



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Helena Ribeiro Souza

**Avaliação das propriedades cicatrizantes do extrato de *Garcinia
brasiliensis* e modulação da proteína Anexina A1 em modelo de
lesão cutânea**

São José do Rio Preto
2022

Helena Ribeiro Souza

**Avaliação das propriedades cicatrizantes do extrato de *Garcinia
brasilensis* e modulação da proteína Anexina A1 em modelo de
lesão cutânea**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Girol

São José do Rio Preto
2022

S729a	<p>Souza, Helena Ribeiro</p> <p>Avaliação das propriedades cicatrizantes do extrato de <i>Garcinia brasiliensis</i> e modulação da proteína Anexina A1 em modelo de lesão cutânea / Helena Ribeiro Souza. -- São José do Rio Preto, 2022</p> <p>89 f. : il., tabs.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientadora: Ana Paula Girol</p> <p>1. Inflamação. 2. Cicatrização. 3. Anexina A1. 4. <i>Garcinia</i>. 5. Polifenóis. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Helena Ribeiro Souza

**Avaliação das propriedades cicatrizantes do extrato de *Garcinia
brasilensis* e modulação da proteína Anexina A1 em modelo de
lesão cutânea**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Girol
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto/UNIFIPA – Catanduva
Orientadora

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Câmpus de Ilha Solteira

Prof^a. Dr^a. Sheila Cristina Monteiro Paiva Freitas
UNIFIPA – Catanduva

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior
USP - Câmpus de Ribeirão Preto

São José do Rio Preto
04 de março de 2022

Àqueles que, apesar de todas as adversidades, sempre acreditaram que eu seria capaz de atingir meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, minha mãe, Maria Helena Denadai, e aos meus irmãos, Renata e Thiago Ribeiro Souza, pelo carinho e compreensão.

Agradeço aos meus amigos, também pelo carinho e pela torcida.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Girol, que contribui para minha formação acadêmica e profissional desde a graduação e que me recebeu de braços abertos para essa empreitada da Pós-graduação.

Aos colegas da Pós-graduação, especialmente, Lucas Possebon, Melina M. Iyomasa-Pilon, Ariane H. Yoshikawa, Isabella Gomes, Sara S. Costa, Jéssica M. Silva, pelos auxílios prestados com o desenvolvimento do meu projeto, pela troca de ideias e bibliografias, pelas dicas e por todo apoio e companheirismo.

Igualmente, agradeço à Prof^ª. Dr^ª. Andréia H. Moreno, pelos auxílios prestados com desenvolvimento de alguns métodos que usei no desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Centro Universitário Pe. Albino de Catanduva, onde desenvolvi a maior parte do meu projeto, agradeço a estrutura e verba disponibilizada.

Agradeço aos profissionais da seção técnica do PPG de Biociências pela prestatividade.

Agradeço aos professores da Unesp que tive a honra de conhecer e oportunidade de aprender com suas mais diversas experiências e formações.

Finalmente, agradeço imensamente à toda rede de campi da Unesp, especialmente ao Ibilce e ao PPG de Biociências, por propiciar ensino de qualidade e estrutura, mesmo em tempos difíceis para a Ciência no Brasil.

