumentando a demanda de O₂ do tecido de cicatrização (Hunt et al., 1969; Schreml et al., 2010; Hussain et al., 2016; Sanchez et al., 2018). Ocorre que por via mitocondrial, parte do oxigênio utilizado não é completamente reduzido a molécula de água. Uma parte desse oxigênio sofre redução incompleta pela cadeia respiratória de elétrons, promovendo a produção de ROS.

As ROS são intermediários de oxigênio com elétrons não emparelhados, são agentes oxidantes ou facilmente convertidas em radicais de oxigênio que reagem com uma variedade de moléculas inorgânicas, carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Meyrelles et al., 2011; Smith et al., 2017; Guo et al., 2019). Atualmente, sabe-se que a maior produção de ROS por ser de fonte mitocondrial, seguida de vias como NADPH oxidase, citocromo P450, xantina oxidase, óxido nítrico sintase e lipoxigenase (Meyrelles et al., 2011; Porto et al., 2015; Salehi et al., 2018), e ela ocorre em resposta a fatores de crescimento e citocinas, contribuindo para o aumento da produção de ROS, que quando associados a uma redução das atividades antioxidantes (superóxido dismutases, catalase e glutathione peroxidase), favorece a degeneração tecidual (Guo; Dipietro, 2010; Almeida; O'Brien, 2013; Jacinto et al., 2018; Smith et al., 2017).

Durante a cicatrização de feridas, processos de biossíntese e transporte celular são dependentes de oxigênio. Altas taxas de proliferação e produção de MEC, em especial colágeno, aumentam a demanda energética, que de forma desordenada resulta em estresse oxidativo (Hunt et al., 1969; Schreml et al., 2010; Hussain et al., 2016; Hoffmann et al., 2018).

As ROS estão envolvidas em todas as etapas de cicatrização, elas podem: estimular a diapedese de leucócitos aderentes através da parede vascular a fim de induzir a morte de microrganismos no local lesionado, auxiliar na formação de trombos relacionados à agregação plaquetária inicial e recrutar células inflamatórias

no leito da ferida (Kivisaari et al., 1975; Dunnill et al., 2015; Smith et al., 2017; Han, Ceilley, 2017). Na fase inflamatória: atuar na remoção de microrganismos invasores através de neutrófilos e macrófagos. Além disso o H_2O_2 e $\cdot O_2^-$ modulam a expressão de moléculas de adesão de leucócitos endoteliais, além de estimular a migração de neutrófilos e macrófagos através da expressão do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (Babior, 1978; Patel et al., 2016; Diwanji; Bergmann, 2017; Degovics et al., 2019). Promover a angiogênese pela sinalização dos receptores VEGF estimulado por H_2O_2 em macrófagos e queratinócitos (Kuroki et al., 1996; Zhao et al., 2014; Lévine et al., 2017). E no processo de reepitelização as ROS induzem a proliferação e migração de queratinócitos epidérmicos, auxilia na produção de colágeno I e III e miofibroblastos, ajudando a unir as bordas da ferida (Smith et al., 2017; Diwanji; Bergmann, 2017; Huang et al., 2018; Degovics et al., 2019).

Apesar das ROS serem essenciais para iniciar o reparo da ferida, em quantidade excessiva podem ser prejudiciais como por exemplo, durante a angiogênese podem reduzir a biodisponibilidade tecidual do óxido nítrico e assim a redução da sinalização do VEGF (Cecarini et al., 2007; Kolluru et al., 2012; ; Lévine et al., 2017), apresentar efeitos deletérios, induzindo peroxidação lipídica, oxidação proteica e de genotoxicidade (Meyrelles et al., 2011; Porto et al., 2015; Lévine et al., 2017; Jacinto et al., 2018; Ito et al., 2019). Promover o aumento de apoptose e senescência celular, danificam os fibroblastos os tornando senescentes e perdendo a capacidade de produzir matriz extracelular e se tornando resistentes à apoptose, permitindo que se acumulem na área da ferida e aumentem a produção de metaloproteinsases da matriz e citocinas pró-inflamatórias, comprometendo resolutividade da feridas (Sem; Roy, 2008; Bryan et al., 2012; Hameedaldeen et al., 2014; Porto et al., 2015; Jacinto et al., 2018). Tais evidências experimentais são também observadas em estudos clínicos ao demonstrarem que as feridas não cicatrizantes são mantidas em ambiente altamente oxidantes, prejudicando o reparo da lesão (Hoffmann; Griffiths, 2018; Lévine et al., 2017; Sanchez et al., 2018; Degovics et al., 2019).

4. Tratamentos convencionais

Embora exista uma diversidade de abordagens terapêuticas para o tratamento de feridas, muitas delas apresentam limitações tais como o retardo da migração de fibroblastos com o uso de antibióticos (Serra et al., 2015; Barshak; Durand, 2017; Gouzos et al., 2020), redução na síntese de colágeno, fibroblastos e glicosaminoglicanos com o uso repetido de corticosteroides (Cruz; Korchin, 1994; Wang et al., 2013; Ogawa, 2017; Zinder et al., 2019) além de resultados duvidosos com ácidos graxos essenciais, amplamente utilizados seja em ambientes residenciais e/ou hospitalares.

Dessa forma, novas alternativas que viabilizem o reparo cicatricial mais próximo da fisiologia normal continuam sendo estratégias importantes para novas pesquisas na área de feridas (Gwak; Sohn, 2017; Tan et al., 2019). Para tanto, estratégias de bioengenharia, por exemplo, tem procurado produzir tecidos de reposição para restaurar ou manter a função da pele. Contudo, os principais obstáculos clínicos estão relacionados a problemas como a transferência e vascularização do tecido, além dos desafios com o alto custo, disponibilidade e regulamentos governamentais (Antoni et al., 2015; Tenenhaus; Rennekampff, 2016; Sorg et al., 2017; Sharma et al, 2019). Em paralelo, o uso de células-tronco tem se apresentado como uma alternativa para o tratamento de feridas devido a capacidade de auto renovação, pluripotência e baixa imunogenicidade. Entretanto, seu uso também é limitado devido à impureza da população de células transplantadas, capacidade significativa para produzir tumor ou tecido indesejável na ferida, além de aspectos relacionados ao alto custo (Naderi et al., 2011; Austin et al., 2015; Oryan et al., 2017; Huang et al., 2020).

Podemos destacar também terapias relacionadas à biologia molecular com os miRNA visando o silenciamento de genes que comprometem o reparo tecidual através da administração sistêmica ou até mesmo administrações tópicas de indutores/inibidores de miRNA. Lamentavelmente, essas técnicas também possuem obstáculos: baixa captação celular de RNA, possibilidade de imunogenicidade, degradação na corrente sanguínea por RNases e rápida depuração renal, necessitando de métodos mais eficientes para fornecer a posologia apropriada a fim de evitar efeitos colaterais, aliada ao alto custo (Shilo et al., 2007; Banerjee; Chandan, 2015; Yan et al., 2016; Miscianinov et al., 2018; Srivastava et al., 2019).

Em virtude do que foi mencionado, apesar de tantas possibilidades de tratamentos com potencial terapêutico, os obstáculos acima referidos limitam

inexoravelmente seu consumo pela população em geral (Dreifke et al., 2014; Zhu et al., 2018; Tan et al., 2019). Diante desse cenário, o *screening* de produtos cicatrizantes advindos de fontes naturais ainda continua sendo uma excelente oportunidade para viabilizar novas alternativas de tratamento na área dermocosmética.

5. Tratamentos com Produtos Naturais

Cerca de 73% dos produtos farmacêuticos atuais utilizados na terapêutica apresentam ingredientes derivados de produtos naturais enquanto 27% dos medicamentos são de origem puramente sintética (Rodrigues et al., 2016; Wangchuk, 2018). Neste contexto, como o Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo, estimular o conhecimento de seus potenciais produtos bioativos pode resultar em diversas consequências benéficas para a população tanto pelo aspecto da saúde, quanto pelo desenvolvimento econômico além do estímulo à preservação das espécies nativas, ao viabilizar sua utilização sustentável (Nobre et al., 2016; Leal et al., 2018; Furlong et al., 2020).

Em nosso país, estudos sobre extratos vegetais demonstram a riqueza de compostos bioativos, como polifenóis entre outras substâncias aromáticas além de vitaminas e proteínas, encontrados em diferentes partes das plantas (Almeida et al., 2008; Pereira et al., 2017; Pereira et al., 2018; Athaydes et al., 2019; Santos et al., 2019). Nas últimas décadas, tem sido crescente o número de estudos por espécies de plantas repletas de antioxidantes para investigação de efeitos pró-cicatrizantes (Kurt et al., 2018; Guidoni et al., 2019), conforme demonstrado na figura 2.

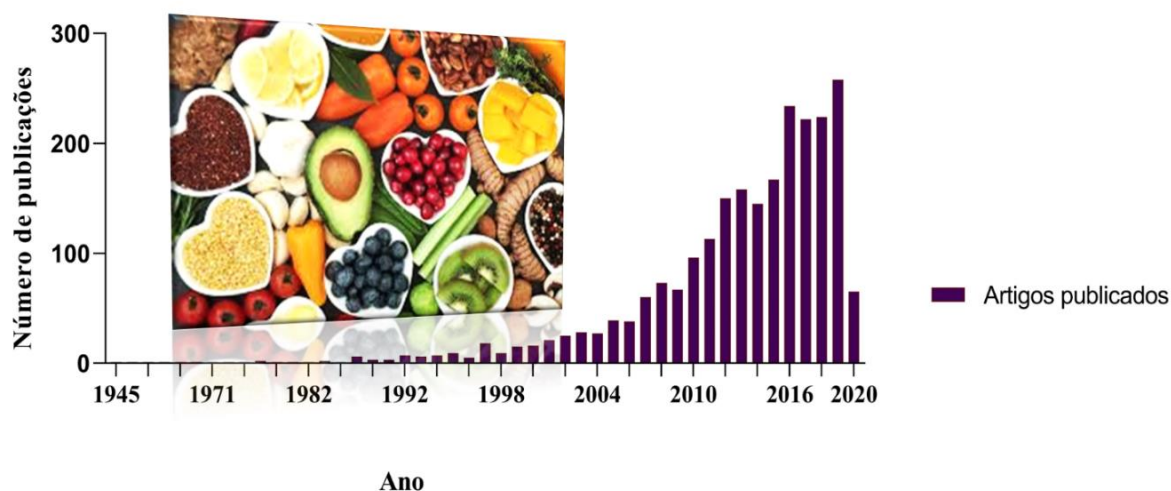


Figura 2: Publicações sobre o uso de extratos vegetais e antioxidantes para tratamento de cicatrização de feridas desde 1945 até 28 de junho de 2020. Fonte: PubMed.

Diversos autores demonstram que os compostos fenólicos podem auxiliar nas atividades anti-inflamatória (Bahense et al., 2017; Marques et al., 2017; Athaydes et al., 2019; Sperotto et al., 2018), antioxidante (Coutinho et al., 2017; Pereira et al., 2018; Rhimi et al., 2019; Doan; Le, 2020), antibacteriana (Machado et al., 2018; Güzel et al., 2019; Marquardt et al., 2020), “pró-colágeno” (Gunes et al., 2017; Kurt et al., 2018; Li et al., 2019) e redutora de fatores pró-oxidantes (Lima et al., 1996; Lopes et al., 2005; Coutinho et al., 2017; Ibrahim et al., 2018). Como exemplo, podemos citar a *Struthanthus vulgaris* (popularmente conhecida como ‘erva de passarinho’) que tem a capacidade de evitar a super expressão da resposta inflamatória e acelerar a cicatrização (Gramma et al., 2016; Marques et al., 2017). Interessantemente, outras espécies contendo uma variedade de óleos vegetais (*Helianthus annuus*, *Olea europaea*, *Rosa af. rubiginosa*, *Linum usitatissimum*, *Ribesnigrum*, óleo de noz de *Macadamia ternifolia*) também podem auxiliar na deposição e organização das fibras de colágeno no local da ferida melhorando a qualidade do tecido cicatricial também via efeito ‘anti-ROS’ (Orue et al., 2017; Givol et al., 2019; Guidoni et al., 2019), corroborando essa observação.

A explicação bioquímica para que essas substâncias bioativas possuam um bom efeito cicatrizante deve-se, em grande parte, aos grupos fenólicos com substituintes hidroxílicos originados do metabolismo secundário das plantas, com várias funções metabólicas vegetais (crescimento, reprodução, defesa contra

patógenos, pigmentação) (Naczki; Shahidi, 2004; Tatsis; O'Connor, 2016; Machado et al., 2018; Yuan et al., 2019). Estima-se que essas substâncias possam ser classificadas em cerca de 5.000 fenóis diferentes (destacando-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis) (Angelo; Jorge, 2007; Shahid; Ambigaipalan, 2015; Pinheiro et al., 2008).

A ação dos antioxidantes é classificada em primária e secundária. Antioxidantes com ação primária interrompe a cadeia da reação através da doação de hidrogênio ou elétrons aos radicais livres, os tornando termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo molécula-antioxidante que pode interagir com outro radical livre (Adegoke et al., 1998; Rio et al., 2013; Ștefănescu et al., 2019). A habilidade dessas moléculas ricas em ligações duplas é que as mesmas podem participar da estabilidade do radical por deslocamento do elétron desemparelhado. O mecanismo secundário dos antioxidantes, retardar a etapa de iniciação da autoxidação através de mecanismos como a complexação de metais, decomposição de hidroperóxidos e sequestro de oxigênio para formar espécie não radicalar ou ativação do oxigênio singlete (Shahidi et al., 1992; Angelo; Jorge, 2007; Gouveia; Lima, 2017). Quando realizadas aplicações tópicas, podem promover efeitos diversos como promover a homeostase da barreira cutânea, atividade antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatórias promovendo a cicatrização de feridas (Saric; Raja, 2016; Lin et al., 2017; Dev et al., 2019). Independente do mecanismo envolvido, sabe-se que a diminuição da oferta de ROS pode estar relacionado ao melhor controle da resposta de cicatrização, desde o controle do processo inflamatório até a formação do tecido de granulação, auxiliando também no aumento da contração da lesão e deposição de colágeno (Marques et al., 2017; Guidoni et al., 2019; Rhimi et al., 2019; Csepregi et al., 2020). Diante do exposto, justifica-se a escolha da *Virola oleifera* para investigação neste estudo, cuja espécie será apresentada no item a seguir.

6. *Virola oleifera* (Schott)

Virola oleifera (Schott) A. C. Smith popularmente conhecida como 'bocuva', 'bicuíba', 'bicuiva', 'candeia-do-caboclo' ou 'ucuúba', cuja palavra é denominada da língua tupi ("uku" = sebo, graxa, gordura e "uba" = planta, árvore), significa árvore que produz substância gordurosa. A VO é pertencente à família Myristicaceae que

apresenta cerca de 20 gêneros e 500 espécies. Endêmica no Brasil, com distribuição no bioma da Mata Atlântica com 5 gêneros e 64 espécies, dessas 59 são encontradas na Amazônia, sendo a espécie *Virola oleifera* presente na região de Afonso Cláudio localizado no estado do Espírito Santo (ES-Brasil). (Rodrigues, 1980; Quintanilha e Lobão, 2017; Pereira et al., 2017; Aguilár et al., 2019). Essa espécie cresce especialmente nas encostas, são seletivas higrófitas e perenifólias, composta por copas largas, folhagens simples e esparsas variando entre 12 a 24 cm de comprimento e até 5,5 cm de largura e produz frutos de semente vermelha. Quando adulta pode atingir cerca de 35 metros de altura e o caule até 105 cm de diâmetro, interiormente, a casca contém exsudado avermelhado (Rodrigues, 1980; Reitz; Klein, 1968; Bôa et al., 2015; Coutinho et al., 2017).



