

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**POMADA DE *Padina gymnospora* ACELERA O PROCESSO DE
CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM RATOS *Wistar***

LAINERLANI SIMOURA DE ALMEIDA

VILA VELHA
AGOSTO/2019

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**POMADA DE *Padina gymnospora* ACELERA O PROCESSO DE
CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM RATOS *Wistar***

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

LAINERLANI SIMOURA DE ALMEIDA

VILA VELHA

AGOSTO/2019

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

A447p Almeida, Lainerlani Simoura de.
Pomada de *Padina gymnospora* acelera o processo de cicatrização cutânea em ratos *Wistar* / Lainerlani Simoura de Almeida – 2019.
25 f. : il.

Orientadora: Girlandia Alexandre Brasil.
Coorientador: Márcio Fronza.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Vila Velha, 2019.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Estresse oxidativo.
3. Cicatrização de ferimentos. I. Girlandia, Alexandre Brasil.
II. Fronza, Mário. III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 615

LAINERLANI SIMOURA DE ALMEIDA

Pomada de *Padina gymnospora* acelera o processo de cicatrização cutânea em ratos wistar

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

Aprovado (a) em 30 de agosto de 2019,

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Simone Alves de Almeida (Multivix)

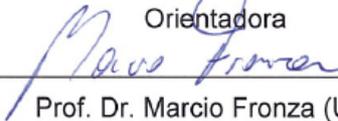


Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade (UVV)



Profa. Dra. Girlandia Alexandre Brasil (UVV)

Orientadora



Prof. Dr. Marcio Fronza (UVV)

Coorientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que sempre esteve ao meu lado me dando forças para seguir em frente, mesmo quando os obstáculos pareciam intransponíveis, eu sempre pude confiar.

Agradeço à minha mãe, Mercedes (*in memoriam*), por seu amor incondicional e por me ensinar a trilhar o caminho certo, dizendo que nunca devemos nos cansar de fazer o bem.

Agradeço à minha irmã, Laudilena, ao meu cunhado, Valdelino, e aos meus sobrinhos, Jean e Luanne, que sempre me apoiaram, me incentivando e principalmente me dando uma família.

Aos meus filhos que, mesmo pequenos, participaram da execução deste projeto estando ao meu lado me dando amor.

À minha orientadora, Professora Doutora Girlandia Alexandre Brasil, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo incentivo, sempre disposta a me atender sem restrição de tempo e me fazendo acreditar que tudo daria certo.

Ao Professor Doutor Marcio Fronza, que me ajudou durante toda a execução deste projeto, me atendendo e tirando minhas dúvidas sempre que precisei.

Aos alunos de iniciação científica, sempre serei grata pelo carinho e pela ajuda nos experimentos. E fica minha gratidão por todos os membros do laboratório de produtos naturais.

Agradeço à Lucienne Bessoni Oliveira e à Viviane Coutinho Meneguzzi, do laboratório de histologia da UFES, que, com tanta paciência e simpatia me ensinaram a preparar as lâminas histológicas. Admiro vocês por tanta dedicação e profissionalismo no trabalho.

Agradeço também ao professor Márcio Guidoni que, mesmo morando em Colatina, se dispôs a ensinar a execução do ensaio da MPO e da NAG.

Agradeço aos professores que trabalham comigo, que são tão importantes na minha vida, considero vocês como minha família. E também a todos os professores que participaram da minha vida acadêmica e da minha formação como mestre.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
Capítulo I.....	7
1.Introdução.....	9
2 Materiais e métodos.....	11
3 Resultados.....	14
4 Discussão.....	19
5 Conclusão.....	23
6 Referências.....	23

RESUMO

DE ALMEIDA, Lainerlani Simoura. M.Sc. Universidade de Vila Velha, ES. Agosto de 2019. **Pomada de *Padina gymnospora* acelera o processo de cicatrização cutânea em ratos wistar.** Orientadora: Profa. Dra. Girlandia Alexandre Brasil. Coorientador: Prof. Dr. Márcio Fronza.

As algas marinhas são ricas em ácidos graxos e polifenóis que possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, promovendo o reparo de lesões. Poucas são as alternativas para o tratamento de lesões cutâneas, especialmente no que diz respeito à melhora no aspecto global da lesão. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da pomada de *Padina* na cicatrização de feridas cutâneas *in vivo*. Ao todo, 52 animais tiveram o dorso tricotomizado e quatro feridas foram feitas na pele de cada animal usando um punch de 15 mm. Na sequência, os animais foram tratados topicamente com pomada de *Padina* a 25% (Grupo P; n = 20); controle Lanovaselina com sal (Grupo LS; n = 20) ou controle Lanovaselina sem sal (Grupo L; n = 12). Todos os animais foram tratados diariamente logo após a lesão. Após 3, 7, 14 e 21 dias da cirurgia, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico (n = 5/grupo) e as feridas foram fotografadas para a determinação das taxas de fechamento. As feridas foram excisadas e armazenadas a -80°C ou em tampão formalina para as análises bioquímicas e histológicas, respectivamente. Para a análise histológica, as lâminas foram desidratadas, fixadas e coradas com hematoxilina/eosina (H/E) ou Picrosirius red e analisadas em microscópio óptico. As lâminas foram fotomicrografadas e posteriormente analisadas utilizando o software Image J® para determinação da deposição de colágeno e análise do infiltrado inflamatório. Os tecidos congelados foram homogenizados e a atividade da Mieloperoxidase (MPO) e da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) foram determinadas utilizando técnica colorimétrica. O tratamento com *Padina* evidenciou maior retração da ferida nos dias 3 e 7 quando comparado ao grupo lanovaselina sem sal. Na quantificação do colágeno foi observada a redução na deposição do colágeno após 7 dias de tratamento com *Padina*. O resultado do infiltrado inflamatório revelou que o tratamento com *Padina* foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório nos dias 3, 7 e 14 da indução da lesão. Esses resultados foram acompanhados de redução na atividade de MPO após 7 dias e de NAG após 7 e 14 dias do tratamento com *Padina* quando comparado ao grupo lanovaselina sem sal. Deste modo, podemos concluir que o tratamento com *Padina* acelerou o processo de cicatrização *in vivo*, e que essa atividade pode ser atribuída, pelo menos em parte, à redução na resposta inflamatória tecidual.

PALAVRAS-CHAVE: Cicatrização. Inflamação. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

DE ALMEIDA, Lainerlani Simoura. M.Sc. Universidade de Vila Velha, ES. August 2019. **Chronic treatment with methanolic extract of *Padina gymnospora* promotes accelerated healing *in vivo* by anti-inflammatory mechanism.** Supervisor: Prof. Dr. Girlandia Alexandre Brasil. Co-Supervisor: Prof. Dr. Márcio Fronza