RESUMO

O uso de plantas medicinais remonta à antiguidade. Com o advento da ciência moderna, vários compostos químicos dessas plantas foram identificados e suas aplicações e eficácias comprovadas. No entanto, existem muitas plantas medicinais usadas por populares em diversas partes do mundo ainda pouco investigadas. Dentre essas espécies, encontra-se a *Garcinia brasiliensis*, planta de porte arbóreo nativa da América do Sul, conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias e antitumorais e estudada em algumas condições clínicas. Nesse trabalho, o objetivo foi identificar alguns compostos do metabolismo secundário da *G. brasiliensis*, testar a atividade antioxidante e citotoxicidade de soluções extrativas da planta, bem como, avaliar essas soluções em lesão cutânea ainda pouco explorada, em modelos *in vivo* e *in vitro*. Para isso, folhas de espécime da *G. brasiliensis* foram coletadas, secadas e trituradas para serem infundidas em etanol 70%. Após retirada do etanol dessa solução extrativa foi obtido o Extrato Puro (EP), do qual, por meio de fracionamento líquido-líquido, foram produzidas as Frações Acetato de Etila (FAE) e Hexânica (FH). EP, FAE e FH foram pesquisados para verificação da presença de terpenos, compostos fenólicos e alcaloides por meio de testes colorimétricos e cromatográficos (HPTLC), enquanto, a atividade antioxidante foi avaliada por meio da descoloração do radical livre DPPH. A citotoxicidade das amostras em diferentes concentrações foi analisada em teste de hemólise em solução glicosilada (5%) de sangue humano (4%) e em teste *in vivo/in ovo* da membrana corioalantoide de ovos de *Gallus gallus* fertilizados. Os resultados dessas análises indicaram a presença de compostos de interesse farmacológico no EP e FAE e baixa citotoxicidade nessas amostras, que foram submetidas a teste de suas propriedades microbicidas contra *Staphylococcus aureus*. Embora somente EP tenha apresentado atividade microbicida em concentração maior que 50%, a presença de compostos metabolicamente ativos, alta capacidade antioxidante e baixa citotoxicidade da FAE foram importantes para seleção dessas duas soluções extrativas para o modelo de lesão cutânea. Desse modo, EP e FAE foram incorporadas em formulações, que após testes de estabilidade, foram testadas em feridas de 5 mm no dorso de ratos *Wistar*, infectadas ou não com *S. aureus* (25 µL 10⁵). Após o tratamento tópico de 6 dias, EP e FAE demonstraram controlar o

processo de formação de prurido, modularam a expressão da proteína Anexina A1, relacionada ao processo inflamatório, e reduziram a quantidade de células imunomarcadas para Gasdermina-D, relacionada ao processo de morte celular piroptótica, e aumentaram a expressão de MCP-1. Em conjunto, os dados mostram importante perfil anti-inflamatório bem como potencial terapêutico do EP e da FAE no processo de regeneração cutânea, inclusive em lesões infectadas.

Palavras-chave: Bacupari. Compostos fenólicos. Inflamação. Cicatrização cutânea. Piroptose. Gasdermina-D.

ABSTRACT

*The use of medicinal plants dates back to antiquity. With the advent of modern science, several chemical compounds from these plants have been identified and their applications and effectiveness proven. However, there are many medicinal plants used by people in different parts of the world that are still poorly investigated. Among these species is *Garcinia brasiliensis*, a tree-sized plant native to South America, known for its anti-inflammatory and antitumor properties and studied under some clinical conditions. In this work, the objective was to identify some compounds from the secondary metabolism of *G. brasiliensis*, test the antioxidant activity and cytotoxicity of extractive solutions of the plant, as well as evaluate these solutions under clinical conditions still little explored, in models *in vivo* and *in vitro*. For this purpose, specimen leaves of *G. brasiliensis* were collected, dried and ground to be infused in 70% ethanol. After removing the ethanol from this extractive solution, the Pure Extract (PE) was obtained, from which, by means of liquid-liquid fractionation, the Ethyl Acetate (EAF) and Hexanic (HF) fractions were produced. PE, EAF and HF were investigated to verify the presence of terpenes, phenolic compounds and alkaloids by means of colorimetric and chromatographic tests (HPTLC), while the antioxidant activity was evaluated by means of DPPH free radical decolorization. The cytotoxicity of samples at different concentrations was analyzed in a hemolysis test in glycosylated solution (5%) of human blood (4%) and in an *in vivo/in ovo* test of the chorioallantoic membrane of fertilized eggs of *Gallus gallus*. The results of these analyzes indicated the presence of compounds of pharmacological interest in PE and EAF and also low cytotoxicity in these samples, which were tested for their microbicidal properties against *Staphylococcus aureus*. Although only PE showed microbicidal activity at a concentration greater than 50%, the presence of metabolically active compounds, high antioxidant capacity and low cytotoxicity of EAF were important for selecting these two extractive solutions for the skin lesion model. Thus, PE and EAF were incorporated into formulations, which, after stability tests, were tested on 5 mm wounds on the back of Wistar rats, infected or not with *S. aureus*. After the 6-day topical treatment, PE and EAF demonstrated to control the pruritus formation process, modulated the expression of the Annexin A1 protein, related to the inflammatory process, and reduced the amount of immunomarked cells for Gasdermin-D, related to the death process pyroptotic cell, and increase the expression of MCP-1. Together, the data show an*

important anti-inflammatory profile and therapeutic potential of PE and EAF in the process of skin regeneration, including in infected lesions.