Figura 3: Fotografia representado as características da árvore *Virola oleifera* . Foto da própria autora.

A VO é conhecida por seu potencial medicinal a partir da extração da resina conhecida culturalmente como “sangue-de-bicuiba”, usada para tratamento de artrite, asma, anti-inflamatório, para estancar hemorragias e cicatrização de feridas, entretanto, até o momento, os estudos com o potencial cicatrizante ainda não foram

investigados. (Rodrigues, 1980; CNCFLORA, 2012; Pereira et al., 2017; Coutinho et al., 2017).

Alguns trabalhos já realizados vêm a comprovar as diferentes atividades da VO, perfil fitoquímico e farmacológico. A análise fitoquímica realizado por Pereira et al., (2017) demonstrou que a VO apresenta uma mistura de vários compostos fenólicos e flavonoides com alto potencial antioxidante e gastroprotetora. No trabalho de Coutinho et al. (2017) o uso de VO apresentou potencial antioxidante e ateroprotetor. Além de propriedades nefroprotetora acompanhados por atividade antioxidante e antiapoptótica da VO demonstrado por Bôa et a., (2015), trabalhos realizados em nosso laboratório e em parceria com outros da Universidade Vila Velha (UVV), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e Instituto Federal do Espírito Santo (IFES).

7. JUSTIFICATIVA

Ainda que diversas estratégias inovadoras com potencial cicatrizante estejam em desenvolvimento na área dermocosmética, muitas delas tornam-se inviáveis para seu uso difundido na população. Portanto, a investigação de tratamentos alternativos provenientes de fontes de bioativos naturais brasileiros continua sendo extremamente oportuna. Neste contexto, diante dos conhecidos efeitos deletérios do estresse oxidativo sobre a cicatrização e sabendo-se do potencial antioxidante da VO, essa pesquisa translacional desenvolvida com um produto de baixo custo apresenta importante relevância para o avanço na pesquisa na área dermocosmética.

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial cicatrizante da *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith em lesões cutâneas em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*).

8.2 Objetivo Específico

- Desenvolver uma formulação de uso tópico do extrato de *Virola oleifera* capaz de ser aplicável nos animais experimentais (ratos);
- Verificar se a *Virola oleifera* apresenta efeito cicatrizante através da quantificação e avaliação macroscópica (contração tecidual) e microscópica, por meio da indução de ferida em ratos;
- Analisar se a *Virola oleifera* melhora a qualidade da cicatrização das feridas (sangramento, bordas e crosta) ao longo do processo cicatricial por um método de pontuação;
- Determinar se a *Virola oleifera* modifica o padrão de oxidação de lipídios e proteínas dos tecidos submetidos a lesão cutânea;
- Investigar em paralelo, seguindo os critérios bioéticos, se a *Virola oleifera* tópica desenvolve algum efeito tóxico nos grupos experimentais estudados, tanto através de biomarcadores plasmáticos quanto teciduais.

9. MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Coleta da resina de *Virola oleifera* (Schott)

A coleta da resina de *Virola oleifera* A. C. Smith (Myristicaceae) já é bem estabelecida em nosso grupo de pesquisa (Bôa et al., 2015; Coutinho et al., 2017; Pereira et al., 2017). Desde de 2013 o procedimento de coleta tem sido realizado em Afonso Cláudio localizado no estado do Espírito Santo (Brasil - S20° 13490' W 041° 06692'), dotada de autorização (IEMA 629/09) e está de acordo com a legislação brasileira (Resolução 29, 06/12/2007), discriminando que em casos de extração de material vegetal ou quando o material testado é praticamente idêntico à da matéria-prima (Declaração Provisória 2.186-16, 23/08/2001) não é necessário permissão especial para o procedimento. Dessa forma, o atual estudo está adequado à lei. Para o método de obtenção da VO, convém salientar que esta espécie possui exsicata de número VIES 19648, no Herbário da Universidade Federal do Espírito Santo.

Por meio de incisões com cerca de 0,5 cm de profundidade no tronco da árvore é possível obter o exsudado com o auxílio de um anteparo de bambu que recebe a resina líquida e projeta para um frasco de vidro cor âmbar. Após a coleta a VO é mantida a 4°C até a análise, e então, a resina líquida é seca em estufa a 40°C por 72 horas. Por fim, pulverizado o que chamamos de “resina seca” que é o objetivo do nosso estudo (Bôa et al., 2015; Coutinho et al., 2017).

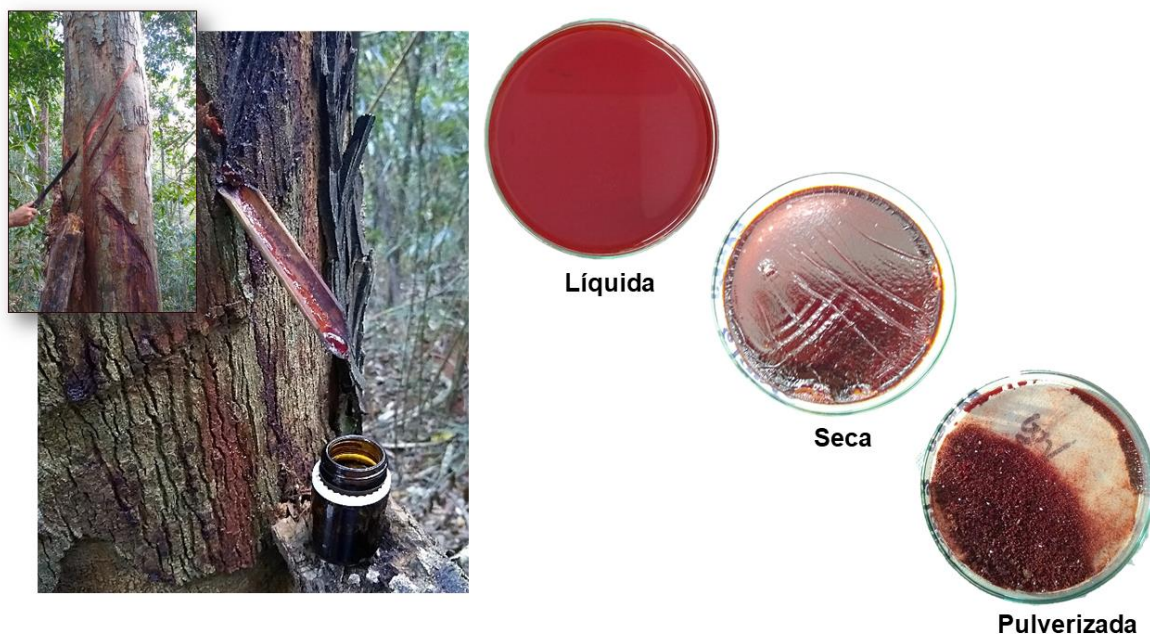


Figura 4: Foto representativa da extração da resina *Virola oleifera* até sua forma pulverizada. Foto da própria autora.

9.2 Composição dos cremes utilizados nos grupos experimentais

Na primeira formulação, a VO 5% foi adicionada em Compritol ATO 888 (Behenato de glicerilo, Tribehenin) e vaselina líquida (p/v), denominado de creme VO. Já a segunda formulação trata-se do creme denominado “VO+Veg” cuja resina foi incorporada com uma mistura de óleos vegetais com efeito cicatrizante já comprovado contendo óleo de girassol (*Helianthus annuus*) 30%, azeite (*Olea europaea*) 20%, óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*) 15%, óleo de macadâmia (óleo de noz de Macadâmia *ternifolia*) 15%, óleo de rosa mosqueta (*Rosa af. Rubiginosa*) 10%, óleo de groselha preta (*Ribesnigrum*) 10%, conforme prévia descrição nos estudos de Guidoni et al., 2019. O creme do grupo CV (controle veículo) contém 12% de Compritol ATO 888 (Behenato de glicerilo, Tribehenin) e vaselina líquida. Em uma farmácia local adquirimos o Dersani®, utilizado como tratamento convencional no grupo CP (controle positivo), composto por: vitamina A, vitamina E, ácido cáprico, ácido caprílico, ácido capróico, ácido linoleico, lecitina de soja e óleo de girassol.



Figura 5: Cremes utilizados para o tratamento dos grupos experimentais. Foto da própria autora.

9.3 Animais

Todo o experimento com uso de animais foi realizado de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado Animal (DBCA) e aprovado pelo Comitê de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal da Universidade Vila Velha (UVV) - Protocolo CEUA-UVV 527/2019 (Anexo A). Neste projeto foram utilizados 60 ratos machos adultos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*), pesando entre 350-420 g, com idades entre 11 e 13 semanas obtidos pelo Biotério da UVV. Os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas, a fim de evitar lesões por contato com outros animais, com acesso a comida e água *ad libitum* e condições padrão de temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) com ciclos de 12 horas claro/escuro.

9.4 Procedimento cirúrgico para indução das feridas

De acordo com os critérios bioéticos, o modelo experimental de lesão cutânea foi realizado com o animal anestesiado. Para tanto, foi administrado solução anestésica de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Após atingir o efeito anestésico desejado, realizou-se a tricotomia dos animais e a assepsia com álcool etílico 70%. Em seguida, os ratos foram posicionados em

decúbito lateral direito em mesa apropriada e com o auxílio de um punch dermatológico de 15 mm e realizado quatro excisões atingindo a região dermo-epidérmica (Figura 4), realizado pelo mesmo investigador para garantir uma padronização das lesões. Imediatamente após a indução das lesões cutâneas foi disponibilizado para todos os animais o analgésico dipirona (100mg/kg, na água) para alívio de dor durante três dias. Em paralelo, o tratamento tópico com os cremes respectivos foi iniciado, permanecendo até o décimo dia.



Figura 6: Tricotomia e indução das lesões cutâneas. Foto da própria autora.

9.5 Padronização dos grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos com cinco animais cada grupo, de acordo com o período de tratamento 0, 4 e 10 dias. Divididos na seguinte forma de tratamento:

CV (Controle veículo) - no qual os animais receberam diariamente vaselina com uso tópico;

CP (Controle positivo) – no qual os animais receberem diariamente Dersani® com uso tópico;

VO (*Virola oleifera*) - no qual os animais receberam diariamente virola 5% com uso tópico;

VO+Veg (*Virola oleifera* com VegeDerme) – no qual os animais receberam diariamente virola 5% e vegeDerme com uso tópico. O VegeDerme é uma formulação desenvolvida em estudos anteriores por farmacêuticos do nosso próprio programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (Guidoni et al., 2019). Essa preparação tem sido atualmente utilizada para promover efeito cicatrizante, justificada pela sua conhecida ação antiinflamatória e economicamente viável para cicatrização de feridas. Atualmente, tem sido utilizada em farmácias de manipulação como veículo para a incorporação de outras substâncias ativas.

Todos os animais foram submetidos aos respectivos tratamentos imediatamente após a lesão. Entretanto, como havia uma certa variabilidade do perfil das bordas após o uso do *punch*, os três primeiros dias foram considerados apenas para estabilização da formação das bordas, facilitando assim a quantificação das lesões do dia padrão. Dessa forma, a avaliação se iniciou no quarto dia, sendo considerado em todo o estudo o dia “zero” da avaliação e subsequentemente, os dias 4 e 10 de avaliação.

9.6 Coleta de material biológico e histológico

Após o respectivo dia de tratamento 0, 4 e 10 dias, os animais foram eutanasiados com tiopental de sódio (100 mg/kg, i.p.). O sangue venoso foi coletado do ventrículo direito de cada animal e submetidas a centrifugação a 4.000g por 10 minutos e o plasma foi separado e armazenado a -80 °C até a análise bioquímicas. As concentrações séricas de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), ureia, nitrogênio ureico e creatinina sérica foram obtidas por um analisador bioquímico automático (AU 680, Olympus/Beckman Coulter, Munique, Alemanha) em parceria com o Tommasi laboratório de análises clínicas.

Duas biópsias da região cicatricial de cada animal foram colocadas em formaldeído tamponado (3,7%) por 24h. Utilizou-se 1mg de tecido referente área de lesão armazenado em 1ml de solução de tampão fosfato-salino (PBS), para análise macroscópicas e histológicas.

Outra lesão foi utilizada para avaliar o estresse oxidativo de macromoléculas, no qual o tecido foi pesado 1mg e armazenado em 1ml de solução de tampão fosfato-salino (PBS) que posteriormente foi homogeneizado no FastPrep-24 em 2 ciclos de 20 segundos, logo após as amostras foram centrifugadas a 4.000g por 10

minutos a -4°C (Centrifuga refrigerada Eppendorf 5804) o sobrenadante foi coletado e mantidos em -80°C até análise do estresse oxidativo (AOPP e TBARS).



Figura 7: FastPrep-24 utilizado para homogeneizar as amostras. Fonte: MPbio.

9.7 Fotografia e análise das imagens e índice de cicatrização

Os animais acordados, foram fotografados diariamente utilizando uma câmera do *smartphone* Samsung Galaxy S4 (13 megapixels com resolução 4128 x 3096 pixels) fixado em um suporte para celular com uma distância de cinquenta centímetros e perpendicular as feridas. Os animais foram imobilizados em decúbito lateral direito e esquerdo para facilitar o registro das fotos e análises. Para padronizar a unidade de área das lesões em mm² e ser uma medida conhecida na calibração do *software* ao calcular a área da ferida, uma régua foi disposta na bancada ao lado do animal.

Ao final da realização dos experimentos, todas fotografias foram transferidas para um computador e analisadas através do *software ImageJ* (*Image-J* 1.35 d, USA, de domínio público) para analisar os parâmetros de área da ferida (mm²) e calcular do índice de cicatrização das feridas com o programa Microsoft Excel 2019. A porcentagem de contração da ferida foi medida usando a seguinte fórmula (Caetano et al.,2009; Jamadagni et al., 2016).

$$\% \text{ contração tecidual} = \frac{\text{Área da ferida inicial} - \text{Área da ferida atual}}{\text{Área da ferida inicial}} \times 100$$

A área inicial se refere ao dia da confecção da ferida e a área atual representa o dia da eutanásia 0, 4 e 10 dias de tratamento.

A porcentagem de contração por grupo de tratamento foi analisada com base no cálculo da área sob a curva (AUC). Para a determinação da AUC de cada grupo, foram utilizados os dados de cada resposta cicatricial ao longo dos dias, os quais foram plotados utilizando o *software* Prisma (Prism 6.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados obtidos foram expressos em unidades arbitrárias.