Seaweed is rich in fatty acids and polyphenols that have antioxidant and anti-inflammatory properties, promoting injury repair. There are but few alternatives for the treatment of skin lesions, especially regarding the improvement of the global aspect of the lesion. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of *Padina* ointment on wound healing *in vivo*. In all, 52 animals were trichotomized on the back and four wounds were made on the skin of each animal using a 15 mm punch. Following, the animals were treated topically with *P. gymnospora* ointment at 25% (Group P; n=20); Salted lanovaselin (Group LS; n=20) or Unsalted lanovaselin (Group L; n=12). All animals were treated daily. At 3, 7, 14 and 21 days after surgery, the animals were euthanized with an overdose of anesthetic (n=5/group) and the wounds were photographed to determine closure rates. The wounds were excised and stored at -80 °C or in a formalin buffer for histological and biochemical analysis, respectively. For the histological analysis, slides were dehydrated, fixed and stained with hematoxylin / eosin (H / E) or Picrosirius red and analyzed under an optical microscope. The slides were photomicrographed and subsequently analyzed using Image J® software for the determination of collagen deposition and for the analysis of the inflammatory infiltrate. Frozen tissues were homogenized and myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl- β -D-glycosaminidase (NAG) activity were determined using colorimetric technique. The treatment with *Padina* evidenced greater wound retraction on days 3 and 7 when compared to the Unsalted lanovaselin group. Collagen quantification showed a reduction in collagen deposition after 7 days of treatment with *Padina*. The result of the inflammatory infiltrate revealed that the treatment was able to reduce the inflammatory infiltrate on days 3, 7 and 14 of lesion induction. These results were accompanied by a reduction in MPO activity after 7 days of treatment, and of NAG after 7 and 14 days of treatment with *Padina* when compared to the Unsalted lanovaselin group. Thus, we can conclude that the treatment with *Padina* accelerated the healing process *in vivo*, and that this activity may be attributed, at least in part, to the reduction in the inflammatory tissue response.

KEYWORDS: Wound healing; Inflammation; Oxidative stress

Capítulo 1

Manuscrito escrito conforme normas da revista *Saudi Journal of Pharmaceutical Sciences*

Pomada de *Padina gymnospora* acelera o processo de cicatrização cutânea em ratos wistar

Lainerlani Simoura de Almeida¹; Marcio Guidoni¹; Karynna Dutra¹; Denise Coutinho Endringer¹; Marcio Fronza^{1†}; Girlandia Alexandre Brasil^{1*†}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha – UVV.

† Contribuição equivalente

* Autor de Correspondência:

Dra. Girlandia Alexandre Brasil. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Vila Velha – UVV. Av. Comissário José Dantas de Melo, 21. Boa Vista, Vila Velha – ES. CEP: 29102-920. Telefone: +55273421-2000. E-mail: girlandia.brasil@uvv.br

Resumo

As algas marinhas são ricas em ácidos graxos e polifenóis, substâncias que apresentam efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Dentre as espécies, as algas marrons se destacam como a *Padina gymnospora* (Padina). Poucos são os fármacos utilizados para a cicatrização de feridas, e estudos prévios mostram que a Padina possui potencial cicatrizante. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade cicatrizante da Padina e os mecanismos envolvidos. Para tanto, o extrato metanólico foi preparado e o sal foi quantificado. Após pronto, o extrato foi incorporado à pomada de lanovaselina. Ratos *Wistar* machos com 2 meses de idade foram separados em três grupos: Controle (L) recebeu a lanovaselina (n = 12); Controle com Sal (LS; n = 20), recebeu a lanovaselina com a concentração de sal da pomada de Padina; Padina (P; n = 20), recebeu a pomada de lanovaselina com Padina (25%). Os animais foram tricotomizados e foi realizada uma ferida com um punch metálico e todos os tratamentos foram feitos diariamente. Os animais foram eutanasiados após 3, 7, 14 e 21 dias da indução da lesão. As lesões foram fotomicrografadas e uma biopsia da área da lesão foi retirada para análise histológica do infiltrado inflamatório, quantificação de colágeno e determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG). Observou-se maior retração da lesão dos animais tratados com Padina após 7 e 14 dias e esse resultado foi acompanhado de redução no número de infiltrado inflamatório tecidual e menor atividade das enzimas MPO (7 dias) e NAG (7 e 14 dias). Com relação à colagênese, o extrato reduziu a

deposição de colágeno após 7 dias. Pode-se concluir que a Padina promoveu melhora na cicatrização das feridas dos animais por meio de sua ação anti-inflamatória, que pode ser atribuída à composição química da alga.

Palavras-chave: Algas, Cicatriz, Inflamação.

1 Introdução

A pele é um órgão fundamental na defesa e proteção do corpo contra danos externos, sendo a primeira linha de defesa do organismo (GUNES et al., 2017). Quando a mesma sofre alguma lesão, o organismo trabalha para reparar o dano, promovendo de forma imediata uma resposta ao agente agressor, impedindo assim que a mesma fique exposta a agentes físicos e biológicos (LANDÉN, STAHL, 2016).

A pele é reparada por meio do processo de cicatrização, o qual apresenta três fases – inflamação, formação de novo tecido e remodelamento, sendo que cada uma das fases se sobrepõe entre si (EPSTEIN, 1999). A inflamação é caracterizada pelo influxo de polimorfonucleares, onde as principais células são os neutrófilos e os macrófagos. No primeiro momento logo após a lesão os vasos sanguíneos se contraem para diminuir o extravasamento de sangue, ocorrendo agregação de plaquetas e formação de coágulo, seguido pela vasodilatação (HART, 2002). Sinais celulares são liberados promovendo convocação de leucócitos aquele tecido, dentre essas células os neutrófilos desempenharão papel importante, pois eles agem como a primeira linha de defesa, levando à degradação dos agentes infecciosos e à retirada de tecido necrótico (REIKE et al., 2012; HARDING, MORRIS, PATEL, 2002). O principal estímulo para a atração dos leucócitos ao tecido cicatricial é a liberação de citocinas e quimiocinas, como a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o fator de crescimento transformador-beta (TGF- β) entre outros (BROUGHTON, JANIS, ATTINGER, 2006).

À medida que o processo cicatricial vai avançando o número de neutrófilos diminui enquanto o número de macrófagos aumenta (MEYERS, HUDSON, 2013). Essas células secretam proteases e fagocitam detritos presentes na ferida, além de promoverem a síntese e liberação de citocinas e fatores de crescimento. Essas substâncias têm papel importante no recrutamento e ativação celular, síntese da matriz

extracelular, a angiogênese e remodelamento tecidual (EMING, KRIEG, DAVIDSON, 2007).

Após a fase inflamatória, inicia-se o processo de proliferação, fase que ocorre a formação do tecido de granulação caracterizado pela formação da nova matriz extracelular, angiogênese e reepitelização, os macrófagos, queratinócitos e fibroblastos são as células mais atuantes nesta fase (HARDING, MORRIS, PATEL, 2002). O tecido de granulação preenche a ferida começando da porção basal até a apical preparando o organismo para a fase de remodelamento (MEYERS, HUDSON 2013).

A última fase da cicatrização é a fase de remodelamento que promove a cura da ferida, onde os macrófagos e fibroblastos são as células mais atuantes. O processo é caracterizado pela substituição do colágeno tipo III, pelo colágeno tipo I, que por ser mais espesso têm por função aumentar a força tênsil da ferida (CAMPOS, BORGES-BRANCO, GROTH, 2007). Durante esta fase, ocorre a eliminação das células inflamatórias remanescentes, pelo processo de apoptose, levando assim, ao fechamento completo da ferida (MEYERS, HUDSON, 2013; HARDING, MORRIS, PATEL, 2002).

O processo adequado de cicatrização de feridas depende da proliferação e migração das células, portanto produtos naturais que possuem compostos que auxiliam a migração de fibroblastos pode beneficiar o processo de cicatrização de feridas cutâneas (SYARINA et al., 2015).