Keywords: *Bacupari. Phenolic compounds. Inflammation. Wound healing. Pyroptosis. Gasdermin-D.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução:

- Figura 1.** Estrutura da AnxA1. 17
- Figura 2.** Quantidade de resultados encontrados pela busca do descritor “herbal medicine” no site *Pubmed*/MEDLINE. 18
- Figura 3.** Estrutura dos precursores de classes de metabólitos secundários vegetais. 20
- Figura 4.** Mecanismos de promoção da cicatrização e reparo cutâneo dos flavonoides em modelo animais segundo CARVALHO et al. (2021). 21
- Figura 5.** A *Garcinia brasiliensis*. 23

Manuscrito:

- Figura 1.** Representação esquemática dos grupos experimentais. 67
- Figura 2.** Resultados da pesquisa de fitoquímicos por HPTLC. 68
- Figura 3.** Teste de citotoxicidade *in vitro* com hemólise. 70
- Figura 4.** Teste de citotoxicidade *in vivo/in ovo* CAM. 71
- Figura 5.** Teste da atividade antimicrobiana. 72
- Figura 6.** Registro das lesões no 6º dia após indução e histopatologia. 73
- Figura 7.** Estudo da expressão da AnxA1 na epiderme e na derme. 74
- Figura 8.** Imunomarcção das células no estroma para GSDM-D. 75
- Figura 9.** Dosagem de citocinas no macerado das lesões infectadas. 76
- Figura 10.** Proposta de um modelo de ação de tratamento tópico com soluções extrativas de *G. brasiliensis* no processo de fechamento de feridas. 77

Material Suplementar do Manuscrito:

- Figura 1.** Teste de estabilidade à centrifugação. 78
- Figura 2.** Registros do teste de estabilidade preliminar das formulações em creme. 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padrões e suas diluições, fases móveis e derivatização utilizados em HPTLC.	65
Tabela 2: Resultados da pesquisa qualitativa e quantitativa de fitoquímicos em EP, FH e FAE.	66
Tabela 1. Dados do teste de estabilidade preliminar das formulações em creme.	80
Tabela 2. Dados do teste de estabilidade preliminar das formulações em gel.	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil
AnxA1	Anexina A1
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BHI	Meio de Cultura “ <i>Brain Heart Infusion</i> ”
CAM	<i>Chorioallantoic membrane assay</i>
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa no uso de animais
COX-2	Ciclooxigenase-2
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EP/PE	Extrato Puro
FAE/EAF	Fração de Acetato de Etila
FH/HF	Fração Hexânica
G+	Bactéria gram +
G-	Bactéria gram –
GSDM-D	Gasdermina-D
H&E	Hematoxilina e Eosina
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1
IL	Interleucina
M1	Macrófago tipo M1 (pró-inflamatório)
M2	Macrófago tipo M2 (anti-inflamatório)
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos/macrófagos

MMP	Metaloproteinase de Matriz
N	Normal
n	número de amostras/grupo
NF-κB	Fator Nuclear-KB
NP-PEG	<i>Natural products-polyethylene glycol reagente</i>
PL	Piperlongumina
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VEGF	Fator do Crescimento do Endotélio Vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