9.8 Método de pontuação para sangramento, evolução da borda e crosta da ferida

O método de pontuação para o sangramento, evolução da borda da ferida e formação de crosta foi realizado de acordo com o trabalho de Jamadagni et al., 2016, que classifica de 1 (ruim) até 5 pontos (muito bom). Os critérios estão determinados conforme tabela abaixo:

Tabela 1: Esquema de Pontuação para sangramento, borda e crosta da ferida

Subdivisão	Crítérios
Sangramento	<ol style="list-style-type: none">1 - Sangramento no leito da ferida que não cessa;2 - Ocorreu hemostasia local e há coágulos visíveis no leito da ferida;3 - Há presença de sangue fresco ou pus ao esfregar ou removê-lo;4 - O leito da ferida está seco, sem infecções e sangue seco na borda da ferida;5 - Não há presença de sangue ou inflamação.
Evolução da ferida	<ol style="list-style-type: none">1 – Presença de edema na borda;2 – Umidade na borda, sangramento e/ou presença de pus e uma escassa formação de crosta;3 – Proliferação do tecido de granulação e formação de crosta;4 – Bordas e crostas irregulares no leito da ferida e ausência de edema;5 – Bordas sem anormalidades.

Formação da crosta

- 1 – Início na formação de crosta primária;
 - 2 – Apresenta uma fina camada de tecido morto, sangue e/ou pus e escassa formação de crosta;
 - 3 – A crosta formada tem dobras, mas é melhor que a comparação anterior;
 - 4 – A crosta é dura e prestes a cair;
 - 5 – Formação de uma crosta secundária.
-

9.9 Histologia

Posteriormente a eutanásia, uma biópsia de pele referente a área de cicatrização foi removida cirurgicamente de cada animal por grupo experimental e tempo de tratamento 0, 4 e 10 dias. As amostras foram fixadas em formaldeído tamponado com fosfato (3,7%) e passaram pelo processamento histológico de desidratação com álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Para os cortes histológicos, foi utilizado um micrótomo rotativo com cortes de cinco micrômetros de espessura colocado em lâminas de vidro e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para avaliação histológica e foram fotografadas usando o software de captura de imagem (Honestec VHS to DVD 3.0 SE) a 100 × utilizando uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico (Leica/501095). Cerca de 10 campos distintos foram avaliados das camadas da pele e uma região de interesse foi selecionada de cada grupo e tempo de tratamento para análise típica (Guidoni et al., 2019).

9.10 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio espectrofotométrico do TBARS baseia-se na reação entre o malondialdeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico (TBA), um marcador de peroxidação lipídica. Foram utilizados, 50 µL de homogenato de tecido (1:10) misturados em 200 µL de 1% de TBA. Após a diluição os tubos foram dispostos no bloco do termo shaker (Kasvi – K80-220) e condicionados por 1 hora a 95° C e após esse tempo resfriados a ~ 22 ° C. Em seguida 80µL foram adicionados em microplaca de 96 poços e a leitura foi realizada a 532 nm usando um espectrofotômetro (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Este parâmetro foi quantificado como

nmol de MDA/mg de proteína, usando o método de Bradford (Ohkawa et al., 1979; Coutinho et al 2017).

9.11 Produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP)

Seguido o método descrito por Witko-Sarsat et al. (1996) e Coutinho et al. (2017) da análise da AOPP usando espectrofotometria com um leitor de microplacas (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Foram utilizados 40µL de homogenato de pele (diluído às 1:30), foi diluído 1:5 em PBS, adicionados 10 µL de 1,16 mol/L KI e 160µL de ácido cítrico em microplaca de 96 poços. A leitura foi realizada a 340 nm usando um espectrofotômetro (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Este parâmetro foi quantificado como µmol/mg de proteína, usando o método de Bradford.

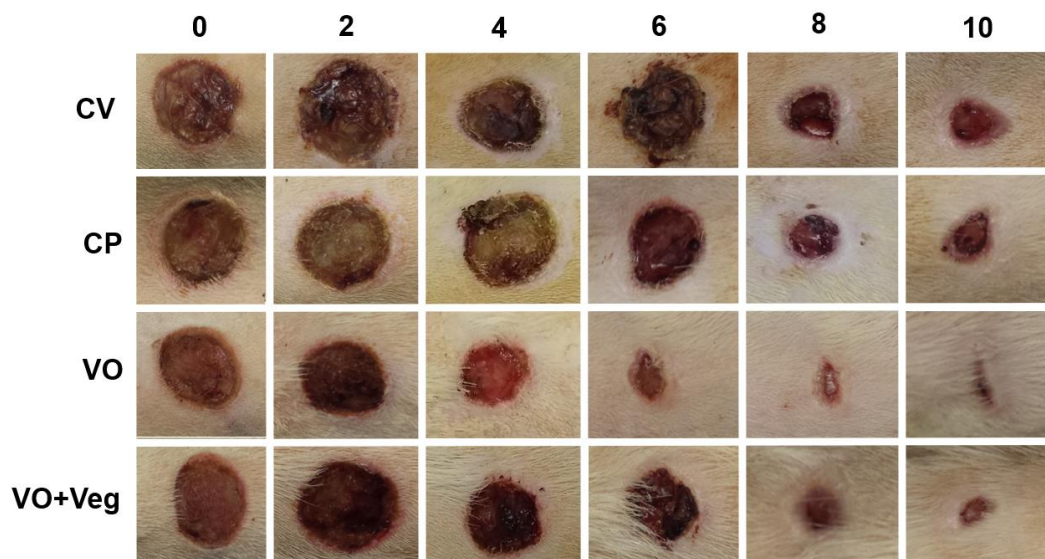
9.12 Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média ± EPM (erro padrão da média). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey, usando o software Prisma (Prism 6.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). As variáveis categóricas estão apresentadas como frequências e foram comparadas usando o teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

10. RESULTADOS

10.1 Contração da ferida

A figura 6A apresenta imagens típicas das feridas dos grupos experimentais, demonstrando notoriamente o impacto da resposta cicatricial da VO em comparação aos demais grupos sem VO. A análise quantitativa (Figura 6B) evidencia redução significativa na área da ferida do grupo VO (76%) a partir do terceiro dia de tratamento (CV: 88% e CP: 94%, $p < 0,05$) e estendendo-se até o final do tratamento ($p < 0,05$). Diferentemente dos outros grupos, a contração tecidual no grupo VO foi observada no último dia de tratamento (décimo). Vale ressaltar, que a partir do oitavo dia de tratamento a porcentagem de contração da ferida no grupo VO foi significativamente maior (~50%, $p < 0,05$) em comparação os demais tratamentos. Através da avaliação da AUC (Figura 6C), o tratamento com VO representou maior eficiência da cicatrização (contração tecidual) quando comparado aos grupos CV e CP (27% e 23% respectivamente, $p < 0,05$).



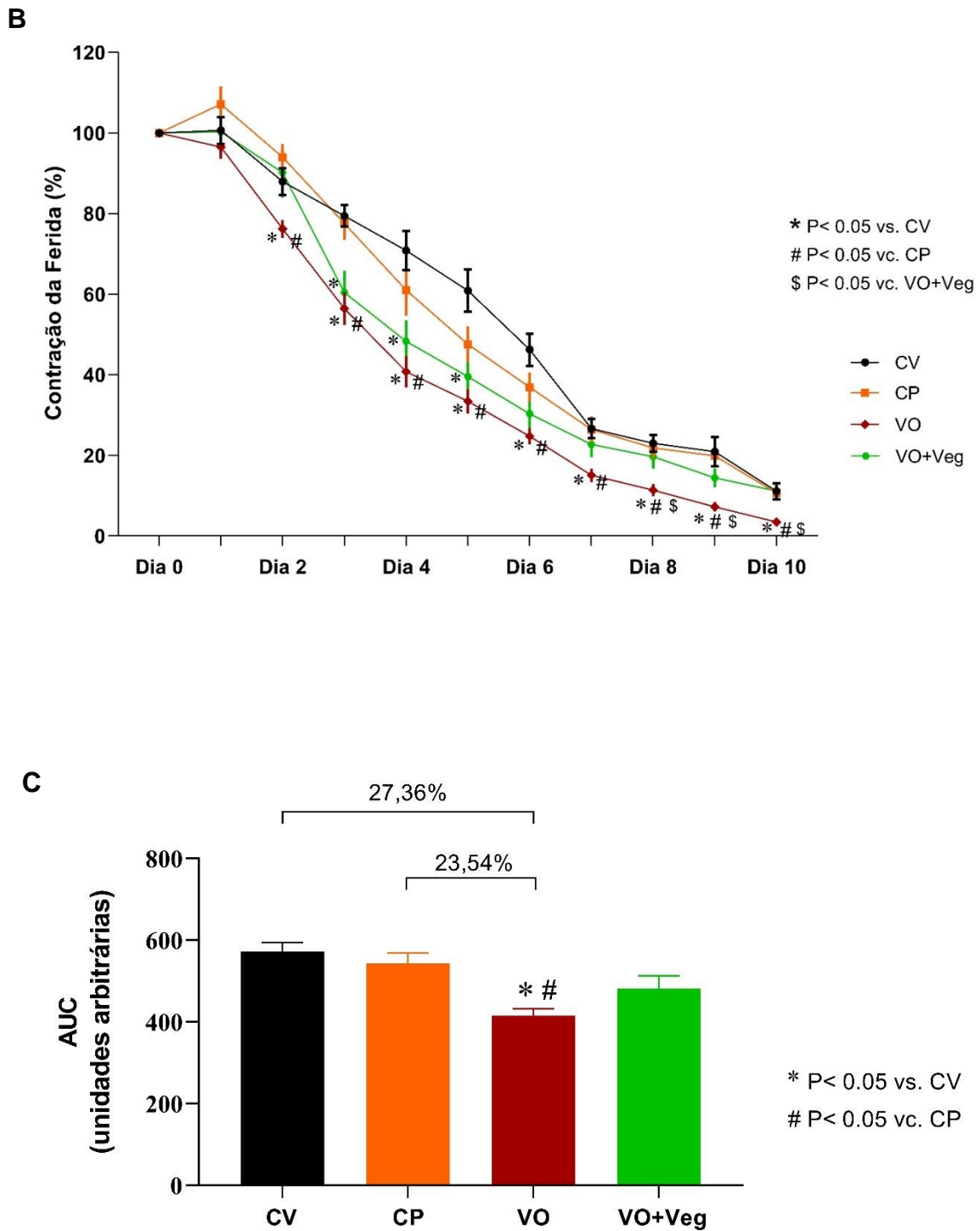


Figura 8 – (A) Fotografia representativa da ferida por grupo e tempo avaliação de tratamento. (B) Análise quantitativa da contração da ferida após o uso tópico diário de vaselina (CV), Dersani® (CP), *Virola oleifera* (VO) e *Virola* com vegeoderme (VO+Veg) por 10 dias. (C) Área sob a curva dos grupos experimentais representando a contração da ferida entre os grupos. Os dados são expressos como média \pm EPM; *p<0,05: VO vs CV; #p <0,05: : VO vs CP e \$p <0,05 :VO vs VO+Veg.

10.2 Método de pontuação para o sangramento

A Figura 9 do lado esquerdo apresenta imagens típicas dos padrões de sangramento de cada grupo estudado enquanto do lado direito demonstra-se os valores mínimos, máximos e mais frequentes (moda) quanto ao escore de sangramento. É possível observar que nos dias 0 e 4, qualquer tratamento (CP, VO ou VO+ Veg) foi capaz de diminuir o nível de sangramento no leito da ferida comparado ao grupo CV ($p < 0,05$). Entretanto, convém destacar que no dia 4 a VO apresenta melhor perfil no controle de sangramento comparado ao grupo CP ($p < 0,05$). Por fim, na fase resolutive da ferida, os animais não apresentaram diferença no padrão de sangramento ($p > 0,05$). Destaca-se que em nenhuma das fases o grupo submetido ao tratamento convencional (CP) apresentou superioridade aos outros grupos.

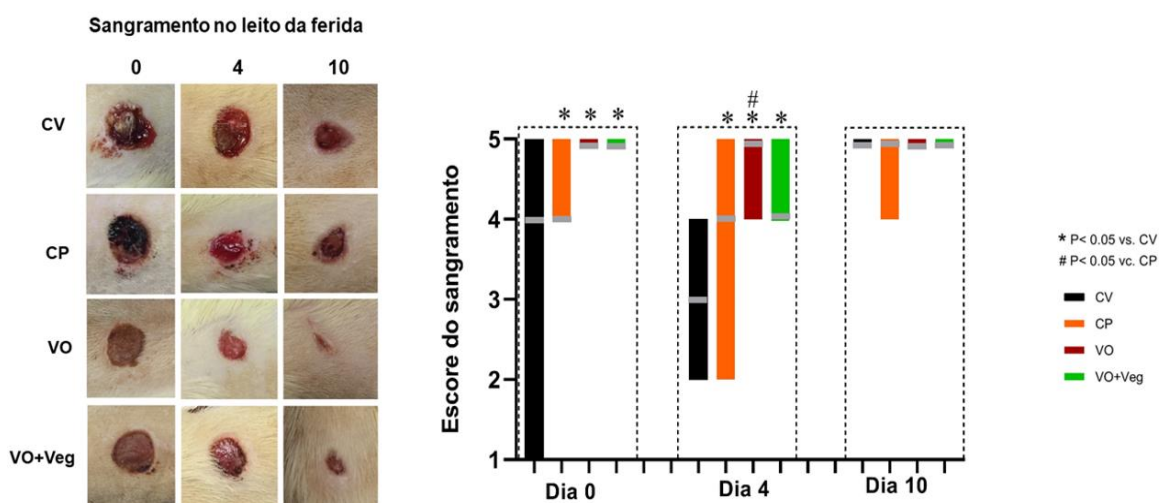


Figura 9: À esquerda, fotografia representativa do sangramento no leito da ferida por grupo e tempo de avaliação do tratamento. À direita, gráfico representado o esquema de pontuação para o sangramento no leito da ferida durante o tratamento CV, CP, VO e VO+Veg. As barras representam a dispersão dos dados (mínimo e máximo). As linhas das horizontais representam a moda.

10.3 Método de pontuação para evolução da borda da ferida

A Figura 10 (à esquerda) ilustra a evolução das bordas das feridas dos respectivos grupos enquanto o lado oposto demonstra os valores mínimos, máximos e mais frequentes (moda) quanto ao escore de borda de ferida. No início do tratamento, os animais do grupo CV e CP apresentaram edema e umidade na borda

da ferida, diferentemente dos grupos VO e VO + Veg que já iniciaram apresentando bordas sem anormalidades comparados aos grupos previamente citados ($p < 0,05$). No quarto dia de tratamento, observou-se a manutenção das bordas sem anormalidades apenas no grupo VO, sendo superior aos outros três regimes de tratamento ($p < 0,05$). No décimo dia de tratamento, o grupo VO continua apresentando boa evolução, mantendo a diferença entre os grupos CV e VO+Veg ($p < 0,05$). Também se destaca a superioridade do grupo VO+Veg em comparação ao grupo CV ($p < 0,05$). Da mesma forma que foi observado no padrão de sangramento, mais uma vez o grupo submetido ao tratamento convencional com ácidos graxos essenciais não apresentou superioridade na resposta cicatricial ($p > 0,05$).