Com isso, o uso de produtos naturais se torna importante, já que para milhões de pessoas os tratamentos tradicionais são a única alternativa para os cuidados com a saúde, e que por isso tais produtos precisam de qualidade comprovada, bem como que seja assegurado o acesso a todos (WHO, 2013).

Nesse sentido, o bioma marinho é uma alternativa importante, por possuir espécies ricas, do ponto de vista químico e por existirem poucos estudos sobre as suas propriedades biológicas (PANDE et al., 2018). Há de se destacar que as algas são ricas em carotenoides e ácidos graxos e que os efeitos antioxidante e anti-inflamatório podem ser atribuídos a essas substâncias (BALIANO et al., 2016; MIRANDA et al, 1998). Desse modo, estudos prévios demonstraram a capacidade cicatricial das algas (MIRANDA et al, 1998; SYARINA et al., 2015; BALIANO et al., 2016).

Dentre as algas presentes, a espécie *Padina gymnospora* (Padina) se destaca por sua composição química rica em flavonoides, taninos (Polifenóis) e ácidos graxos (PANDE et al., 2018; BALIANO et al., 2016). Em estudo prévio *in vitro*, foi demonstrado que o extrato metanólico de Padina possui potencial cicatrizante por mecanismos que envolvem a inibição da síntese de óxido nítrico e ação anti-inflamatória (BALIANO et al., 2016). Entretanto, até o presente momento não foi realizado estudo *in vivo* avaliando as propriedades cicatrizantes dessa espécie de alga.

Desse modo, a hipótese do presente estudo é que o tratamento com a Padina promoverá a aceleração do processo cicatricial, por meio da redução da inflamação tecidual.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da pomada Padina 25% na cicatrização de feridas *in vivo* e determinar a ação do tratamento sobre a retração da ferida e deposição de colágeno, bem como as propriedades anti-inflamatórias.

2 Materiais e métodos

Coleta da alga e obtenção do extrato

A alga foi coletada na praia de Manguinhos, município da Serra- ES (-20.188062, -40.190528). O material foi identificado pelo botânico Dr. Levi Pompermayer Machado, uma exsicata foi preparada e tombada no herbário da Universidade Federal do Espírito Santo pelo Dr. Diógia Barata sob o número VIES 36052.

Após a coleta do material, as algas foram limpas e congeladas a -80°C e em seguida liofilizadas. O material seco foi então pulverizado em moinho de facas, e submetido ao processo de extração por maceração assistida com ultrassom utilizando metanol (96°GL) como solvente. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório (40°C; 100 rpm) até a obtenção do resíduo. O extrato da alga teve a quantidade de sódio determinada utilizando fotômetro de chamas (Tommasi analítica).

Formulação da pomada para tratamento

O extrato bruto obtido foi então incorporado em lanovaselina na proporção de 7:3 de vaselina líquida e lanolina (Farmax, Divinópolis, Minas Gerais; Lansinoh, Diadema, São Paulo). A pomada obtida foi preparada na concentração de 25% de extrato de Padina (GRAMMA et al., 2016).

Animais experimentais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*) com idade entre 2 e 3 meses e peso variando entre 250-300g. Os animais foram fornecidos pelo Laboratório de Acompanhamento Experimental do Complexo Biopráticas – UVV e mantidos em gaiolas individuais com controle de umidade e temperatura, ciclo claro-escuro de 12h e acesso à água e comida *ad libitum* (ração padrão para biotério. Probiotério, Moinho Primor, S.A.). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Vila Velha (CEUA-UVV) sob o número 459/2017.

Indução da ferida e tratamento

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina e Xilasina (80 e 15 mg/kg, respectivamente) intraperitoneal. Após anestesia profunda, os animais tiveram seu dorso tricotomizado e limpo com álcool 70%, e quatro feridas foram realizadas utilizando um *punch* histológico de 15 mm, atingindo a região da dermo-epiderme. Os animais foram então separados em três grupos de tratamento, o grupo controle (L, n=12) que teve as feridas tratadas com o veículo (lanovaselina); o grupo controle com sal (LS, n=20) que teve a ferida tratada com o veículo lanovaselina acrescida de cloreto de sódio em concentração semelhante a encontrada na pomada de Padina (2260,00 mg/kg) e por fim o grupo Padina (P, n=20) que recebeu a pomada com o extrato de Padina (25%) (GRAMMA et al., 2016). O tratamento foi iniciado logo após a indução da ferida e foi realizado diariamente por 3, 7, 14 e 21 dias de tratamento. Foi aplicado quantidade suficiente da pomada para cobrir a ferida completamente.

Análise da retração da lesão

A eutanásia foi realizada após 3, 7, 14 e 21 dias da indução da lesão (GRAMMA et al., 2016). Para a avaliação da reepitelização as quatro úlceras foram fotografadas no dia da realização da ferida e após as eutanásias. Para tanto foi utilizada uma câmera digital (câmera Sony DSC-HX1, Digital Still Câmera, Japão). A medida da área das lesões foi quantificada utilizando o software livre Image J® (*National Institutes of Health – NIH*, Bethesda, Maryland, EUA) e expressa em mm².

Análise histológica

Os animais foram eutanasiados nos dias 3, 7, 14 e 21 com uma superdose de Tiopental (240 mg/kg). A lesão superior direita foi coletada por biópsia e fixada em formaldeído tamponado a 10%. Após o processamento das amostras e a inclusão de parafina os cortes foram feitos em seções de 5 µm. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e/ou Picrossirius red e analisadas em microscópio óptico

LEICA DM500 e (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça) no aumento de 400x para quantificação do infiltrado inflamatório e da colagênese, respectivamente. Ao todo, 6 fotografias foram obtidas de cada lâmina.

Avaliação quantitativa por imagem do infiltrado inflamatório

As amostras previamente preparadas, foram coradas com H&E e fotomicrografadas no sentido derme superficial e derme profunda (6 imagens por lâmina). As imagens foram então analisadas usando o programa Image J[®] (NIH, EUA) (Noursadeghi et al., 2008) utilizando o *Plugin "Cell Counter"*. Nessas imagens foram avaliados o infiltrado inflamatório, obtido pela contagem do número de células inflamatórias em cada lâmina. O infiltrado inflamatório foi representado pela média final do número total de células de cada lâmina dos diferentes grupos e tempos de tratamento (GRAMMA et al., 2016).

Avaliação de colagênese por imagem

Após o processamento, as amostras foram coradas com *picrossirius red* e imagens foram capturadas no sentido derme superficial e derme profunda. A análise morfométrica correspondente à área ocupada pelas fibras e foi determinada por reconhecimento digital de densitometria e expressa como percentagem da área total do campo utilizando Software Image J[®] (*National Institutes of Health – NIH*, Bethesda, Maryland, EUA). A decomposição da imagem foi feita utilizando o *Plugin "Colour Deconvolution"* e quantificada aplicando o *Plugin "Threshold color"* (ANDRADE et al., 2011).

Análise da atividade da mieloperoxidase

A dosagem da mieloperoxidase (MPO) foi determinada conforme descrito por Gramma et al., 2016. Resumidamente 100 mg de tecido foi homogeneizado em tampão fosfato (0,02M) e separado por centrifugação (15 minutos, 3000 rpm, 4° C), o precipitado foi coletado e adicionado a solução de lise (NaCl 2%), novamente homogeneizado e centrifugado, ao precipitado foi adicionado o tampão fosfato:H-TAB (0,05M) e após nova homogeneização o sobrenadante foi armazenado. Para o ensaio o sobrenadante foi adicionado à solução tampão do ensaio (NaPO₄ 0,08M), e misturado ao 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; (Sigma Chemical Company – St. Louis, MO, EUA), H₂O₂ e H₂SO₄ (100 e 75µL, respectivamente), seguido de aquecimento em estufa. A leitura foi realizada à 450nm em leitor de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices). Os resultados foram expressos

em número de neutrófilos $\times 10^3/\text{mg}$ de tecido, através de uma curva padrão relacionando o número de neutrófilos com a absorbância do homogenato (MORENO et al., 2006).