AlCl₃	Cloreto de Alumínio
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
FeCl₃	Cloreto Férrico
g	grama
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
kg	Kilograma
L	Litro
mL	MiliLitro
mm	Milímetro
NaCO₃	Carbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
N	Nitrogênio
nm	Nanômetro
nL	Nanolitro
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
psi	<i>Pound force per square inch</i>
s	Segundo
µL	Microlitro
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	PELE E FERIDAS CUTÂNEAS	15
1.2	PLANTAS MEDICINAIS	17
1.3	GÊNERO <i>GARCINIA</i>	21
1.4	<i>GARCINIA BRASILIENSIS</i> MART.	22
1.5	REFERÊNCIAS	25
2	OBJETIVOS GERAIS	31
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1	MANUSCRITO: “AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES CICATRIZANTES DO EXTRATO DE <i>GARCINIA BRASILIENSIS</i> EM MODELO DE LESÃO CUTÂNEA”	34
4	CONCLUSÕES	82
	APÊNDICE A - Artigo: “<i>Healing effects of Lavandula officinalis</i> <i>essential oil associated with Arctium lappa extract in a second</i> <i>degree burn model</i>”	84
	APÊNDICE B - Artigo: “<i>Cutaneous wound healing modulation</i> <i>of lesions infected by Staphylococcus epidermidis and treated with</i> <i>4% stabilized sodium hypochlorite solution</i>”	85
	ANEXO A – Aprovação da CEUA/UNIFIPA 05/18 para modelo de lesão cutânea	86
	ANEXO B – Aprovação da CEUA/UNIFIPA 06/18 para teste CAM	87
	ANEXO C – Comprovante de Submissão do Manuscrito	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 PELE E FERIDAS CUTÂNEAS

A Pele é formada por uma camada mais externa, a epiderme, constituída especialmente por queratinócitos, e uma camada mais interna, a derme, formada por um tecido conjuntivo reticular e um denso e não modelado mais profundo, bastante vascularizados e que possuem uma matriz extracelular rica em colágeno do tipo I e III, elastina e outras proteínas de sustentação secretadas por fibrócitos e fibroblastos. Subjacentemente, encontra-se um panículo adiposo conhecido por hipoderme (MILLÁS et al., 2019; YILDIRIMER; THANH; SEIFALIAN, 2012).

As feridas na pele podem ser ocasionadas por cortes, irritação mecânica, aquecimento ou resfriamento excessivo, insultos químicos, infecções e desordens autoimunes (WATSON, 2014). O fechamento de feridas é vital para o organismo, pois a pele separa o ambiente interno do externo, impedindo perda de líquidos e auxiliando na manutenção da temperatura (MILLÁS et al., 2019; TAKEO; LEE; ITO, 2015).

Lesões cutâneas são um problema de saúde pública mundial. Estima-se que, aproximadamente, 5 milhões de brasileiros sofram com acidentes que levam ao rompimento da barreira cutânea, configurando a 14ª maior causa de afastamento do trabalho no país. Somente acidentes com queimaduras atingem, aproximadamente, 1 milhão de pacientes/ano no país, sendo que cerca de 10 % desses acidentes levarão a hospitalizações (MILLÁS et al., 2019).

O rompimento da barreira cutânea induz, imediatamente, o processo fisiológico de fechamento e cicatrização da lesão, que pode ser dividido em, ao menos, três fases, iniciando pela inflamação aguda causada pela lesão que deflagra liberação de citocinas e quimiocinas, além de outros mediadores pró-inflamatórios, e caracterizada pelo aumento da permeabilidade e vascularidade locais, com infiltração de leucócitos. Os próprios mediadores liberados nessa fase atraem, principalmente, fibroblastos e queratinócitos, iniciando a fase de proliferação celular e tecidual, sendo que os principais eventos dessa etapa são o fechamento da ferida e a síntese de fibras colágenas da pele, ambos os processos estimulados pela liberação de fatores de crescimento e outros indutores. Após o fechamento da ferida, inicia-se a fase mais longa, a remodelação tecidual, onde há reorientação das fibras de sustentação da pele, crescimento de anexos epiteliais e reestabelecimento da anatomia e fisiologia

da pele normal (MONAVARIAN et al., 2019; TAKEO; LEE; ITO, 2015; WATSON, 2014).