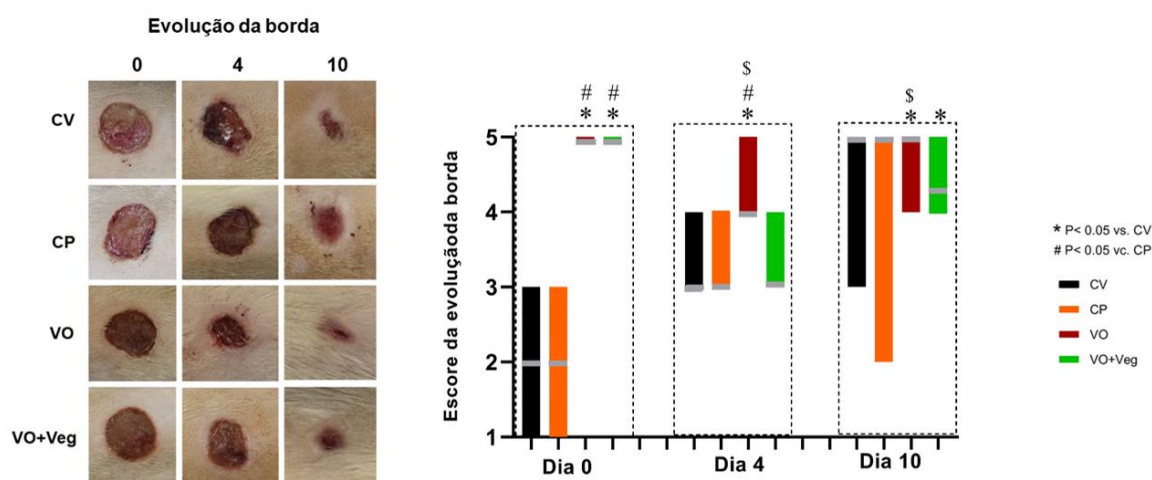


Figura 10: À esquerda, fotografia representativa da borda por grupo e tempo de avaliação do tratamento. À direita, representação gráfica de pontuação para a evolução da borda durante o tratamento nos grupos experimentais. As barras representam a dispersão dos dados (mínimo e máximo). As linhas das horizontais representam a moda.

10.4 Método de pontuação da evolução da crosta

A evolução da crosta pode ser facilmente observada pelas imagens típicas representadas na Figura 11 (esquerda) acompanhadas das avaliações através dos valores mínimos, máximos e mais frequentes (moda) quanto ao escore evolução da crosta. Nesse quesito, o tratamento com VO foi superior desde o início do tratamento, apresentando satisfatória formação de crosta quando comparado aos demais grupos estudados ($p < 0,05$). No dia 4, a VO ainda apresenta superioridade

aos grupos CV e CP ($p < 0,05$). Em paralelo, o grupo VO+Veg também apresenta boa formação de crosta secundária em relação aos grupos CV e CP ($p < 0,05$). Entretanto, no décimo dia de tratamento, apenas o grupo VO continua apresentando bom desfecho para a formação de crosta secundária sendo superior aos grupos CV e VO+Veg ($p < 0,05$). Assim como os outros critérios analisados, mais uma vez o grupo CP não apresentou superioridade na resposta cicatricial ($p > 0,05$).

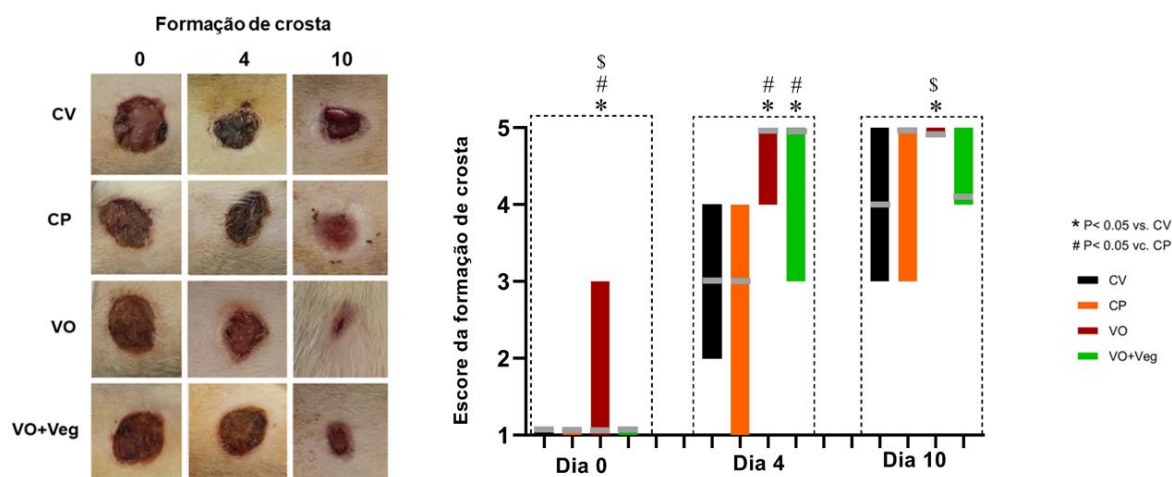


Figura 11: À esquerda, fotografia representativa da crosta por grupo e tempo de avaliação do tratamento. À direita, representação gráfica de pontuação para a evolução da crosta durante o tratamento. As barras representam a dispersão dos dados (mínimo e máximo). As linhas das horizontais representam a moda.

10.5 Histologia

A figura 12 representa as análises histológicas típicas de cada grupo e tempo de tratamento. No dia 0 de avaliação do tratamento, o grupo VO apresentou menor quantidade de tecido de granulação quando comparado aos demais tratamentos, provavelmente devido ao processo de aceleração de cicatrização dos dias anteriores à avaliação. Diante das respostas tardias de cicatrização dos demais grupos, é notória a excessiva quantidade de tecido de granulação nas respectivas bordas superiores.

Após quatro dias de avaliação do tratamento, o grupo CV e CP demonstram a presença de infiltrado inflamatório perivascular na derme superior (representados pelos círculos pontilhados e indicados pelas setas vermelhas). Além disso, foi

possível observar um maior grau de desorganização da disposição das fibras de colágeno dos grupo CV e CP comparado aos grupos tratados com VO. Ao final do tratamento (décimo dia de avaliação), os grupos controle (CP e CV) demonstraram menor reepitelização e queratinização acompanhado de desarranjo do colágeno na região da derme, quando comparado ao VO.

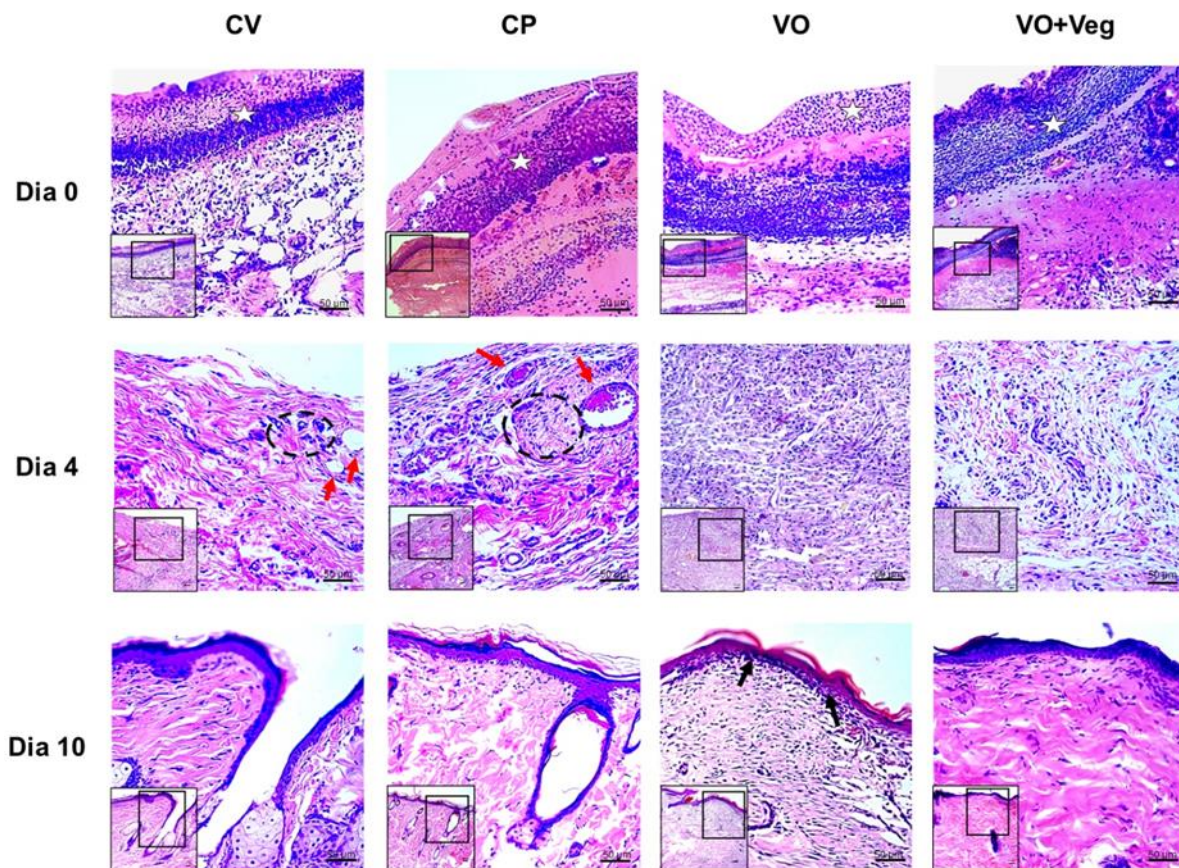


Figura 12: Fotografias microscópicas histológicas representativa do processo cicatrização de feridas dos grupos experimentais CV, CP, VO e VO+Veg. As seções da pele demonstram derme e epiderme coradas com hematoxilina e eosina com aumento de 10x (menor figura) e 20x (maior figura). As estrelas indicam a região do tecido de granulação. Já as setas vermelhas indicam infiltrado inflamatório perivascular na derme superior, com a demarcação em preto de regiões ricas em células inflamatórias. No dia 10, salienta-se a camada da epiderme (borda superior) com apresentação do estrato córneo rica em queratina principalmente no grupo, indicada pelas setas em preto.

10.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido

As medidas de TBARS foram medidas dia 0 e dia 10 após o tempo de avaliação de tratamento de cada animal, com o intuito de se obter a diferença (delta) de TBARS entre o último e o primeiro dia de tratamento. Como pode-se observar na Figura 13, tanto o tratamento convencional (CP: -124.3 ± 70 , $\mu\text{mol MDA/mg}$ de proteína, $p < 0,05$) quanto o tratamento com VO (-84 ± 22 $\mu\text{mol MDA/mg}$ de proteína, $p < 0,05$) foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica comparado ao grupo CV (443 ± 226 $\mu\text{mol MDA/mg}$ de proteína). Convém salientar que o grupo VO+Veg não apresentou diferença comparado ao grupo controle (VO+Veg: 162 ± 48 $\mu\text{mol MDA/mg}$ de proteína).

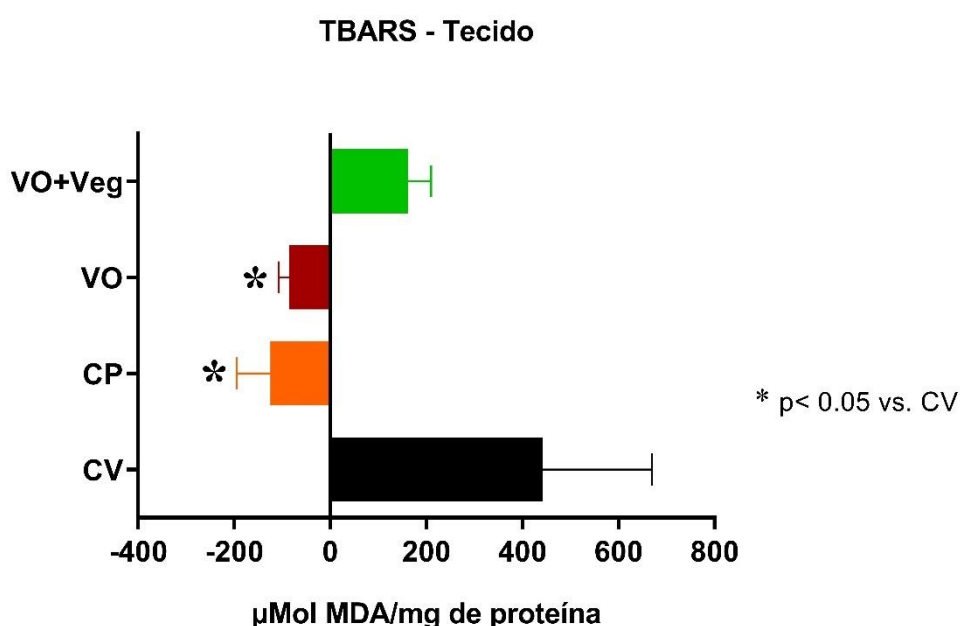


Figura 13: Alteração (delta) dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos grupos experimentais. Os dados são expressos como média \pm EPM * $p < 0,05$ do grupo Virola comparado ao controle veículo. ANOVA uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey.

10.7 Produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) no tecido

Da mesma forma que as medidas de TBARS, as concentrações teciduais de AOPP nos grupos experimentais foram medidas dia 0 e dia 10 após o tempo de avaliação de tratamento de cada animal, com o intuito de se obter a diferença (delta) de AOPP. Interessantemente, os resultados para oxidação proteica apresentaram comportamento similar ao observado na oxidação lipídica. Como pode-se observar na Figura 14, tanto o tratamento convencional (CP: -1970 ± 1160 , $\mu\text{mol/mg}$ de

proteína, $p < 0,05$) quanto o tratamento com VO ($-438 \pm 108 \mu\text{mol} / \text{mg}$ de proteína, $p < 0,05$) foram capazes de reduzir a oxidação proteica comparado ao grupo CV ($4267 \pm 1393 \mu\text{mol} / \text{mg}$ de proteína). Convém salientar que o grupo VO+Veg não apresentou diferença comparado ao grupo controle (VO+Veg: $1273 \pm 577 \mu\text{mol} / \text{mg}$ de proteína).

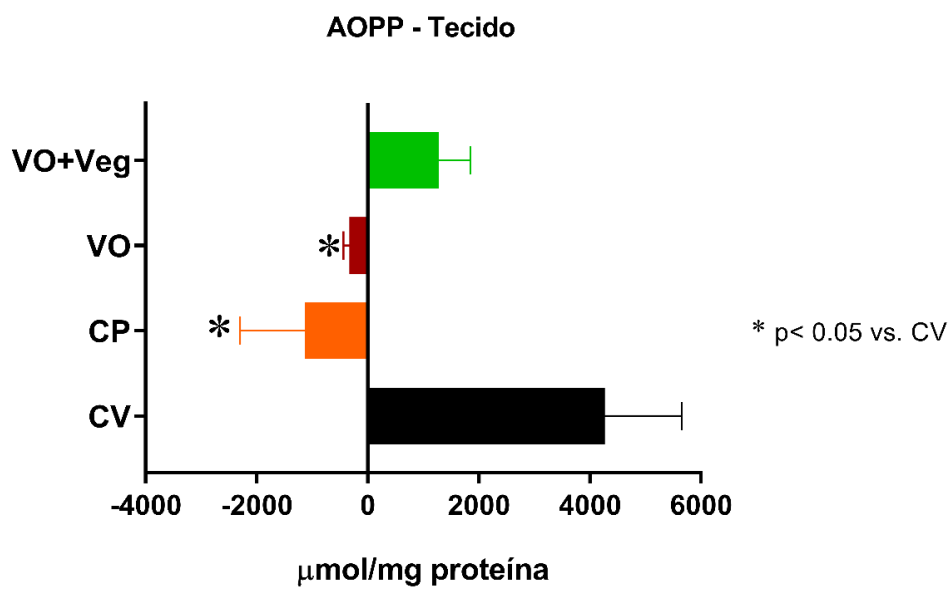


Figura 14: Alteração (delta) dos níveis de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) no tecido grupos experimentais. Os dados são expressos média \pm EPM * $p < 0,05$. ANOVA uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey.