Atividade enzimática da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)

O ensaio da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), foi realizado conforme descrito por Negrão et al., 2010. Em resumo, as amostras de pele (100 mg) previamente homogeneizadas (3 μ L) foram misturadas ao tampão de reação (22 μ L; Brometo de hexadeciltrimetilamônio, NaPO₄ 0,05M), a solução de 2,2 mM de NAG (30 μ L; p-nitrophenyl-2-acetamide- β -D-glucopiranoside) e 50 μ L de tampão de citrato (50 mM, pH 4,5), a mistura foi incubada por 60 minutos a 37°C. A leitura foi realizada em 400nm em leitor de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices) sendo os resultados expressos em atividade de NAG/mg de tecido (Absorbância 400 nm/ml de cada amostra).

Análise estatística

Os resultados tiveram a normalidade avaliada por meio do teste de Shapiro-wilk. Os resultados foram analisados por meio de análise de variância de duas vias (ANOVA), seguido pelo teste *post hoc* de Tukey, sendo considerados diferentes os quando $p < 0,05$.

3 Resultados

Determinação da retração da ferida

O tratamento crônico com a pomada de Padina promoveu aceleração significativa no processo de cicatrização após 3 (P:67,67 \pm 2,61) e 7 (P:36,49 \pm 2,98) dias, quando comparado ao grupo controle L e LS (3 dias L: 73,85 \pm 1,05 e 7 dias L: 45,77 \pm 1,77) ($p < 0,05$). Além disso, foi possível observar que o sal adicionado à pomada proporcionou um retardo no processo de cicatrização após 3 dias (LS:85,56 \pm 2,58) quando comparado a L ($p < 0,05$). Esse efeito não foi observado nos demais tempos de avaliação do processo de reparo tecidual cutâneo ($p > 0,05$) (Figura 1).

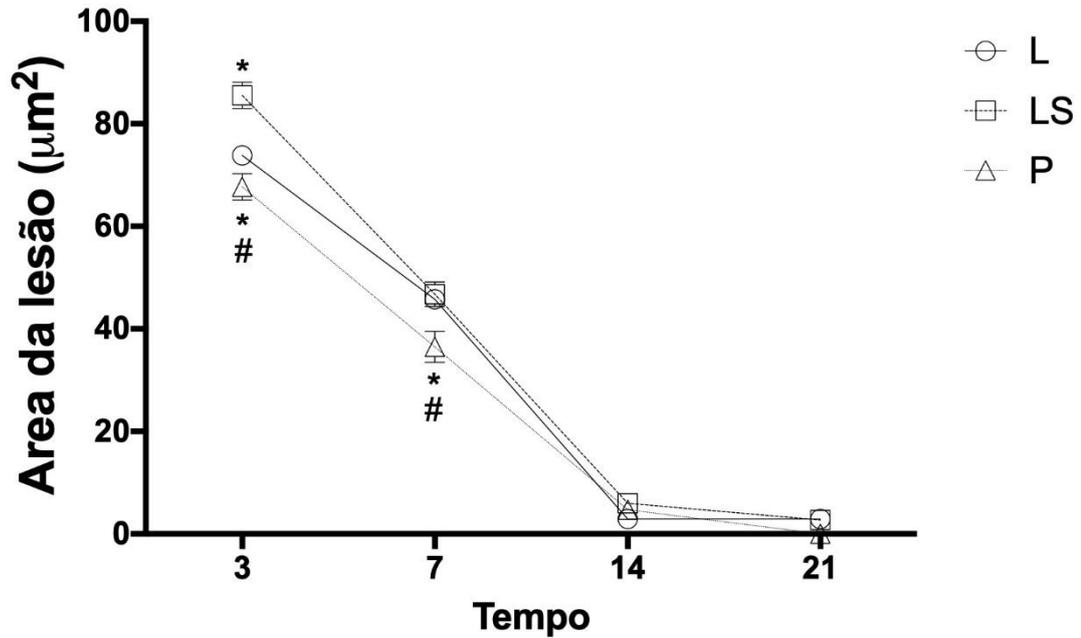


Figura 1. A aplicação tópica da pomada de Padina a 25% (P) promove aceleração no processo de cicatrização nos dias 3 e 7 pós tratamento e o controle tratado com lanovaselina acrescido de sal (LS), promove retardo da cicatrização no dia 3 pós tratamento. Os dados são apresentados como média± erro padrão da média. * $p < 0.05$ comparado a L e # $p < 0.05$ comparado a LS; Resultados analisados por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A retração das feridas é melhor visualizada na Figura 2, onde estão as imagens representativas das lesões após 3, 7, 14 e 21 dias de tratamento.



Figura 2. Imagens representativas das lesões dos animais após as biópsias. Tratamentos realizados com Padina (P), Lanovaselina (L) e lanovaselina com sal (LS). As eutanásias foram realizadas após 3, 7, 14 e 21 dias da indução das lesões e início dos tratamentos.

Avaliação do infiltrado inflamatório

O resultado da densidade celular de células inflamatórias totais no tecido da lesão foi avaliado por meio da análise histológica das biópsias das feridas coradas com (H&E) e estão apresentados na Figura 3. Observa-se que o tratamento com Padina foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório após 3, 7 e 14 dias da indução da lesão quando comparado aos grupos L e LS ($p < 0,05$). O tratamento com lanovaselina acrescida do sal residual presente no extrato seco da Padina não alterou significativamente o infiltrado inflamatório nos animais, apresentando resultados comparáveis ao grupo controle (L).