Essas fases e processos são bastante complexos, com interposições e nem sempre evoluem de maneira saudável. Assim, a formação de feridas crônicas, que não se fecham, ou de cicatrizes patológicas, com hipertrofia e contraturas, são comuns e movimentam custos nos centros de saúde e pesquisas que buscam inovações (MONAVARIAN et al., 2019; RAZIYEVA et al., 2021; TAKEO; LEE; ITO, 2015).

Um dos mediadores que atua nessas fases é a proteína Anexina A1 (AnxA1), primeiro membro clonado da superfamília de Anexinas, caracterizadas por possuírem, ao menos, quatro repetições estruturais de 60 aminoácidos com afinidade ao cálcio, conservados evolutivamente e presentes em todos os filios de eucariotos, além de uma sequência N-terminal catalítica, peculiar a cada membro da superfamília (Figura 1). Esta sequência é que confere especificidade de ação das anexinas, sendo várias para a AnxA1, dentre elas, funções anti-inflamatória, participação no processo de apoptose, e diferenciação (GOBBETTI; COORAY, 2016; RESCHER; GERKE, 2004).

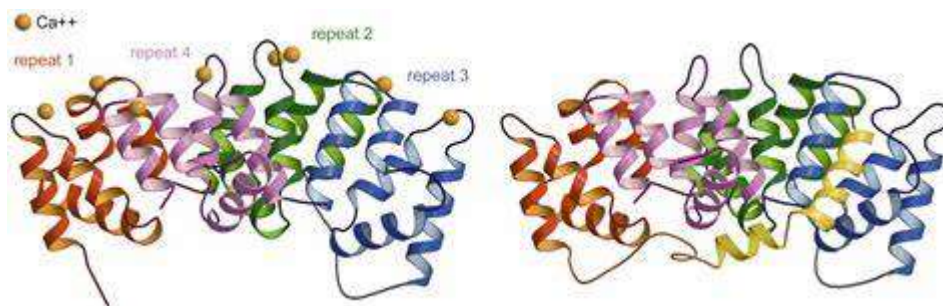


Figura 1. Estrutura da AnxA1: esquema evidencia domínios repetidos com afinidade ao cálcio e sua porção N-terminal única que confere especificidade de ação biológica (RESCHER et al., 2006).

A AnxA1 é expressa em diversos tipos celulares, como leucócitos, exceto o linfócito B, queratinócitos, fibroblastos, endotélio vascular e mastócitos, todas as células participantes do processo de cicatrização cutânea (GOBBETTI; COORAY, 2016; SOUZA et al., 2017). Ainda, a AnxA1 tem sido relacionada com a função antifibrótica, sendo que seus níveis de expressão são impeditivos para fibroblastos em diversos tecidos sintetizarem colágeno em excesso (BIZZARRO et al., 2012; DAMAZO et al., 2011; GUO et al., 2010; JIA et al., 2013; LEONI et al., 2013, 2015;

NEYMEYER et al., 2015; TRENTIN et al., 2015). Nosso grupo de pesquisa, em trabalho com modelo de queimadura de segundo grau, observou que a AnxA1 é expressa em todas as fases do processo de fechamento da ferida, sendo que o aumento de sua expressão foi encontrada na fase de remodelação de tecidos, especialmente, nos grupos onde houve melhor processo de cicatrização e neogênese de anexos epiteliais (SOUZA et al., 2017).

Para estudo da cicatrização cutânea, além das queimaduras (SOUZA et al., 2017), diversos outros modelos já foram estabelecidos, como excisões e cortes (DEL GAUDIO et al., 2015) e modelos com feridas infectadas (ALVES et al., 2021; DAI et al., 2011). Esses estudos visam melhor compreender os eventos do reparo tecidual, bem como testar novos tratamentos que auxiliem a cicatrização mais rápida e inibam o surgimento de afecções associadas (DAI et al., 2011; DYBBOE et al., 2017). Nesse contexto, o uso de fitoterápicos como proposta de tratamento de lesões, seja como extratos brutos ou fracionados, óleos vegetais ou essenciais e infusões de plantas medicinais, tem-se destacado devido às suas propriedades anti-inflamatórias, cicatriciais e antimicrobianas (BAHRAMSOLTANI; FARZAEI; RAHIMI, 2014).