10.8 Parâmetros Bioquímicos

A tabela 1 apresenta os resultados de análises bioquímicas dos grupos experimentais. Não observamos diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos ou no tempo de tratamento.

Tabela 2: Parâmetros séricos bioquímicos avaliados nos quatro grupos experimentais de tratamento de cicatrização

GRUPOS					
PARÂMETROS	Controle Veículo	Controle Positivo	Virola	Virola e VegeDerme	P
DIA 0					
ALT (U/L)	44,4 ± 5,7	39,4 ± 7,0	28,2 ± 3,3	41 ± 3,2	0.169
AST (U/L)	134 ± 21,7	97,2 ± 13,3	72,4 ± 12,6	96,5 ± 15,5	0.101
Ureia (mg/dL)	50,9 ± 3	46,22 ± 1	48,79 ± 2,2	40,23 ± 1,5	0.436
Nitrogênio Ureico (mg/dL)	23,8 ± 1,4	21,6 ± 0,5	22,8 ± 1	23,5 ± 0,7	0.552
Creatinina Sérica (mg/dL)	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,009	0,36 ± 0,008	0,34 ± 0,03	0.500
DIA 4					
ALT (U/L)	35,25 ± 2,3	32,75 ± 5,1	40,40 ± 4,6	55,60 ± 9,2	0.061
AST (U/L)	119,5 ± 8,8	95 ± 12,3	133 ± 14,4	160,6 ± 49,7	0.406
Ureia (mg/dL)	52,7 ± 3	41,1 ± 4,4	50,5 ± 8,8	49,6 ± 1,7	0.446
Nitrogênio Ureico (mg/dL)	24 ± 1,5	19,4 ± 2	23,6 ± 4,1	23,2 ± 0,8	0.541
Creatinina Sérica (mg/dL)	0,4 ± 0,01	0,25 ± 0,06	0,32 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0.424
DIA 10					
ALT (U/L)	75,2 ± 28,9	73,8 ± 14,6	38,8 ± 4,1	40 ± 5	0.251
AST (U/L)	217,4 ± 72,8	263,4 ± 105,2	120,4 ± 27,9	119 ± 33,9	0.363
Ureia (mg/dL)	41,9 ± 3,6	53,5 ± 3,6	41,9 ± 5,9	45,4 ± 2,7	0.207
Nitrogênio Ureico (mg/dL)	19,6 ± 1,6	25 ± 1,7	19,6 ± 2,7	21 ± 1,3	0.204
Creatinina Sérica (mg/dL)	0,35 ± 0,03	0,37 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,24 ± 0,06	0.422
TBARS (µmol MDA/mg de proteína)	51,39 ± 21,5	53,38 ± 18,3	60,49 ± 22,7	49,15 ± 16,8	0.845

Os dados são expressos média ± EPM. Os dados foram comparados por ANOVA uma via.

10.9 Peso corporal dos grupos experimentais

A tabela 2 apresenta os dados do peso corporal dos grupos experimentais antes e ao longo do tratamento. Em relação a este parâmetro ponderal, não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais ao longo dos dias 0, 4 e 10 de avaliação do tratamento.

Tabela 3 - Peso corporal dos animais

Tempo de tratamento	Peso corporal (g)				P
	Controle Veículo	Controle Positivo	Virola	Virola e Vege derme	
Antes da lesão	368 ± 37	359± 48	353± 7	336± 29	0.925
Dia 0	360 ± 33	334± 49	317± 27	337± 27	0.861
Dia 4	335 ± 26	342± 50	322± 23	345± 28	0.964
Dia 10	375 ± 31	347± 40	338± 19	353± 24	0.878

Os dados são expressos média ± EPM. Os dados foram comparados por ANOVA uma via.

11. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que demonstra os efeitos cicatrizantes *in vivo* através de um produto tópico, pioneiro desenvolvido por nossa equipe contendo a resina da *Virola oleifera*. Visando investigar possíveis alternativas terapêuticas inovadoras por meio desse extrato vegetal, o presente trabalho apresenta outro dado inédito interessante: através de diversos parâmetros analisados, mostramos que a nova formulação desenvolvida apresenta efeito cicatrizante superior ao tratamento convencionalmente utilizado na área clínica atualmente (clássica terapia com ácidos graxos essenciais). Através de nossas análises em ratos, observamos que os animais tratados topicamente com o creme de VO a 5% por 10 dias de avaliação apresentaram efeito cicatrizante (tanto macro e microscopicamente) acompanhado de atividade antioxidante, justificados pela redução dos níveis de peroxidação lipídica e oxidação proteica teciduais, sem impacto de toxicidade observado por marcadores bioquímicos hepáticos e renais convencionais.

A resina da *Virola oleifera* é dotada de uma mistura de compostos antioxidantes como polifenóis, flavonoides, ácido ferúlico e ácido gálico (Bôa et al., 2015; Pereira et al., 2017) que promove seus efeitos reparadores por vias antioxidantes. Convém destacar que no estudo de Pereira et al., 2017 foi possível validar essa importante atividade antioxidante da resina através de análise *in vitro* (FRAP, DPPH, ABTS) e sugerido pelo importante efeito gastroprotetor via ação

antioxidante da VO. Complementando esses resultados, estudos prévios de Bôa et al., 2015 também revelaram que a mesma resina foi capaz de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio e promover nefroproteção por vias antioxidantes teciduais. Dessa forma, diante dos efeitos cicatrizantes observados pelo nosso estudo, tornou-se indispensável a estratégia de constatar através de técnicas bioquímicas (TBARS e AOPP) se a mesma resina seria capaz de desempenhar ação cicatrizante também, pelo menos em parte, através de suas propriedades antioxidantes.

Além da via antioxidante previamente mencionada, convém destacar que, em 2018, durante o estágio pós-doutoral do orientador desse estudo, importantes efeitos pró-agregantes plaquetários foram observados pela VO por estimular a ativação da via GPIIb/IIIa (dados ainda não publicados). Dessa forma, sugerimos que a VO tópica possa desenvolver seus efeitos pró-reparadores por distintas vias, porém complementares.

Em nossa investigação, enfatizamos seu potencial antioxidante conforme demonstrado pelos nossos dados bioquímicos. Nosso trabalho corrobora outros estudos que utilizaram extrato vegetal com atividade antioxidante para tratamento de feridas *in vivo* (Gramma et al., 2016; Hormozi et al., 2019; Aquino et al., 2019). Apesar dos dados promissores, é importante considerar que como nossos resultados foram obtidos com a parte bruta (total) da resina, sugerimos que futuras investigações com diferentes extratos da VO (hexânico, clorofórmico, etanólico, aquoso) devam ser realizados visando a identificação de potenciais substâncias ativas de ação cicatrizante contidas na VO. Por outro lado, também não pode ser descartada a hipótese de que o efeito cicatrizante observado ocorra apenas pelo sinergismo do “pool” de substâncias ativas contidas na VO, justificando assim a aplicabilidade apenas do extrato bruto (mas não de frações) da mesma espécie (Ghissi et al., 2016; Özbilgin et al., 2018; Toiu et al., 2019).

Estudos prévios demonstram que um aumento do estresse oxidativo pode retardar o processo cicatricial em decorrência dos danos induzidos pelos altos níveis de ROS e oxidação de biomoléculas como lipídios e proteínas (Nouvong et al., 2016; Hoffmann et al., 2018). Interessantemente, nossos dados mostraram que os grupos VO e CP apresentaram uma redução dos níveis de oxidação proteica e peroxidação lipídica no tecido ao longo do tratamento, evidenciando a capacidade antioxidante da VO. Em concordância com nossos achados, Abood et al., 2015, Daemi et al.,

2019 demonstraram através de tratamento realizado com produtos naturais a redução dos níveis de peroxidação lipídica tecidual evidenciando a ação dos antioxidantes na cicatrização de feridas. Portanto, esses achados confirmam seus efeitos reparadores e moduladores da resposta inflamatória corroborando com os achados de Bôa et al., 2015; Pereira et al., 2017; Coutinho et al. 2017 quando a VO foi administrada por via oral. Dessa forma, nossa linha de investigação está de acordo com estudos que avaliaram plantas com capacidade cicatricial e antioxidante (Güvenç et al., 2012; Duque et al., 2016) que também apresentam efeitos sistêmicos protetores similares (Bueno et al., 2016; Yadav et al., 2018). É importante ressaltar que o grupo CP é composto por ácidos graxos dotado de potencial antioxidante (Weimann et al., 2018; Zahid et al., 2019) justificando seu efeito protetor contra a oxidação lipídica e proteica.

Diante dos exitosos efeitos observados em estudos prévios com o Vegederme (Guidoni et al., 2019) nossa hipótese não foi confirmada, visto que obtivemos um resultado aparentemente paradoxal. A introdução do grupo VO e Vegederme teve a intenção de observarmos se haveria algum efeito sinérgico cicatrizante com a incorporação da VO em uma base dermocosmética (rica em antioxidantes) com ação cicatrizante desenvolvida previamente em pesquisas no nosso programa de Pós-Graduação já com publicação em revista de alto impacto (Guidoni et al., 2019). Através dos resultados obtidos, poderíamos especular que assim como observado em outros estudos (Posadino et al., 2015; Pérez-Torres et al., 2017; Espínola et al., 2019), o excesso de exposição aos antioxidantes poderia culminar com efeito pró-oxidante prejudicando o processo cicatricial conforme encontrado em nosso estudo. Diante desses resultados, nosso estudo amplia a ideia de que nem sempre a introdução de vários produtos antioxidantes numa formulação possa desencadear efeitos benéficos, sendo portanto indispensável as investigações em modelos *in vivo*.

Em relação à contração tecidual, uma série de eventos importantes devem acontecer previamente durante a fase proliferativa como, angiogênese, formação de tecido de granulação e reepitelização que resulta na contração tecidual (Phillips, 2016; Ridiandires et al., 2018; El Ayadi et al., 2020). Em nosso trabalho, os dados histológicos demonstram que aplicação tópica de VO apresenta menor quantidade de tecido de granulação sendo provavelmente decorrente do processo de aceleração cicatricial dos 3 dias anteriores ao início da avaliação. Outra

consequência foi observar a boa evolução das com organização das fibras de colágeno, demonstrando maior reepitelização e queratinização ao final da avaliação do tratamento. Sugerimos portanto que a VO tenha influência sobre a migração de fibroblastos para o local da lesão contribuindo assim para a reepitelização. Essa hipótese também pode ser amparada por estudos prévios do nosso laboratório ao demonstrar que a VO não apresenta efeitos de citotoxicidade em fibroblastos demonstrado por investigações *in vitro* (Coutinho et al., 2017). Dessa forma, nossos achados histológicos corroboram nossos resultados macroscópicos demonstrando a contração tecidual *in vivo* através do uso tópico de VO, assim como sua ação antioxidante reduzindo os níveis de oxidação tecidual. Além disso, nossos dados corroboram outros estudos que demonstram a capacidade dos polifenóis em promover reepitelização (Pereira et al., 2018; Saleem et al., 2019).

Em relação à segurança do tratamento tópico com a VO a 5% (p/v), nossos resultados ponderais e bioquímicos plasmáticos corroboram os dados prévios de Pereira et al., 2017. Nesse estudo, foi avaliada a toxicidade da VO por via oral demonstrada acima de 2.500 mg/kg, garantindo a segurança da formulação e possível exequibilidade para estudos clínicos, os quais inclusive já estão em fase de planejamento pelo nosso próprio grupo de pesquisa em pacientes com úlceras crônicas refratárias aos tratamentos tópicos convencionais.

De forma mais global, podemos afirmar que os resultados desse estudo ressaltam mais uma vez a importância da etnofarmacologia para a “descoberta” de novos produtos bioativos em solo brasileiro. Através dessas pesquisas, gera-se candidatos viáveis para testes em humanos, tornando-se possível vislumbrar melhores condições de saúde de populações que convivem com suas feridas abertas dotadas de infecções oportunistas recorrentes acompanhadas de constantes problemas de convívio social e/ou atividade laboral. Além disso, ao reconhecer determinada propriedade farmacológica de uma resina extraída apenas com um golpe no caule como no presente caso, pode-se proporcionar maior estímulo à preservação de espécies, que poderiam ser extintas em poucas décadas pela atividade extrativista madeireira e ao mesmo tempo, fomentar uma atividade econômica local/regional. Neste contexto, podemos afirmar que a partir do nosso estudo, abrem-se oportunidades para futuras pesquisas na área translacional para validar as investigações clínicas da VO como um potencial agente cicatrizante.

Entretanto, nosso estudo apresenta algumas limitações como a ausência da quantificação morfológica das fibras de colágeno dos grupos tratados, assim como a produção de ROS e viabilidade das células cutâneas por citometria de fluxo. Investigações futuras serão realizadas para avaliar esses parâmetros, a fim de enriquecer os dados desse trabalho e auxiliar na elucidação de outras possíveis atividades da VO no processo de cicatrização. Além dos ensaios clínicos translacionais, pretende-se em paralelo desenvolver futuras pesquisas em modelos experimentais diabéticos para investigarmos a real capacidade cicatrizante da VO em modelos mais vulneráveis, visto que o tratamento para feridas em diabéticos ainda é um grande desafio na área dermocosmética.

12. CONCLUSÃO

Nosso estudo é o primeiro a demonstrar a capacidade cicatrizante de uma formulação inédita preparada com VO. Através das análises bioquímicas realizadas, sugerimos que a VO atue, pelo menos em parte, por mecanismos antioxidantes contribuindo para redução do estresse oxidativo e reepitelização. Dessa forma, a resina de VO pode ser um agente terapêutico natural muito promissor para o tratamento de cicatrização de feridas.

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOD, Walaa Najm et al. Wound-healing potential of the fruit extract of *Phaleria macrocarpa*. *Bosnian journal of basic medical sciences* vol. 15,2 25-30. 12 May. 2015, doi:10.17305/bjbms.2015.39

ALMEIDA, I. F. et al. Oak leaf extract as topical antioxidant: Free radical scavenging and iron chelating activities and in vivo skin irritation potential. *BioFactors*, v. 33, n. 4, p. 267–279, 2008.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ANTONI, Delphine et al. “Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo.” *International journal of molecular sciences* vol. 16,3 5517-27. 11 Mar. 2015, doi:10.3390/ijms16035517

AGUILAR, SantaMaria D.; AGUILAR, R.; LAGOMARSINO, L. P. A taxonomic synopsis of *Virola* (Myristicaceae) in Mesoamerica, including six new species. *PhytoKeys*, v. 134, n. 2019, p. 1–82, 23 out. 2019.

AYADI, A.; JAY, J. W.; PRASAI, A. Current Approaches Targeting the Wound Healing Phases to Attenuate Fibrosis and Scarring. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 3, p. 1105, 7 fev. 2020.

ATHAYDES, B. R. et al. Avocado seeds (*Persea americana* Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. *Food Research International*, v. 119, p. 751–760, 2019.