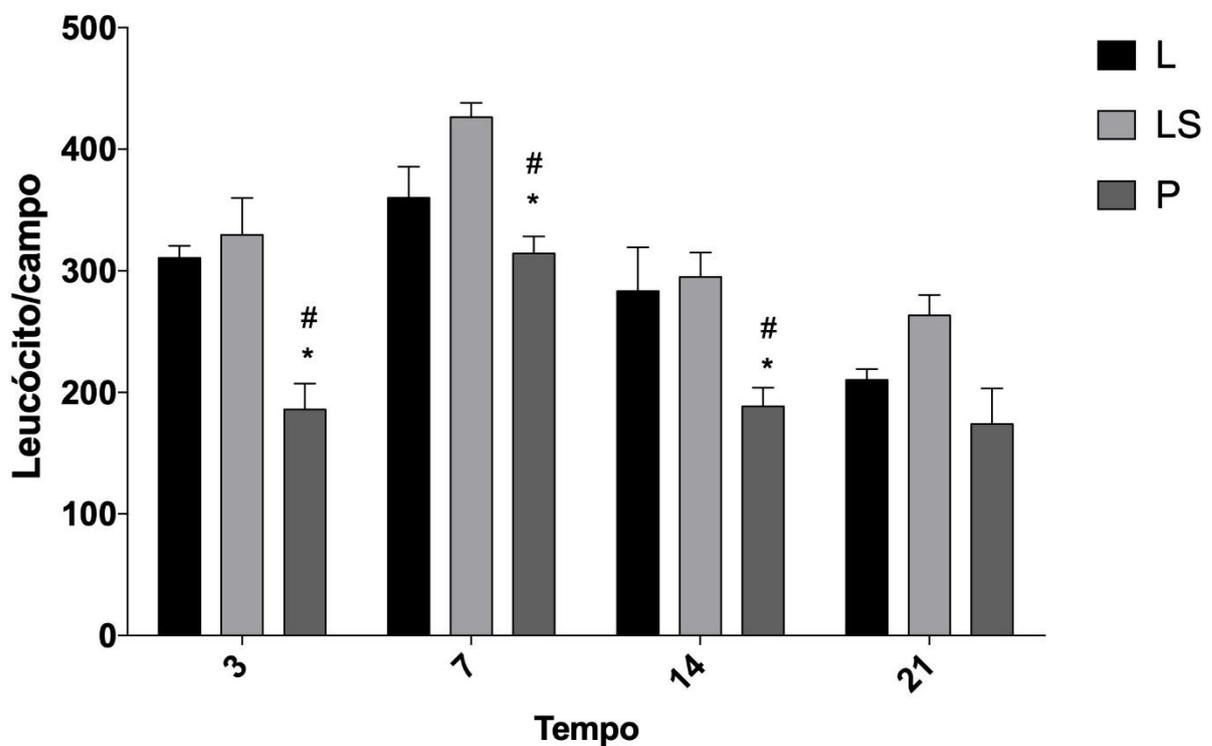


Figura 3. Determinação do infiltrado inflamatório após o tratamento com pomada de Padina. Redução no infiltrado inflamatório após 3, 7 e 14 dias do tratamento com pomada de Padina a 25% (P) e os controles tratados apenas com lanovaselina (L) ou lanovaselina acrescida de sal (LS). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado a L; # $p < 0,05$ comparado com LS. Resultados analisados por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

Determinação da colagênese

A determinação da deposição de colágeno foi realizada por meio de análise de densitometria óptica das lâminas histológicas coradas com picrossirius red. O

tratamento com Padina promoveu redução na deposição de colágeno após 7 dias da indução da lesão quando comparado com os grupos L e LS.

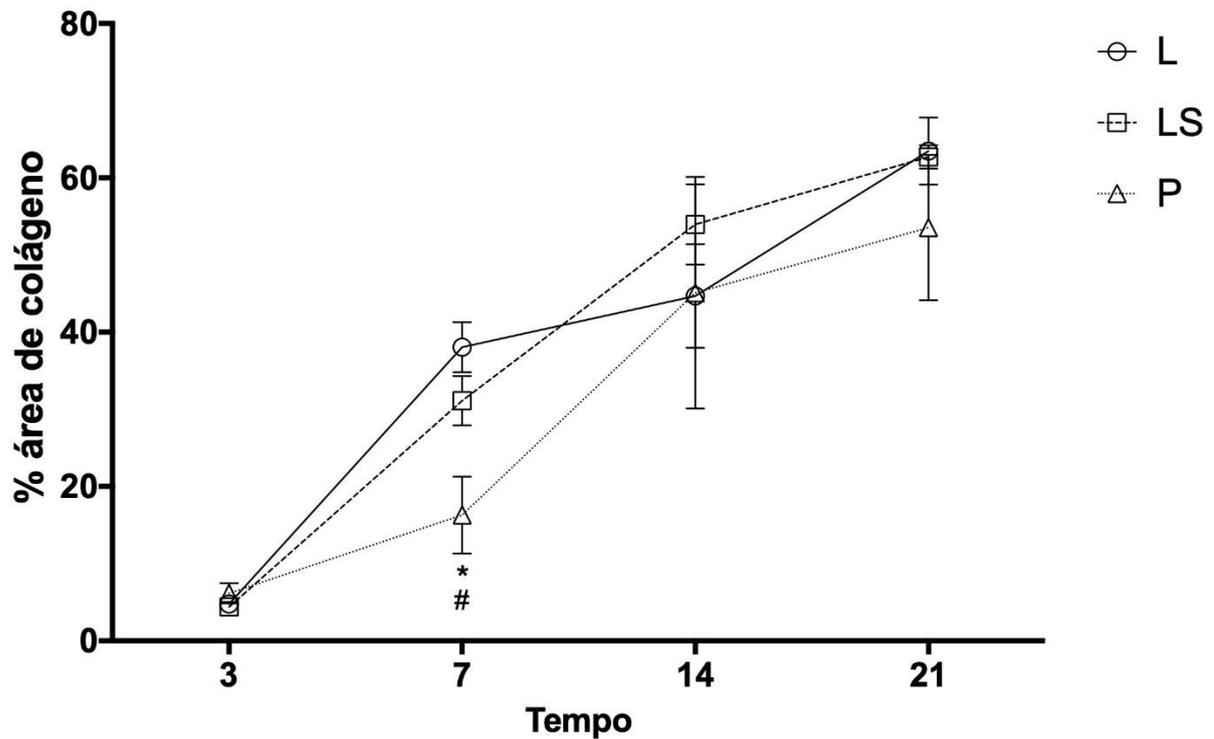


Figura 4. Efeitos do tratamento crônico com Padina (P) e lanovaselina acrescida (LS) ou não de sal (L) no conteúdo de colágeno no tecido da ferida, biópsias nos dias 3, 7, 14 e 21 após a lesão. Conteúdo de colágeno determinado por densitometria digital usando o software Image J®. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado a L; # $p < 0,05$ comparado com LS; Resultados analisados por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

Análise da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A presença de neutrófilos foi determinada através da atividade da MPO nas biópsias realizadas nos dias 3, 7, 14 e 21. O tratamento foi capaz de promover redução na atividade da MPO após 7 dias de tratamento quando comparado com os grupo L e LS nos dias 3, 7, 14 e 21 pós-tratamento.