1.2 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas e produtos naturais de outros reinos como tratamentos para inúmeros males tem raízes pré-históricas e seus registros podem ser encontrados em, praticamente, todas as civilizações antigas. Apesar de, atualmente, o uso e/ou estudo das propriedades medicinais de produtos naturais serem alvo de desconfiança, muitos fármacos considerados como tratamentos “modernos” são, na verdade, produtos naturais, como por exemplo a aspirina, a morfina e a penicilina (DAVIS; PEREZ, 2009). No entanto, muitos desses tratamentos oriundos de produtos naturais de plantas e de outros reinos ainda carecem de investigação rígida, apesar de serem utilizados por diversas populações no mundo e/ou de terem, em alguns casos, uma aplicação que carrega tradições centenárias (DAVIS; PEREZ, 2009; MUNIANDY et al., 2019). Talvez seja isso que tem despertado o interesse de pesquisadores no mundo todo. Em uma busca pelo termo “*herbal medicine*” na base de dados MEDLINE pelo site *Pubmed*, foram encontradas mais de 52.000 publicações relativas ao tema, sendo mais de 5.600 delas publicadas no ano de 2020, sendo perceptível o aumento gradual da quantidade de publicações a partir dos anos 2000 (Figura 2).

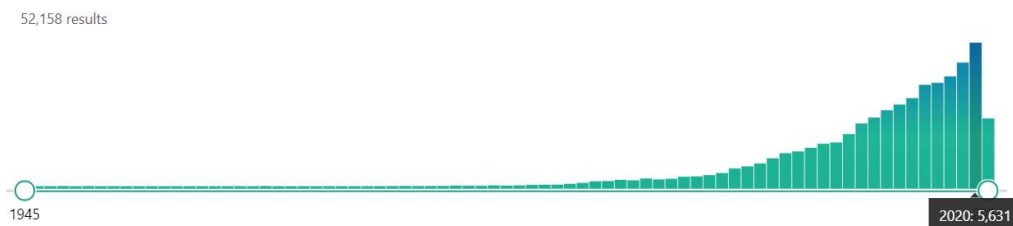


Figura 2. Quantidade de resultados encontrados pela busca do descritor “herbal medicine” no site *Pubmed/MEDLINE*.

Os usos de produtos naturais de diferentes origens biológicas englobam o tratamento de afecções cutâneas. Suas aplicações têm diferentes finalidades, sendo algumas delas, combater infecções, evitar ressecamento de feridas, promover ação antioxidante, induzir/modular síntese de colágeno e promover a cicatrização (DAVIS; PEREZ, 2009; IBRAHIM et al., 2018; MUNIANDY et al., 2019; PAZYAR et al., 2014; WALTON, 2014). Cientificamente, muitos desses tratamentos mostraram efetividade, como por exemplo, o uso de mel, que tem propriedades anti-inflamatórias, microbidas e antioxidantes e pode diminuir o exsudato de feridas (DAVIS; PEREZ, 2009; IBRAHIM et al., 2018). Preparações com *Aloe vera* tem características anti-inflamatórias e bactericidas, além de apresentarem outros usos como hidratação para cabelos e pele e combate a acne (DAVIS; PEREZ, 2009; PAZYAR et al., 2014). Manipulações com *Aloe vera* são indicadas, inclusive, para serem utilizadas em conjunto com a sulfadiazina de prata, tratamento padrão para queimaduras, para prevenir os efeitos colaterais dessa nas feridas, como retardo do fechamento da ferida devido a sua citotoxicidade aos queratinócitos e fibroblastos (DAVIS; PEREZ, 2009).