ATIT, RADHIKA; VENKATA THULABANDU, AND D. C. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, v. 7, n. 2, p. e307, mar. 2018.

ATIYEH, B.S. Nonsurgical management of hypertrophic scars: Evidence-based therapies, standard practices, and emerging methods. *Aesthet. Plast. Surg.* 2007, 31, 468–492

AUSTIN, R.E., Merchant, N., Shahrokhi, S., Jeschke, M.G. A comparison of Biobrane™ and cadaveric allograft for temporizing the acute burn wound: Cost and procedural time. *Burns* 2015; 41: 749–753.

BABIOR BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med.* 1978;298(12):659-668. doi:10.1056/NEJM197803232981205

BACHIENSE, BENEVIDES J. et al. Potential anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of *Sambucus australis*. *Pharmaceutical Biology*, v. 55, n. 1, p. 991–997, 6 jan. 2017.

BANEJEE, Jaideep; Chandan K Sen. "microRNA e Wound Healing". *Avanços na medicina experimental e biologia* vol. 888 (2015): 291-305. doi: 10.1007 / 978-3-319-22671-2_15

BANKOVA, V. et al. Antibacterial Diterpenic Acids from Brazilian Propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 51, n. 5–6, p. 277–280, 1 jun. 1996.

BAKER, R. R. The eicosanoids: a historical overview. *Clinical biochemistry*, v. 23, n. 5, p. 455–8, 1990.

BARNES, L. A. et al. Mechanical Forces in Cutaneous Wound Healing: Emerging Therapies to Minimize Scar Formation. *Advances in Wound Care*, v. 7, n. 2, p. 47–56, fev. 2018.

BARSHAK MB, Durand ML. The role of infection and antibiotics in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 2017;2:36– 42. doi: 10.1002/liv.2.61.

BARON, J. M.; GLATZ, M.; PROKSCH, E. Optimal Support of Wound Healing: New Insights. *Dermatology*, p. 1–8, 17 jan. 2020.

BARRETO, B. B. et al. *Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos*. 2016.

BELOKHVOSTOVA, Daria et al. Homeostasis, regeneration and tumour formation in the mammalian epidermis. *The International journal of developmental biology* vol. 62,6-7-8 (2018): 571-582. doi:10.1387/ijdb.170341fw

BESERRA, F. P. et al. Lupeol, a Dietary Triterpene, Enhances Wound Healing in Streptozotocin-Induced Hyperglycemic Rats with Modulatory Effects on Inflammation, Oxidative Stress, and Angiogenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, p. 1–20, 9 maio 2019.

BILLINGHAM RE, RUSSELL PS. Studies on wound healing, with special reference to the phenomenon of contracture in experimental wounds in rabbits' skin. *Ann Surg*. 1956;144(6):961-981. doi:10.1097/00000658-195612000-00005

BÔA, I. S. F. et al. Resin from *Virola oleifera* Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. *PLOS ONE*, v. 10, n. 12, p. e0144329, 16 dez. 2015.

BOCHEVA, Georgeta et al. Neuroendocrine Aspects of Skin Aging. *International journal of molecular sciences* vol. 20,11 2798. 7 Jun. 2019, doi:10.3390/ijms20112798

BOON, G. D. An Overview of Hemostasis. *Toxicologic Pathology*, v. 21, n. 2, p. 170–179, 2 mar. 1993.

BRYAN, Nicholas et al. Reactive oxygen species (ROS) a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. *European cells & materials* vol. 24 249-65. 24 Sep. 2012, doi:10.22203/ecm.v024a18

BROUGHTON, George 2nd et al. "Wound healing: an overview." *Plastic and reconstructive surgery* vol. 117,7 Suppl (2006): 1e-S-32e-S. doi:10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9

BROWN, J. The impact of stress on acute wound healing. *British Journal of Community Nursing*, v. 21, n. Sup12, p. S16–S22, dez. 2016.

BUENO, Fernanda Giacomini et al. Enhanced Cutaneous Wound Healing In Vivo by Standardized Crude Extract of *Poincianella pluviosa*. *PloS one* vol. 11,3 e0149223. 3 Mar. 2016, doi:10.1371/journal.pone.0149223

BUFFONI, F. et al. Skin Wound Healing: Some Biochemical Parameters in Guinea-pig. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 45, n. 9, p. 784–790, set. 1993.

BUTIN ISRAELI, V. et al. Neutrophil-induced genomic instability impedes resolution of inflammation and wound healing. *Journal of Clinical Investigation*, v. 129, n. 2, p. 712–726, 2019.

CAETANO GF, Fronza M, Leite MN et al. Comparison of collagen content in skin wounds evaluated by biochemical assay and by computer-aided histomorphometric analysis. *Pharm Biol* 2016; 54(11):2555–2559. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1170861>

CAETANO, K.S.; FRADE, M.A.C.; MINATEL, D.G.; SANTANA, L.A.; ENWEMEKA, C.S. Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. *Photomedicine & Laser Surgery*, Larchmont, v. 27, p. 111-118, 2009.

CAÑEDO-DORANTES, L.; CAÑEDO-AYALA, M. Skin acute wound healing: A comprehensive review *International Journal of Inflammation*, 2019.

CECARINI, Valentina et al. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochimica et biophysica acta* vol. 1773,2 (2007): 93-104. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.039

CHISTÉ LA, Pereira BP, Porto ML, et al. Worsening of Oxidative Stress, DNA Damage, and Atherosclerotic Lesions in Aged LDLr^{-/-} Mice after Consumption of Guarana Soft Drinks. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:9042526. Published 2019 Jun 10. doi:10.1155/2019/9042526

CASSATELLA, M. A. Neutrophil-Derived Proteins: Selling Cytokines by the Pound. In: *Advances in Immunology*. [s.l.: s.n.]. v. 73p. 369–509.

CHHABRA, S. et al. Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, v. 16, n. 4, p. 403–423, 5 dez. 2017.

CHILDS, D. R.; MURTHY, A. S. Overview of Wound Healing and Management. *Surgical Clinics of North America*, v. 97, n. 1, p. 189–207, fev. 2017.

CLARK, R. A. F. Biology of Dermal Wound Repair. *Dermatol Clinics*, v. 11, n. 4, 1993.

CNCFLORA. *Virola bicuhyba*. In: Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Virola%20bicuhyba> . Acesso em: 26 jun. 2020.

COLLER BS. Historical perspective and future directions in platelet research. *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl 1(Suppl 1):374-395. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04356.x

COUTINHO, P. N. et al. Chronic administration of antioxidant resin from *Virola oleifera* attenuates atherogenesis in LDLr^{-/-} mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 206, p. 65–72, 2017.

CRUZ NI, Korchin L. Inhibition of human keloid fibroblast growth by isotretinoin and triamcinolone acetonide in vitro. *Ann Plast Surg*. 1994 Oct;33(4):401-5. doi: 10.1097/00000637-199410000-00007. PMID: 7810956.

CSEPREGI, R. et al. Cytotoxic, Antimicrobial, Antioxidant Properties and Effects on Cell Migration of Phenolic Compounds of Selected Transylvanian Medicinal Plants. *Antioxidants*, v. 9, n. 2, p. 166, 18 fev. 2020.

DAEMI, Amin et al. Topical application of *Cinnamomum* hydroethanolic extract improves wound healing by enhancing re-epithelialization and keratin

biosynthesis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Pharmaceutical biology* vol. 57,1 (2019): 799-806. doi:10.1080/13880209.2019.1687525.

DARR D, Fridovich I. Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol.* 1994;102(5):671-675. doi:10.1111/1523-1747.ep12374036

DARBY, I. A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, v. 7, p. 301–311, 2014.

DEGOVICS, D. et al. A novel target for the promotion of dermal wound healing: Ryanodine receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 366, n. October 2018, p. 17–24, mar. 2019.

DEV, Suresh Kumar et al. Antimicrobial, anti-inflammatory and wound healing activity of polyherbal formulation. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* vol. 111 (2019): 555-567. doi:10.1016/j.biopha.2018.12.075

DIWANJI, N.; BERGMANN, A. The beneficial role of extracellular reactive oxygen species in apoptosis-induced compensatory proliferation. *Fly*, v. 11, n. 1, p. 46–52, 2 jan. 2017.

DOAN, H. V.; LE, T. P. *Chrysophyllum cainito* : A Tropical Fruit with Multiple Health Benefits. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2020, p. 1–9, 19 fev. 2020.

DREIFKE, Michael B et al. Current wound healing procedures and potential care. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* vol. 48 (2015): 651-62. doi:10.1016/j.msec.2014.12.068

DUNNILL, C. et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International Wound Journal*, v. 14, n. 1, p. 89–96, fev. 2015.

DUQUE, Ana Paula do Nascimento et al. In vivo wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. *The Journal of pharmacy and pharmacology* vol. 68,1 (2016): 128-38. doi:10.1111/jphp.12496

El Ayadi, Amina et al. Current Approaches Targeting the Wound Healing Phases to Attenuate Fibrosis and Scarring. *International journal of molecular sciences* vol. 21,3 1105. 7 Feb. 2020, doi:10.3390/ijms21031105

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, n. 1–3, p. 111–120, abr. 1996.

ELLIS, P. The impact of smoking on wound healing: the role of the nurse. *British Journal of Nursing*, v. 27, n. 6, p. S10–S14, 22 mar. 2018.

ELLIS, S.; LIN, E. J.; TARTAR, D. Immunology of Wound Healing. *Current Dermatology Reports*, v. 7, n. 4, p. 350–358, 2018.

ESPÍNDOLA, Kaio Murilo Monteiro et al. Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Frontiers in oncology* vol. 9 541. 21 Jun. 2019, doi:10.3389/fonc.2019.00541

ESPOSITO, Debora et al. Alaskan Berry Extracts Promote Dermal Wound Repair Through Modulation of Bioenergetics and Integrin Signaling. *Frontiers in pharmacology* vol. 10 1058. 27 Sep. 2019, doi:10.3389/fphar.2019.01058

BIEREN, ESSER-VON, J. Eicosanoids in tissue repair. *Immunology and Cell Biology*, v. 97, n. 3, p. 279–288, 2019.

FONSECA MA, Almeida RR, Reis SRA, Medrado ARAP. Repercussão de doenças sistêmicas no reparo técnico. *Rev Baian Odont.* 2012; 3 : 63–75.

FRONZA M, Muhr C, da Silveira DSC et al. Hyaluronidase decreases neutrophils infiltration to the inflammatory site. *Inflamm Res* 2016. 65(7):533–542. <https://doi.org/10.1007/s00011-016-0935-0>

FURLONG BADIALE, E. et al. Use of natural resources from Southern Brazil as a strategy to mitigate fungal contamination. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 0, n. 0, p. 1–8, 19 fev. 2020.

GABBIANI G. The biology of the myofibroblast. *Kidney Int* 1992;41:530-532.

GHLISSI, Zohra et al. Antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory and wound healing effects of *Artemisia campestris* aqueous extract in rat. *Biomedicine & pharmacotherapy*. *Biomedecine & pharmacotherapie* vol. 84 (2016): 115-122. doi:10.1016/j.biopha.2016.09.018

GODO, S.; SHIMOKAWA, H. Endothelial Functions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 37, n. 9, p. e108–e114, set. 2017.

GOLEBIEWSKA EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 2015;29(3):153-162. doi:10.1016/j.blre.2014.10.003

GONZALEZ, Ana Cristina de Oliveira et al. Wound healing - A literature review. *Anais brasileiros de dermatologia* vol. 91,5 (2016): 614-620. doi:10.1590/abd1806-4841.20164741

GOUVEIA, S. DA S.; LIMA, A. A. Insert Relationship Between Reactive Species of Oxygen and Carcinogenic Promotion. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR*, v. 20, n. 3, p. 174–179, 2017.

GOUZOS, Michael et al. “Antibiotics Affect ROS Production and Fibroblast Migration in an In-vitro Model of Sinonasal Wound Healing.” *Frontiers in cellular and infection microbiology* vol. 10 110. 19 Mar. 2020, doi:10.3389/fcimb.2020.00110 Serra R., Gallelli L., Buffone G., Molinari V., Stillitano D. M., Palmieri C., et al. . (2015). Doxycycline speeds up healing of chronic venous ulcers. *Int. Wound J.* 12, 179–184. 10.1111/iwj.12077

GUIDONI, M. et al. Development and evaluation of a vegetable oil blend formulation for cutaneous wound healing. *Archives of Dermatological Research*, v. 311, n. 6, p. 443–452, 22 ago. 2019.

GUNES, S. et al. In vitro evaluation of *Spirulina platensis* extract incorporated skin cream with its wound healing and antioxidant activities. *Pharmaceutical Biology*, v. 55, n. 1, p. 1824–1832, 29 jan. 2017.

GUO, Q. et al. Oxidative stress, nutritional antioxidants and beyond. *Science China Life Sciences*, 5 nov. 2019.

GUO S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-229. doi:10.1177/0022034509359125

GURTNER, Geoffrey C et al. Wound repair and regeneration. *Nature* vol. 453,7193 (2008): 314-21. doi:10.1038/nature07039

GÜVENÇ, Ayşegül et al. Wound healing and anti-inflammatory activities of the *Michauxia L'Hérit* (Campanulaceae) species native to Turkey. *Journal of ethnopharmacology* vol. 139,2 (2012): 401-8. doi:10.1016/j.jep.2011.11.024

GÜZEL, S. et al. Wound healing properties, antimicrobial and antioxidant activities of *Salvia kronenburgii* Rech. f. and *Salvia euphratica* Montbret, Aucher & Rech. f. var. *euphratica* on excision and incision wound models in diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 111, n. September 2018, p. 1260–1276, mar. 2019.

GWAK JH, Sohn SY. Identificando as tendências nas patentes de cicatrização para estratégias de investimento bem-sucedidas. *PLoS One* . 2017; 12 (3): e0174203. Publicado 2017 em 17 de março de. Doi: 10.1371 / journal.pone.0174203

HAMEEDALDEEN, Alhassan et al. FOXO1, TGF- β regulation and wound healing. *International journal of molecular sciences* vol. 15,9 16257-69. 15 Sep. 2014, doi:10.3390/ijms150916257

HAN G, Ceilley R. Cura Crônica de Feridas: Uma Revisão do Tratamento e Tratamentos Atuais. *Adv Ther* . 2017; 34 (3): 599-610. doi: 10.1007 / s12325-017-0478-y

HAJIALYANI, M. et al. Natural product-based nanomedicines for wound healing purposes: therapeutic targets and drug delivery systems. *International Journal of Nanomedicine*, v. Volume 13, p. 5023–5043, set. 2018.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, v. 25, n. 3, p. 585–621, dez. 1961.

HESSELINK, J. M. K.; CHIOSI, F.; COSTAGLIOLA, C. Resolvins and aliamides: Lipid autacoids in ophthalmology – What promise do they hold? *Drug Design, Development and Therapy*, v. 10, p. 3133–3141, 2016.

HEW, J. et al. The effects of dietary macronutrient balance on skin structure in aging male and female mice. *PLoS ONE*, v. 11, n. 11, p. 1–15, 2016.

HOFFMANN, M. H.; GRIFFITHS, H. R. The dual role of Reactive Oxygen Species in autoimmune and inflammatory diseases: evidence from preclinical models. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 125, n. March, p. 62–71, set. 2018.