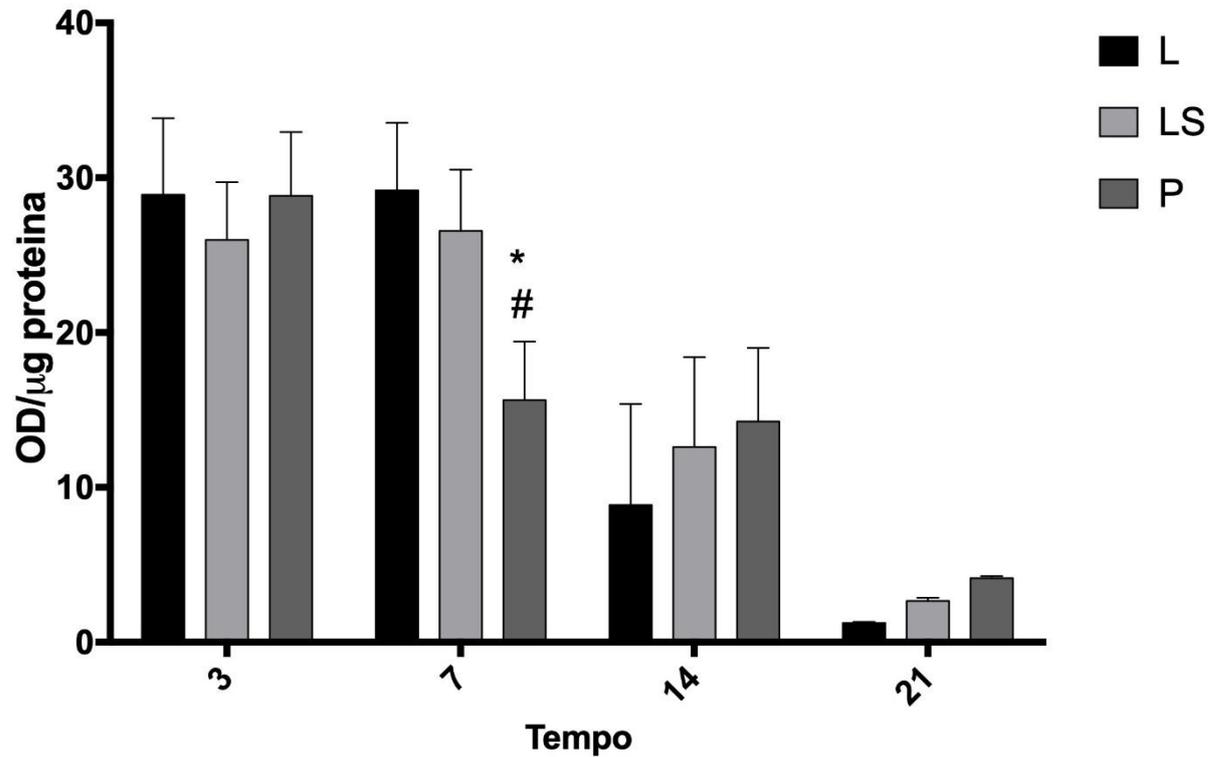


Figura 5. Acúmulo de neutrófilos teciduais determinados pela mieloperoxidase (MPO). Redução da atividade da MPO no 7 dia de tratamento com pomada de Padina (P). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. * $p < 0.05$ comparado a L; # $p < 0,05$ comparado com LS; Resultados analisados por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

Atividade enzimática da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

A quantificação da enzima NAG, expressa em macrófagos ativos serve como marcador da inflamação. Foi observada a redução na atividade da enzima após 7 e 14 dias do tratamento quando comparados com os grupos L e LS.

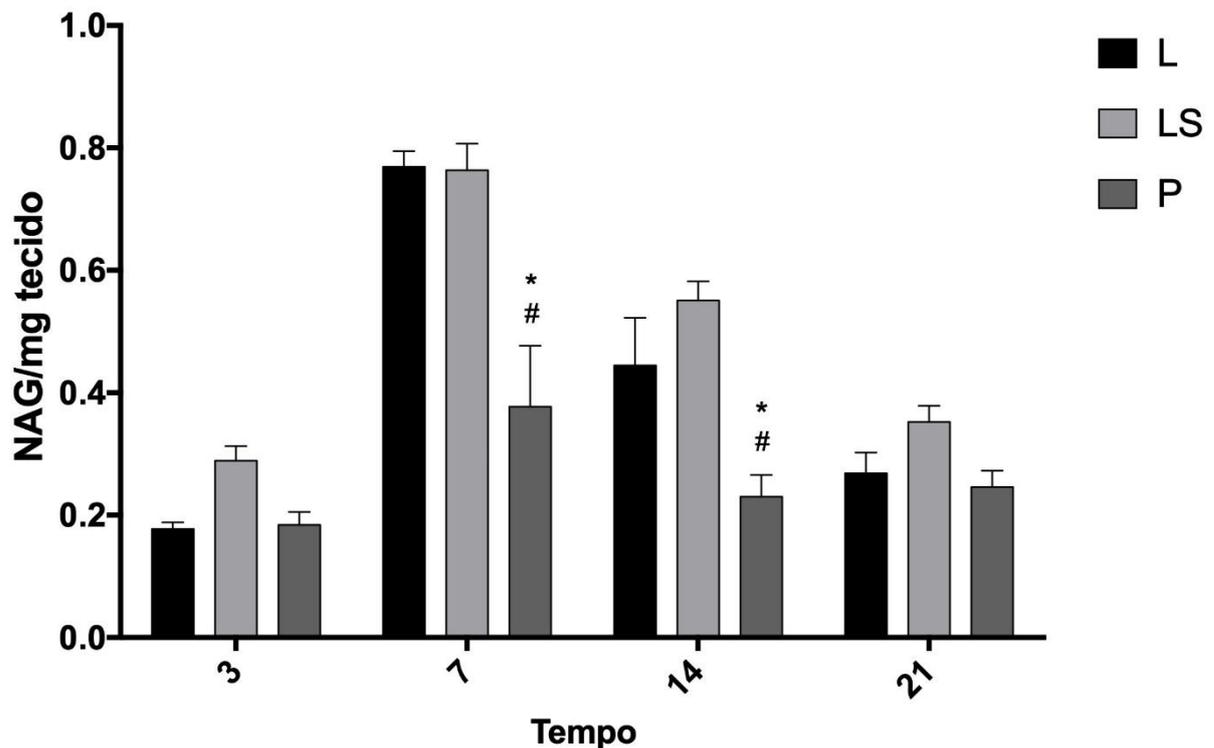


Figura 6. Acúmulo de macrófagos teciduais determinados pela Atividade enzimática da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG). Redução da atividade da NAG no 7 e 14 dias de tratamento com pomada de Padina (P). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$ comparado a L; # $p < 0,05$ comparado com LS. Resultados analisados por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

4 Discussão

O principal achado do presente estudo foi que o tratamento com a Padina é capaz de acelerar a cicatrização das feridas cutâneas em ratos wistar por mecanismos que envolvem a redução do processo inflamatório na lesão no 3, 7 e 14 dias pós tratamento.

Observou-se melhora na retração da lesão após 3 e 7 dias do tratamento com Padina, quando comparado ao grupo controle. Estudo prévio realizado por Baliano e colaboradores (2016) sugerem que a alga *P. gymnospora* poderia promover melhora na cicatrização de feridas, utilizando modelo experimental *in vitro*, em cultura de células, no qual foi observado que o extrato da Padina estimula a proliferação e migração de fibroblastos, contribuindo ao processo de reepitelização, o que corrobora com a redução da área da lesão observada neste trabalho. O estudo de Baliano e colaboradores (2016) ainda demonstrou a inibição da produção de óxido nítrico, indicando possível efeito anti-inflamatório para a Padina.

A presença de microorganismos em lesões cutâneas interfere no processo de cicatrização por aumentar a fase inflamatória, seja pela presença *in situ* das bactérias ou mesmo por liberação de suas endotoxinas, no tecido (SERRA et al., 2017). O efeito antimicrobiano demonstrado no estudo de Baliano e colaboradores (2016) pode ter contribuído para o fechamento da ferida. Nosso estudo, portanto, confirma o resultado de Baliano e colaboradores (2016), agora utilizando animais experimentais.

A justificativa para o resultado do presente estudo é a composição química da alga, rica em compostos antioxidantes e antiinflamatórios, como polifenóis e ácidos graxos (GUNES et al., 2012; BALIANO et al., 2016). Baliano e colaboradores (2016) relataram a presença de onze compostos orgânicos no extrato metanólico de *P. gymnospora* entre eles os ácidos oleico, linolênico, linoleico e araquidônico. Sabe-se que esses compostos estão presentes nas membranas biológicas, logo, o fornecimento desses ácidos facilitaria o processo de cicatrização. Ademais, sabe-se que eles podem interferir em processos intracelulares, sendo utilizados como fonte de energia, além de reduzirem a inflamação, por alterarem a via de formação de prostaglandinas pelo ácido araquidônico (HATANAKA, CURI, 2007; FERREIRA et al., 2012).

Além da presença dos ácidos graxos, o gênero *Padina* possui em sua composição outras substâncias químicas, como polifenóis e flavonoides (AL-ENAZI et al., 2018). Sabe-se que essas substâncias promovem a redução do estresse oxidativo, e ainda, são capazes de reduzir a inflamação tecidual.

A ação antioxidante desses compostos se dá por duas vias principais, eles podem agir diretamente sobre as espécies reativas de oxigênio (ROS) presentes nos tecidos, ou ainda, ativar fatores de transcrição como o fator nuclear relacionado ao eritroide 2 (NRF2) que geram o aumento da transcrição de genes relacionados com a formação de enzimas antioxidantes, bem como anti-inflamatórias (GARZÓN-CASTAÑO et al., 2018).

Dessa forma, sabe-se que os polifenóis agem como anti-inflamatórios, pois impedem o dano tecidual causado pelas ROS, o que reduz a ativação dos linfócitos e conseqüentemente há redução na inflamação tecidual. Adicionalmente, há a transcrição de genes que são anti-inflamatórios, levando a produção de citocinas anti-inflamatórias e promovendo a melhora global da lesão (AL-ENAZI et al., 2018; GARZÓN-CASTAÑO et al., 2018). Além dessa característica, os flavonoides também possuem efeito antimicrobiano, o que, no processo de cicatrização, é extremamente importante, já que atrapalham o processo cicatricial. Ademais, os flavonoides

favorecem a retração da ferida e aumentam a taxa de epitelização (PANIGRAHI et al., 2011).

No presente estudo foi possível observar redução no processo inflamatório, demonstrado pela redução no infiltrado inflamatório e na atividade das enzimas MPO e NAG, que indicam indiretamente a atividade dos neutrófilos e macrófagos presentes na lesão.

Através do ensaio da MPO foi evidenciada a ação da Padina na redução do recrutamento dos neutrófilos no sétimo dia de tratamento. Os neutrófilos agem no processo inflamatório no controle da infecção por patógenos e remoção de substâncias indesejáveis. No entanto podem causar dano tecidual (ANDRADE et. al., 2011). Eles produzem enzimas hidrolíticas e proteínas bactericidas como a MPO, espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (ANDRADE et. al., 2011). O aumento do número de neutrófilos e o aumento da concentração de ROS pode levar a graves consequências, entre elas a diminuição do processo de cicatrização devido a danos nas membranas celulares, transformação neoplásica, DNA, proteínas e lipídios (VITTORAZZI et al., 2015). A enzima NAG avaliada no presente estudo demonstrou menor atividade no grupo tratado com extrato de Padina no sétimo e décimo quarto dia. Fato importante já que a NAG é uma enzima lisossômica altamente expressa em macrófagos ativados, sendo um importante marcador inflamatório (COSTA et al, 2013). Sendo assim o ensaio da MPO e da NAG serve como importante marcador inflamatório e, em conjunto, os dados demonstram que houve redução no processo inflamatório. Entretanto no 7 dia de tratamento houve redução do infiltrado inflamatório, MPO e NAG o que demonstra que o efeito anti-inflamatório da pomada de Padina se dá com mais efetividade no 7 dia de tratamento.

Após a fase inflamatória começa a fase de proliferação que é importante para a recuperação total do tecido. Durante a proliferação é formada a matriz extracelular composta de proteoglicanos, glicosaminoglicanos e colágeno, sendo que o colágeno é a proteína mais importante do tecido que forma a pele (SCHREML et al., 2010). Falha na formação do novo tecido pode produzir cicatrizes hipertróficas, causando uma aparência indesejada na cicatriz (SHIH et al., 2010). O presente estudo demonstrou diminuição na produção de colágeno no 7 dia pós tratamento dos animais tratados com pomada de Padina. Contudo, ao final dos tratamentos não houve alteração na produção de colágeno entre os três grupos de tratamento.

Estudo realizado por Gunes e colaboradores (2017) avaliou o potencial cicatrizante *in vitro* de extrato de *Spirulina platensis*. Foi observada ação cicatrizante após tratamento *in vitro* em cultura de células, ocorreu aumento da proliferação e migração celular de fibroblastos e queratinócitos humanos, este resultado foi atribuído a atividade antioxidante da alga. A *Spirulina platensis* é rica em flavonoides, alcaloides e triterpenoides, componentes que apresentam efeitos antioxidante e antimicrobiano, e que favorecem a contração da ferida e a sua epitelização (SYARINA et al., 2015).

A presença de ácidos graxos também é um componente importante na inflamação. Estudo *in vitro* realizado por Robertson e colaboradores (2015) mostraram o efeito dos ácidos graxos na atividade anti-inflamatória através dos perfis de ácidos graxos, pigmentos e lipídios com a participação de três algas vermelhas (*Palmaria palmata*, *Porphyra dioica*, *Chondrus crispus*) e uma microalga (*Pavlova lutheri*). Em comparação com o controle não tratado os extratos de algas inibiram vários genes inflamatórios em macrófagos THP-1. O extrato foi capaz de diminuir a produção de citocinas inflamatórias e regular genes envolvidos nas vias de sinalização da inflamação.

Estudo *in vitro* utilizando a alga *P. gymnospora*, avaliou atividade cicatrizante de extrato metanólico dessa alga, mostrando que a mesma não apresenta efeito citotóxico em células de fibroblastos de camundongos e linhagem de carcinoma ovariano humano, independente das concentrações utilizadas no experimento. O estudo também demonstrou a diminuição da concentração de NO, composto que em doses baixas contribui para o crescimento endotelial (XING et al., 2015), resultando em maior proliferação de fibroblastos. O estudo *in vitro* evidenciou que a Padina pode ser um agente antimicrobiano promissor, uma vez que foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, comumente presente em feridas de pele. O estudo concluiu que a presença de ácidos graxos em sua composição química foi fundamental para o efeito positivo da pesquisa e que a capacidade de inibir o óxido nítrico, componente importante na regulação da proliferação celular, juntamente com a capacidade antimicrobiana da alga em estudo (BALIANO et al., 2016), demonstra que a Padina é um agente promissor no processo de cicatrização de feridas.

Portanto, substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias como ácidos graxos, e polifenóis (GUNES et al., 2012; BALIANO et al., 2016), presentes no extrato metanólico da alga são fundamentais para o sucesso da cicatrização de feridas, protegendo contra o dano oxidativo causado pelos radicais livres.

5 Conclusão

Em conclusão, pode-se evidenciar que o uso da pomada de Padina 25% acelerou o fechamento da ferida em ratos *Wistar* no 3 e 7 dias de tratamento e que previne a super-expressão da resposta inflamatória, diminuindo o infiltrado inflamatório, favorecendo o processo de cicatrização. Nesse contexto, a pomada de Padina 25% pode ser um agente promissor no tratamento de lesões do tecido cutâneo.