HOLINSTAT M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(2):195-198. doi:10.1007/s10555-017-9677-x

HORMOZI, M. et al. *Calendula officinalis* stimulate proliferation of mouse embryonic fibroblasts via expression of growth factors TGF β 1 and bFGF. *Inflammation and Regeneration*, v. 39, n. 1, p. 7, 20 dez. 2019.

HU, S. et al. Needle-Free Injection of Exosomes Derived from Human Dermal Fibroblast Spheroids Ameliorates Skin Photoaging. *ACS Nano*, v. 13, n. 10, p. 11273–11282, 22 out. 2019.

HUANG, J.; NING, N.; ZHANG, W. Effects of paraquat on IL - 6 and TNF - α in macrophages. *Experimental and Therapeutic Medicine*, p. 1783–1789, 14 dez. 2018.

HUANG, Yi-Zhou et al. “Mesenchymal Stem Cells for Chronic Wound Healing: Current Status of Preclinical and Clinical Studies.” *Tissue engineering. Part B, Reviews*,10.1089/ten.TEB.2019.0351.May 2020, doi:10.1089/ten.TEB.2019.0351

HUNT, T. K.; ZEDERFELDT, B.; GOLDSTICK, T. K. Oxygen and healing. *The American Journal of Surgery*, v. 118, n. 4, p. 521–525, out. 1969.

HUSSAIN, T. et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, p. 1–9, 2016.

HWANG, S.-M. et al. The Role of Maresins in Inflammatory Pain: Function of Macrophages in Wound Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 23, p. 5849, 21 nov. 2019.

IBRAHIM, N. 'IZZAH et al. Wound healing properties of selected natural products *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018.

ITO, F.; SONO, Y.; ITO, T. Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. *Antioxidants*, v. 8, n. 3, p. 72, 25 mar. 2019.

JACINTO, T. A. et al. Increased ROS production and DNA damage in monocytes are biomarkers of aging and atherosclerosis. *Biological Research*, v. 51, n. 1, p. 33, 5 dez. 2018.

JAMADAGNI, P. et al. Experimental and histopathological observation scoring methods for evaluation of wound healing properties of Jatyadi Ghrita. *AYU (An international quarterly journal of research in Ayurveda)*, v. 37, n. 3, p. 222, 2016.

JANIS, J. E.; HARRISON, B. Wound healing: Part I. basic science. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 138, n. 3, p. 9S-17S, 2016.

JULIER, Z. et al. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomaterialia*, v. 53, p. 13–28, abr. 2017.

KAPANYA, A. et al. Synthesis of polymeric hydrogels incorporating chlorhexidine gluconate as antibacterial wound dressings. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 0, n. 0, p. 1–15, 12 fev. 2020.

KEPPEL HESSELINK, J. M. Fundamentals of and Critical Issues in Lipid Autocoid Medicine: A Review. *Pain and Therapy*, v. 6, n. 2, p. 153–164, 2017.

KIVISAARI, J. et al. Energy metabolism of experimental wounds at various oxygen environments. *Annals of Surgery*, v. 181, n. 6, p. 823–828, 1975.

KIYA, K.; KUBO, T. Neurochemistry International Neurovascular interactions in skin wound healing. *Neurochemistry International*, v. 125, n. February, p. 144–150, 2019.

KOH TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med*. 2011;13:e23. Published 2011 Jul 11. doi:10.1017/S1462399411001943

KOLLURU, Gopi Krishna et al. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *International journal of vascular medicine* vol. 2012 (2012): 918267. doi:10.1155/2012/918267

KOTWAL GJ, Chien S. Macrophage Differentiation in Normal and Accelerated Wound Healing. *Results Probl Cell Differ*. 2017;62:353-364. doi:10.1007/978-3-319-54090-0_14

KOYAMA, Sachiko et al. Beta-caryophyllene enhances wound healing through multiple routes. *PloS one* vol. 14,12 e0216104. 16 Dec. 2019, doi:10.1371/journal.pone.0216104

KRUSE, C. R. et al. The effect of local hyperglycemia on skin cells in vitro and on wound healing in euglycemic rats. *Journal of Surgical Research*, v. 206, n. 2, p. 418–426, dez. 2016.

KRZYSZCZYK, Paulina et al. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in physiology* vol. 9 419. 1 May. 2018, doi:10.3389/fphys.2018.00419

KUROKI, M et al. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *The Journal of clinical investigation* vol. 98,7 (1996): 1667-75. doi:10.1172/JCI118962

KURT, B. et al. Effects of *Plantago lanceolata* L. extract on full-thickness excisional wound healing in a mouse model. *Biotechnic & Histochemistry*, v. 93, n. 4, p. 249–257, 19 maio 2018.

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÅHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 73, n. 20, p. 3861–3885, 14 out. 2016.

LAROUCHE, Jacqueline et al. Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Advances in wound care* vol. 7,7 (2018): 209-231. doi:10.1089/wound.2017.0761

LEAL, M. L.; ALVES, R. P.; HANAZAKI, N. Knowledge, use, and disuse of unconventional food plants. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 14, n. 1, p. 6, 17 dez. 2018.

LEE, Ho Jun; Yong Ju Jang. "Recent Understandings of Biology, Prophylaxis and Treatment Strategies for Hypertrophic Scars and Keloids." *International journal of molecular sciences* vol. 19,3 711. 2 Mar. 2018, doi:10.3390/ijms19030711

LEE, Kevin et al. Randomized clinical trial of negative pressure wound therapy for high-risk groin wounds in lower extremity revascularization. *Journal of vascular surgery* vol. 66,6 (2017): 1814-1819. doi:10.1016/j.jvs.2017.06.084

LEIBOVICH SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol.* 1975;78(1):71-100.

LÉVIGNE, A. Dominik et al. "Reactive Oxygen Species and NOX Enzymes Are Emerging as Key Players in Cutaneous Wound Repair." *International journal of molecular sciences* vol. 18,10 2149. 15 Oct. 2017, doi:10.3390/ijms18102149

LI, Jie et al. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology* vol. 25,1 (2007): 9-18. doi:10.1016/j.clindermatol.2006.09.007

LI, L.-J. et al. The crude ethanol extract of *Periplaneta americana* L. stimulates wound healing in vitro & in vivo. *Chinese Medicine*, v. 14, n. 1, p. 33, 18 dez. 2019.

LIM, L. et al. Hemostasis stimulates lymphangiogenesis through release and activation of VEGFC. *Blood*, v. 134, n. 20, p. 1764–1775, 14 nov. 2019.

LIN, Tzu-Kai et al. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *International journal of molecular sciences* vol. 19,1 70. 27 Dec. 2017, doi:10.3390/ijms19010070

LINDLEY, L. E. et al. Biology and biomarkers for wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 138, n. 3, p. 18S-28S, 2016.

LISMAN, T.; DE MOERLOOSE, P. The Role of Fibrinogen and Factor XIII in Hemostasis, and the Identification and Treatment of Associated Disorders. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v. 42, n. 04, p. 331–332, 27 maio 2016.

LIU, Lixin et al. Age-dependent impairment of HIF-1alpha expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells. *Journal of cellular physiology* vol. 217,2 (2008): 319-27. doi:10.1002/jcp.21503

LOOTS, M. A. M. et al. Differences in Cellular Infiltrate and Extracellular Matrix of Chronic Diabetic and Venous Ulcers Versus Acute Wounds. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 111, n. 5, p. 850–857, nov. 1998.

LOPES, G. C. et al. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, n. 2, p. 265–272, jun. 2005.

MACHADO, G. H. A. et al. Antibacterial activity and in vivo wound healing potential of phenolic extracts from jaboticaba skin. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 92, n. 1, p. 1333–1343, jul. 2018.

MAJNO, G. Chronic Inflammation. *The American Journal of Pathology*, v. 153, n. 4, p. 1035–1039, out. 1998.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 8, p. 519–531, 25 ago. 2011.

MARQUARDT, P. et al. Phytochemical Characterization and In Vitro Anti-inflammatory, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Combretum Collinum* Fresen Leaves Extracts from Benin. *Molecules*, v. 25, n. 2, p. 288, 10 jan. 2020.

MARQUES, F. et al. In Vitro and In Vivo Anti-inflammatory Effects of *Struthanthus vulgaris*. *Planta Medica*, v. 83, n. 09, p. 770–777, 30 jun. 2017.

MARTIN P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276(5309):75-81. doi:10.1126/science.276.5309.75

MASON, Diane E et al. Molecular basis of voltage-dependent potassium currents in porcine granulosa cells. *Molecular pharmacology* vol. 61,1 (2002): 201-13. doi:10.1124/mol.61.1.201

MATOWICKA, J. K. Markers of inflammation, activation of blood platelets and coagulation disorders in inflammatory bowel diseases Joanna. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, v. 70, p. 305–312, 13 abr. 2016.

MCELROY, J. P. et al. Effects of cessation of cigarette smoking on eicosanoid biomarkers of inflammation and oxidative damage. *PLoS ONE*, v. 14, n. 6, p. 1–12, 2019.

MELMON, K. L.; ROCKLIN, R. E.; ROSENKRANZ, R. P. Autacoids as modulators of the inflammatory and immune response. *The American Journal of Medicine*, v. 71, n. 1, p. 100–106, 1981.

MESCHER, A. L. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration*, v. 4, n. 2, p. 39–53, 2017.

MEYRELLES, S. S. et al. Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in Health and Disease*, v. 10, n. 1, p. 211, 2011.

MILANEZE, B. A. et al. Facile Synthesis of Monodisperse Gold Nanocrystals Using *Viola oleifera*. *Nanoscale Research Letters*, v. 11, n. 1, 2016.

MINUTTI, C. M. et al. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2017.

MIR, M. et al. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Progress in Biomaterials*, v. 7, n. 1, p. 1–21, 14 mar. 2018.

MISCIANINOV, Vladislav et al. "O MicroRNA-148b tem como alvo a via TGF- β para regular a angiogênese e a transição endotelial para mesenquimal durante a cicatrização de feridas na pele". *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 26,8 (2018): 1996-2007. doi: 10.1016 / j.ymthe.2018.05.002

MOLNAR, J. A.; VLAD, L. G.; GUMUS, T. Nutrition and Chronic Wounds. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 138, n. 3, p. 71S-81S, set. 2016.

MORTON JJ, Malone MH. Evaluation of vulneray activity by an open wound procedure in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1972;196(1):117-126.

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

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, out. 2004.

NADERI, H., Matin, M., Bahrami, A.R. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *J Biomater Appl* 2011; 26: 4, 308–417

NAGARAJA, S. et al. Predictive Approach Identifies Molecular Targets and Interventions to Restore Angiogenesis in Wounds With Delayed Healing. *Frontiers in Physiology*, v. 10, n. MAY, p. 1–17, 28 maio 2019.

NOBRE, C. A. et al. Land-use and climate change risks in the Amazon and the need of a novel sustainable development paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 39, p. 10759–10768, 27 set. 2016.

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, 18 set. 2019.

NOUVONG, Aksone et al. Reactive oxygen species and bacterial biofilms in diabetic wound healing. *Physiological genomics* vol. 48,12 (2016): 889-896. doi:10.1152/physiolgenomics.00066.2016

NOWARSKI, R.; JACKSON, R.; FLAVELL, R. A. The Stromal Intervention: Regulation of Immunity and Inflammation at the Epithelial-Mesenchymal Barrier. *Cell*, v. 168, n. 3, p. 362–375, 2017.

OGAWA R. Keloid and Hypertrophic Scars Are the Result of Chronic Inflammation in the Reticular Dermis. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 10;18(3):606. doi: 10.3390/ijms18030606. PMID: 28287424; PMCID: PMC5372622.

OHKAWA, H et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* vol. 95,2 (1979): 351-8. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3

OLIVEIRA, Sofia et al. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nature reviews. Immunology* vol. 16,6 (2016): 378-91. doi:10.1038/nri.2016.49

OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E. E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 6, p. 378–391, 27 jun. 2016.

OKONKWO, U.; DIPIETRO, L. Diabetes and Wound Angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 7, p. 1419, 3 jul. 2017.

ORYAN, A et al. “Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions.” *Journal of wound care* vol. 26,1 (2017): 5-19. doi:10.12968/jowc.2017.26.1.5

ÖZBILGIN, Serkan et al. In vivo wound-healing activity of *Euphorbia characias* subsp. *wulfenii*: Isolation and quantification of quercetin glycosides as bioactive compounds. *Journal of ethnopharmacology* vol. 224 (2018): 400-408. doi:10.1016/j.jep.2018.06.015

PAR, J. *Anatomy, Physiology, and Pathology of the Skin. The Medico-chirurgical review*, v. 2, n. 3, p. 29–53, 1 jan. 1825.

PASPARAKIS, M.; HAASE, I.; NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 14, n. 5, p. 289–301, 2014.

PATEL, S.; MAHESHWARI, A.; CHANDRA, A. Biomarkers for wound healing and their evaluation. *Journal of Wound Care*, v. 25, n. 1, p. 46–55, 2 jan. 2016.

PEREIRA, A. C. H. et al. Gastroprotective activity of the resin from *Virola oleifera*. *Pharmaceutical Biology*, v. 55, n. 1, p. 472–480, 2017.

PEREIRA, L. O. M. et al. Wound healing activity and mechanism of action of standardized hydroethanolic leaves extract. *Journal of Ethnopharmacology*. (2018).

PÉREZ-TORRES, Israel et al. Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents. *International journal of molecular sciences* vol. 18,10 2098. 5 Oct. 2017, doi:10.3390/ijms18102098

PINHEIRO, P. F. et al. Semisynthetic Phenol Derivatives Obtained from Natural Phenols: Antimicrobial Activity and Molecular Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 1, p. 323–330, 10 jan. 2018.

PORTO, M. L. et al. Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice. *Journal of Biomedical Science*, v. 22, n. 1, p. 97, 24 dez. 2015.

POSADINO, Anna Maria et al. Resveratrol alters human endothelial cells redox state and causes mitochondrial-dependent cell death. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* vol. 78 (2015): 10-6. doi:10.1016/j.fct.2015.01.017

QIAO, Jianlin et al. "Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species." *Redox biology* vol. 14 (2018): 126-130. doi:10.1016/j.redox.2017.08.021

QING, Chun. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chinese journal of traumatology Zhonghua chuang shang za zhi* vol. 20,4 (2017): 189-193. doi:10.1016/j.cjtee.2017.06.001

QUINTANILHA, L. G.; LOBÃO, A. Q. Flora do Rio de Janeiro: Myristicaceae. *Rodriguésia*, v. 68, n. 1, p. 85–89, mar. 2017.

RANDALL, M. J. et al. Advances in the biofabrication of 3D skin in vitro: Healthy and pathological models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 6, n. OCT, 2018.

REITZ, P. R.; klein, R. M. Flora Ilustrada Catarinense: Miristicáceas. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1968.

RHIMI, W. et al. *Dittrichia viscosa* L. Ethanolic Extract Based Ointment with Antiradical, Antioxidant, and Healing Wound Activities. *BioMed Research International*, v. 2019, n. i, p. 1–10, 22 abr. 2019.

RIDIANDRIES, A.; TAN, J.; BURSILL, C. The Role of Chemokines in Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 10, p. 3217, 18 out. 2018.

RIDLEY, A. J.; HALL, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, v. 70, n. 3, p. 389–399, 1992.

RIO, D. DEL et al. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 18, n. 14, p. 1818–1892, 10 maio 2013.