6 Referências

- Al-Enazi, N.M., Awaad, A.S., Zain, M.E., Alqasoumi, S.I. 2018. Antimicrobiano, antioxidante e atividades anticancerígenas de *Laurencia catarinensis*, *Laurencia majuscula* e *Padina extratos de pavonica*. *Saudi Pharm J.* 26 (1): 44-52.
- Andrade, T.A., Iyer, A., Das, P.K., Foss, N.T., Garcia, S.B., Coutinho-Netto, J., Jordão-Jr, A.A. Frade, M.A., 2011. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44, 1036-1047.
- Baliano, A.P., Elisangela, F.P., Buzin, A.R., Vieira, T.Z., Romão, W., Tose, L.V., Lenz, D., Andrade, T.U., Fronza, M., Kondratyuk, T.P., Endringer, D.C. 2016. Brown seaweed *Padina gymnospora* is a prominent natural wound-care product. *Rev. bras. farmacogn. Curitiba*, 26(6):714-719.
- Broughton, G., Janis, J. E., Attinger, C. E. 2006. The Basic Science of Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(sup.), 12S–34S.
- Campos, A.C.L., Borges-Branco, A., Groth, A.K. 2007. Cicatrização de feridas. *ABCD Arq. Bras Cir Dig. Paraná-Curitiba*, 20(1): 51-8.
- Costa, R., Negro, R., Valente, I., Castela, A., Duarte, D., Guardao, L., et al. 2013. Xanthohumol modulates inflammation, oxidative stress, and angiogenesis in type 1 diabetic rat skin wound healing. *J Nat Prod.* 76(11):2047-53.
- Gamma, L.S.S., Marques, F.M., Vittorazzi, C., de Andrade, T.A.M., Frade, M.A.C., de Andrade, T.U., Endringer, D.C., Scherer, R., Fronza, M., 2016. *Struthanthus vulgaris* ointment prevents an over expression of inflammatory response and accelerates the 57 cutaneous wound healing. *J. Ethnopharmacol.* 190, 319–327.
- Eming, S.A., Krieg, T., Davidson, J.M. 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 127:514–21.
- Epstein, H.F. 1999. Cicatrização de feridas cutâneas. *N Engl J Med* 341: 738-746.

Ferreira, A.M., Vieira, B.M., Rigotti, M.A., Rolan, M., Loureiro, D., 2012. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. *Rev. da Esc. Enferm. da USP* 46, 752–760.

Garzón-Castaño, S.C., Lopera-Castrillón, I.A., Jiménez-González, F.J., Siller-López, F., Veloza, L.A., Sepúlveda-Arias, J.C. 2018. Nrf2-Mediated Antioxidant Activity of the inner bark extracts obtained from *Tabebuia rósea* (Bertol) DC and *Tabebuia chrysantha* (JACQ) G. Nicholson. Version 2. F1000Res. 2018 Dec 16 [revised 2019 Jan 1];7:1937.

Gunes S., Tamburaci S., Dalay, M.C., Gurhan, I.D. 2017. In vitro evaluation of *Spirulina platensis* extract incorporated skin cream with its wound healing and antioxidant activities. Reinke JM, Sorg H. *Wound repair and Regeneration*. European Surgical Research, 49:35-43.

Harding, K.G., Morris, H.L., Patel, G.K. 2002 Healing chronic wounds. *BMJ*. 324:160-163.

Hart, J. 2002. Inflammation. 1: its role in the healing of acute wounds. *Journal of Wound Care*. 11(6):205-209.

Hatanaka, E., Curi, R., 2007. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. (Ácidos graxos e cura: uma revisão). *Rev. Bras. Fazenda*. 88, 53-58.

Landén, N.X., Li, D., Stähle, M. 2016. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 73(20): 3861-3885.

Maithili, A., Anuradha, S., Nupur, M. 2015. Toxic effects of cosmetics on the users: a review. *J Environ Res Dev*. 9:900–905.

Mandelbaum, S.H., Di Santis, E.P., Mandelbaum, M.H.S. 2003. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An. Bras. Dermatol*. [Internet]. [cited 2019 July 14]; 78(4):393-408.

Meyers, L., Hudson, S.L. 2013. *Wound Care: Getting to the Depth of the Tissue*. E L S. 1-16.

Miranda, M.S., Cintra, R.G., Barros, S.B.M., Mancini-Filho, J. 1998. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina máxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. p.1075-1079.

- Moreno, S.E., Alves-Filho, J.C., Bertozi, G., Alfaya, T.M., Theze, J., Ferreira, S.H., Vargaftig, B.B. 2015. Systemic administration of interleukin-2 inhibits inflammatory neutrophil migration: role of nitric oxide. *British journal of pharmacology*. 148(8):1060-1066.
- Negrão, R., Costa, R., Duarte, D., Taveira Gomes, T., Mendanha, M., Moura, L., Vasques, L., Azevedo, I., Soares, R. 2010. Angiogenesis and inflammation signaling are targets of beer polyphenols on vascular cells. *J Cell Biochem*. 111(5):1270-9.
- Noursadeghi, M., Tsang, J., Haustein, T., Miller, R.F., Chain, B.M., Katz, D.R. 2008. Quantitative imaging assay for NF-kappaB nuclear translocation in primary human macrophages. *J. Immunol. Methods*. 329, 194-200.
- Pande, J., Dhanki, A., Padalia, H., Chanda, S. 2018. Caracterização farmacognóstica, avaliação fitoquímica e físico-química de *Sargassum wightii* e *Padina gymnospora*, duas algas marrons da costa de Gujarat. *The Pharma Innovation*. 7(6): 78-86.
- Panigrahi, B.B., Panda, P.K., Patro, V.J. 2011. Wound healing activity of Spirulina extracts. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 6:132–135.
- Reinke, J.M., Sorg, H. 2012. Wound repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49:35-43.
- Robertson, R.C., Guihéneuf, F., Bahar, B., Schmid, M., Stengel, D.B., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., Stanton, C. 2015. The Anti-Inflammatory Effect of Algae-Derived Lipid Extracts on Lipopolysaccharide (LPS)-Stimulated Human THP-1 Macrophages. *Mar Drugs* 13(8):5402-24.
- Serra M. B., Barroso W. A., Silva N. N., Silva S. N., Borges A. C. R., Abreu I. C., Borges M. O. R. From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing. *Hindawi International Journal of Inflammation*. 2017.
- Schreml, S., Szeimies, R.M., Prantl, L., Landthaler, M., Babilas, P., 2010. Wound healing in the 21st century. *J. Am. Acad. Dermatol*. 63, 866-881.
- Shih, B., Garside, E., McGrouther, D.A., Bayat, A., 2010. Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease. *Wound Repair Regen*.
- Smoot, E.C., Kucan, J.O., Roth, A., Mody, N., Debs, N. 1991. In vitro toxicity testing for antibacterials against human keratinocytes. *Plast Reconstr Surg* 87(5):917-24.

Syarina, P.N.A., Karthivashan, G., Abas, F., Arulselvan, P., Fakurazi, S. 2015. Wound Healing Potential of *Spirulina platensis* Extracts on Human Dermal Fibroblast Cells. *Excli J.* p.385-393.

Vittorazzi, C., Endringer, D.C., Andrade, T.U., Scherer, R., Fronza, M. 2015. Antioxidant, antimicrobial and wound healing properties of *Struthanthus vulgaris*. *Pharmaceutical Biology*, 54, p. 1-7.

Xing, Q., Zhang, L., Redman, T., Qi, S., Zhao, F., 2015. O óxido nítrico regula o comportamento celular em um arcabouço de matriz extracelular derivado de célula interativa. *J. Biomed. Mater. Res.* 103, 3807-3814.

World Health Organization – WHO. *Traditional Medicine Strategy*. Geneva, Switzerland. 2013.