RIPPA, A. L.; KALABUSHEVA, E. P.; VOROTELYAK, E. A. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells*, v. 8, n. 6, p. 607, 18 jun. 2019.

RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *Journal of Cell Communication and Signaling*, v. 10, n. 2, p. 103–120, 2016.

RODRIGUES, M. et al. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews*, v. 99, n. 1, p. 665–706, 1 jan. 2019.

RODRIGUES, T. et al. Counting on natural products for drug design. *Nature Chemistry*, v. 8, n. 6, p. 531–541, 25 jun. 2016.

RODRIGUES, W. A. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA (INPA) Revisão taxonômica das espécies de *Virola* Aublet (Myristicaceae) do Brasil. *ACTA AMAZÔNICA*, v. 1, 1980.

ROUSSELLE, P.; BRAYE, F.; DAYAN, G. Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018.

RUSSELL, L. The importance of patients' nutritional status in wound healing. *British Journal of Nursing*, v. 10, n. Sup1, p. S42–S49, mar. 2001.

SANCHEZ, CANO M. et al. Targeting Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the Treatment of Impaired Wound Healing: A Systematic Review. *Antioxidants*, v. 7, n. 8, p. 98, 24 jul. 2018.

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, maio 2016.

SALEEM, U. et al. Phytochemical analysis and wound healing studies on ethno medicinally important plant *Malva neglecta* Wallr. *Journal of Ethnopharmacology*. 112401. doi:10.1016/j.jep.2019.112401

SANTOS, V. DE S. et al. Silymarin protects against radiocontrast-induced nephropathy in mice. *Life Sciences*, v. 228, n. April, p. 305–315, jul. 2019.

SARIC, Suzana; Raja K Sivamani. Polyphenols and Sunburn. *International journal of molecular sciences* vol.17,9 1521. 9 Sep. 2016, doi:10.3390/ijms17091521

SEN CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(11):1348-1361. doi:10.1016/j.bbagen.2008.01.006

SCHREML, S. et al. Oxygen in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology*, v. 163, n. 2, p. 257–268, 15 abr. 2010.

STALKER, Timothy J et al. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood* vol. 121,10 (2013): 1875-85. doi:10.1182/blood-2012-09-457739

SEN, Chandan K. Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. *Advances in wound care* vol. 8,2 (2019): 39-48. doi:10.1089/wound.2019.0946

SEN CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(11):1348-1361. doi:10.1016/j.bbagen.2008.01.006

SERRA, M. B. et al. From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing. *International Journal of Inflammation*, v. 2017, p. 1–17, 2017.

SHAH, A.; AMINI-NIK, S. The Role of Phytochemicals in the Inflammatory Phase of Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 5, p. 1068, 16 maio 2017.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 820–897, out. 2015.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 32, n. 1, p. 67–103, jan. 1992.

SHARMA, Preeti et al. Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *Journal of medicine and life* vol. 12,3 (2019): 225-229. doi:10.25122/jml-2019-0032

SHEDOEVA, A. et al. Wound Healing and the Use of Medicinal Plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2019, n. Figure 1, p. 1–30, 22 set. 2019.

SHILO, Shani et al. MicroRNA in cutaneous wound healing: a new paradigm. *DNA and cell biology* vol. 26,4 (2007): 227-37. doi:10.1089/dna.2006.0568

SHOOK, B. et al. CD301b+ Macrophages Are Essential for Effective Skin Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 136, n. 9, p. 1885–1891, set. 2016.

SHUKLA, A. et al. Differential Expression of Proteins during Healing of Cutaneous Wounds in Experimental Normal and Chronic Models. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 244, n. 2, p. 434–439, mar. 1998.

SHUKLA, S. K. et al. Pharmacological control of inflammation in wound healing. *Journal of Tissue Viability*, v. 28, n. 4, p. 218–222, nov. 2019.

SILVERSTEIN, P. Smoking and wound healing. *The American Journal of Medicine*, v. 93, n. 1, p. S22–S24, jul. 1992.

SINGH, Rekha et al. Bitter Melon Extract Promotes Granulation Tissue Growth and Angiogenesis in the Diabetic Wound. *Advances in skin & wound care* vol. 30,1 (2017): 16-26. doi:10.1097/01.ASW.0000504758.86737.76

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. *New England Journal of Medicine*, v. 341, n. 10, p. 738–746, 2 set. 1999.

SMIGIEL, K. S.; PARKS, W. C. Macrophages, Wound Healing, and Fibrosis: Recent Insights. *Current Rheumatology Reports*, v. 20, n. 4, 2018.

SMITH, K. A.; WAYPA, G. B.; SCHUMACKER, P. T. Redox signaling during hypoxia in mammalian cells. *Redox Biology*, v. 13, n. March, p. 228–234, out. 2017.

SORG, H. et al. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*, v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 2017.

SPAMPINATO, Simona Federica et al. The Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes: Looking among Old Drugs. *Pharmaceuticals* 2020, 13(4), 60; <https://doi.org/10.3390/ph13040060>

SPEROTTO, N. D. DE M. et al. Wound healing and anti-inflammatory activities induced by a *Plantago australis* hydroethanolic extract standardized in verbascoside. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 225, n. April, p. 178–188, out. 2018.

SRIVASTAVA, Swayam Prakash et al. Crosstalk microRNA influencia as transições epiteliais para mesenquimais, endoteliais para mesenquimais e macrófagos para mesenquimais no rim. *Fronteiras em farmacologia* vol. 10 904. 16 de agosto de 2019, doi: 10.3389 / fphar.2019.00904

ȘTEFĂNESCU, B. E. et al. Phenolic Compounds from Five Ericaceae Species Leaves and Their Related Bioavailability and Health Benefits. *Molecules*, v. 24, n. 11, p. 2046, 29 maio 2019.

SU, Y.; RICHMOND, A. Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of Skin Wounds. *Advances in Wound Care*, v. 4, n. 11, p. 631–640, 2015.

TAN, Woan Sean et al. Improvement of diabetic wound healing by topical application of Vicenin-2 hydrocolloid film on Sprague Dawley rats. *BMC complementary and alternative medicine* vol. 19,1 20. 17 Jan. 2019, doi:10.1186/s12906-018-2427-y

TATSIS, E. C.; O'CONNOR, S. E. New developments in engineering plant metabolic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 42, p. 126–132, dez. 2016.

TENENHUS M, Rennekampff H-O: Current concepts in tissue engineering. *Plast Reconstr Surg* 2016;138:42S– 50S

TRACY, L. E.; MINASIAN, R. A.; CATERSON, E. J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Advances in Wound Care*, v. 5, n. 3, p. 119–136, mar. 2016.

TOIU, Anca et al. *Solidago graminifolia* L. Salisb. (Asteraceae) as a Valuable Source of Bioactive Polyphenols: HPLC Profile, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Potential. *Molecules* (Basel, Switzerland) vol. 24,14 2666. 23 Jul. 2019, doi:10.3390/molecules24142666

TOMAIUOLO, Maurizio et al. Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. *Interventional cardiology clinics* vol. 6,1 (2017): 1-12. doi:10.1016/j.iccl.2016.08.001

TONNESEN, M. G. et al. Angiogenesis in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, v. 5, n. 1, p. 40–46, 2000.

VALLÉE, A.; LECARPENTIER, Y. TGF- β in fibrosis by acting as a conductor for contractile properties of myofibroblasts. *Cell & Bioscience*, v. 9, n. 1, p. 98, 9 dez. 2019.

VASQUEZ EC, Aires R, Ton AMM, Amorim FG. New Insights on the Beneficial Effects of the Probiotic Kefir on Vascular Dysfunction in Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases [published online ahead of print, 2020 Mar 4]. *Curr Pharm Des.* 2020;10.2174/1381612826666200304145224. doi:10.2174/1381612826666200304145224

VEREMEYKO, T. et al. Early Growth Response Gene-2 Is Essential for M1 and M2 Macrophage Activation and Plasticity by Modulation of the Transcription Factor CEBP β . *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. NOV, p. 1–23, 1 nov. 2018.

XUE M, JACKSON CJ. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4(3):119-136. doi:10.1089/wound.2013.0485

WLASCHEK M, Scharffetter-Kochanek K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 2005;13(5):452-461. doi:10.1111/j.1067-1927.2005.00065.x

WAN AS et al. Corticosteroids and wound healing: clinical considerations in the perioperative period. *Am J Surg.* 2013 Sep;206(3):410-7. doi: 10.1016/j.amjsurg.2012.11.018. Epub 2013 Jun 4. PMID: 23759697.

WANGCHUK, P. Therapeutic Applications of Natural Products in Herbal Medicines, Biodiscovery Programs, and Biomedicine. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2 jan. 2018.

WATER, Van L.; VARNEY, S.; TOMASEK, J. J. Mechanoregulation of the Myofibroblast in Wound Contraction, Scarring, and Fibrosis: Opportunities for New Therapeutic Intervention. *Advances in Wound Care*, v. 2, n. 4, p. 122–141, 2013.

WEI, D. et al. Chronic wound biofilms: diagnosis and therapeutic strategies. *Chinese Medical Journal*, v. 132, n. 22, p. 2737–2744, nov. 2019.

WEIMANN Eleine et al. Topical anti-inflammatory activity of palmitoleic acid improves wound healing. *Curi R, et al. (2018). PLoS ONE 13(10): e0205338.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205338>

WELSH, John D et al. A systems approach to hemostasis: 1. The interdependence of thrombus architecture and agonist movements in the gaps

between platelets. *Blood* vol. 124,11 (2014): 1808-15. doi:10.1182/blood-2014-01-550335

WITKO-SARSAT V, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.*, 1996.

WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology*, v. 25, n. 2, p. 92–98, fev. 2016.

YADAV, Ekta et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Prosopis cineraria* based phenolic rich ointment in wound healing. *Biomedicine & pharmacotherapy*. *Biomedecine & pharmacotherapie* vol. 108 (2018): 1572-1583. doi:10.1016/j.biopha.2018.09.180

YAN, Xian-Chun et al. “miR-342-5p Is a Notch Downstream Molecule and Regulates Multiple Angiogenic Pathways Including Notch, Vascular Endothelial Growth Factor and Transforming Growth Factor β Signaling.” *Journal of the American Heart Association* vol. 5,2 e003042. 8 Feb. 2016, doi:10.1161/JAHA.115.003042

YANNAS, I. V.; TZERANIS, D. S.; SO, P. T. C. Regeneration of injured skin and peripheral nerves requires control of wound contraction, not scar formation. *Wound Repair and Regeneration*, v. 25, n. 2, p. 177–191, abr. 2017.

YUAN, S. et al. Structure-affinity relationship of the binding of phenolic acids and their derivatives to bovine serum albumin. *Food Chemistry*, v. 278, n. August 2018, p. 77–83, abr. 2019.

ZAHID, Saba et al. Bi-layered α -tocopherol acetate loaded membranes for potential wound healing and skin regeneration. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* vol. 101 (2019): 438-447. doi:10.1016/j.msec.2019.03.080

ZHAO-FLEMING, H. et al. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on post-surgical complications against the backdrop of the opioid crisis. *Burns & Trauma*, v. 6, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2018.

ZHAO, Jingling et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor influences angiogenesis by regulating the coordinated expression of VEGF and the Ang/Tie system. *PLoS one* vol. 9,3 e92691. 21 Mar. 2014, doi:10.1371/journal.pone.0092691

ZHENMI, Liu et al. "Negative pressure wound therapy for treating foot wounds in people with diabetes mellitus." The Cochrane database of systematic reviews vol. 10,10 CD010318. 17 Oct. 2018, doi:10.1002/14651858.CD010318.pub3

ZHENG, J. et al. Expression of Basic Fibroblast Growth Factor, Endothelial Mitogenic Activity, and Angiotensin II Type-1 Receptors in the Ovine Placenta during the Third Trimester of Pregnancy¹. *Biology of Reproduction*, v. 56, n. 5, p. 1189–1197, 1997.

ZINDER, Roman et al. "Vitamin A and Wound Healing." *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* vol. 34,6 (2019): 839-849. doi:10.1002/ncp.10420

ZUO, Y.; LU, S. Dermis, acellular dermal matrix, and fibroblasts from different layers of pig skin exhibit different profibrotic characteristics: Evidence from in vivo study. *Oncotarget*, v. 8, n. 14, p. 23613–23627, 2017.

ZHU, Yunxiao et al. Potent laminin-inspired antioxidant regenerative dressing accelerates wound healing in diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 115,26 (2018): 6816-6821. doi:10.1073/pnas.1804262115

14. ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE VILA VELHA



**Universidade Vila Velha
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UVV)
PARECER DO RELATOR**

Parecer Nº. **527-2019**

Pesquisador (a) Responsável: **Thiago de Melo Costa Pereira**

Tipo de Pesquisa: **Pesquisa**

Instituição onde será desenvolvido: **Universidade Vila Velha**

Situação: **APROVADO**

Ao analisar o projeto de pesquisa: “**Avaliação do efeito de extrato vegetal na cicatrização de lesões cutâneas em ratos**”, tendo como pesquisador(a) responsável **Thiago de Melo Costa Pereira** e considero que o projeto se encontra adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem esse Comitê. A duração do projeto é de **20/04/2019 a 20/12/2021**.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO, com uso previsto de material histopatológico de 60 ratos wistar**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão na Universidade Vila Velha.

Vila Velha, 27 de agosto de 2019.

Prof. Moacir Carretta Júnior
Relator da CEUA-UVV.

15. ANEXO B – TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGEM DA PELE



DISSERTATION COPYRIGHT PERMISSION FORM

Title(s) of the Image(s): Terese Winslow LLC owns the copyright to the following image(s):

Title(s) of illustration(s): Anatomy of the skin

Description of the Work: Terese Winslow LLC hereby grants permission to reproduce the above image(s) for use in the work specified:

Dissertation title: Evaluation of the wound healing effect of Virola oleifera (Schott) A. C. Smith in vivo

University: Vila Velha University – (UVV - ES)

Digital object identifier (DOI), if available:

DOI is a unique alphanumeric string assigned by a registration agency (the International DOI Foundation) to identify content and provide a persistent link to its location on the Internet. The publisher assigns a DOI when your article is published and made available electronically.

License Granted: Terese Winslow LLC hereby grants limited, non-exclusive worldwide print and electronic rights only for use in the Work specified. Terese Winslow LLC grants such rights “AS IS” without representation or warranty of any kind and shall have no liability in connection with such license.

Restrictions: Reproduction for use in any other work, derivative works, or by any third party by manual or electronic methods is prohibited. Ownership of original artwork, copyright, and all rights not specifically transferred herein remain the exclusive property of Terese Winslow LLC. Additional license(s) are required for ancillary usage(s).

Credit must be placed adjacent to the image(s) as follows:

For the National Cancer Institute © 2008 Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights

Permission granted to:

Name: Glaucimeire Rocha Carvalho

Email address: glauci_meire21@hotmail.com

Signature Glaucimeire Rocha Carvalho Date 2020.06.26
Glaucimeire Rocha Carvalho

Signature Terese Winslow Date: 2020.06.28 22:30:55 -04'00'
Terese Winslow, CMI, Member Digitally signed by TERESE WINSLOW

Terese Winslow LLC, Medical Illustration
714 South Fairfax Street, Alexandria, Virginia 22314
(703) 836-9121
terese@teresewinslow.com
www.teresewinslow.com