Os extratos e preparações com órgãos vegetais também são importante e conhecida fonte da medicina etnobotânica. Alguns exemplos, relacionado ao tratamento de feridas, são os extratos da casca do Carvalho (*Quercus rubras*), rico em taninos e, devido a isso, apresenta função microbida (DAVIS; PEREZ, 2009). O extrato de canela (*Cinnamomum sp*) também apresenta propriedades anti-inflamatórias e microbidas, além de estimular a formação de colágeno tipo I pela ativação do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1) em fibroblastos humanos (MUNIANDY et al., 2019); extratos de alho (*Allium sativum*) e cebola (*Allium cepa*) demonstraram propriedades cicatriciais, anti-inflamatórias e microbidas em testes com animais, sendo que essas propriedades foram creditadas, especialmente,

à presença de flavonoides, no caso da cebola, principalmente ao flavonoide Quercetina (MUNIANDY et al., 2019).

Nos extratos e decocções de flores de camomila (*Matricaria recutita*) foram encontrados produtos naturais como flavonoides, terpenos e opioides que foram testados e relacionados com aceleração do processo de cicatrização. Um estudo que analisou o tratamento tópico de extrato de camomila na cicatrização de tatuagens observou respostas positivas no uso do extrato (PAZYAR et al., 2014). Outros extratos de plantas ricas em polifenóis são alvos de usos populares e estudos científicos de suas propriedades anti-inflamatórias e cicatriciais, tais como a uva (*Vitis vinifera*) (PAZYAR et al., 2014; WALTON, 2014), a fruta vermelha “cramberry” (*Vaccinium macrocarpon*) (WALTON, 2014), o chá verde (*Camellia sinensis*) (PAZYAR et al., 2014) e o açafrão (*Curcuma longa*) (IBRAHIM et al., 2018).

Inúmeras plantas utilizadas nos tratamentos de afecções cutâneas por populares foram testadas *in vitro* e *in vivo*, além das citadas acima, como a jojoba (*Simmondsia chinensis*) que foi associada ao aumento da síntese de colágeno tipo I por fibroblastos (*in vitro*), o óleo de *tea tree* (*Melaleuca alternifolia*) que promoveu o resfriamento de queimaduras e acelerou o fechamento da feridas, o óleo de oliva (*Olea europaea*) que, ao ser testado em lesões em guinea pigs, aumentou a expressão de fatores de crescimento, como fator do crescimento do endotélio vascular (VEGF), e o ginkgo (*Ginkgo biloba*) e o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), ambos associados ao aumento do tecido de granulação na ferida, dentre outras plantas (PAZYAR et al., 2014).

As propriedades medicinais dessas espécies se devem, além da composição de ácidos graxos de muitas delas, os quais lubrificam e protegem a pele, especialmente à presença de metabólitos secundários. Os metabólitos secundários das plantas podem ser divididos em terpenos/isoprenos, compostos fenólicos/fenilpropanoides e compostos nitrogenados (IBRAHIM et al., 2018; STANIEK et al., 2013; WALTON, 2014).

Os terpenoides são os mais abundantes, oriundos do metabolismo de isoprenos e/ou isopentenil difosfato (Figura 3a), sendo importantes para diversos processos fisiológicos nas plantas, além de defesa contra patógenos. Esses metabólitos são fonte para produção de fármacos, cosméticos e para a aromaterapia e incluem os terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos), carotenoides (tetraterpenos), esteroides vegetais e saponinas (STANIEK et al., 2013; YANG et al., 2018).

Já os compostos fenólicos, oriundos do metabolismo da fenilalanina (Figura 3b) e importantes às plantas para defesas bióticas e abióticas, são poderosos antioxidantes e, por isso, considerados cada vez mais importantes como fonte nutricional e medicinal. Os fenóis compõem o grupo mais diversificado, incluindo taninos, ácidos ligados a anéis aromáticos, flavonoides (cumarinas, chalconas, flavonas, flavononas, flavonóis, antocianinas, antocianidinas, benzofenonas e xantonas), dentre outros (STANIEK et al., 2013; YANG et al., 2018).

Finalmente, os compostos nitrogenados, sendo os principais e mais abundantes os alcaloides, são oriundos do metabolismo do triptofano ou tirosina (Figura 3c), sendo importantes para defesas das plantas contra patógenos e herbivoria, possuem diversas propriedades farmacológicas, sendo as mais conhecidas aquelas ligadas às funções neuromusculares (STANIEK et al., 2013; YANG et al., 2018).

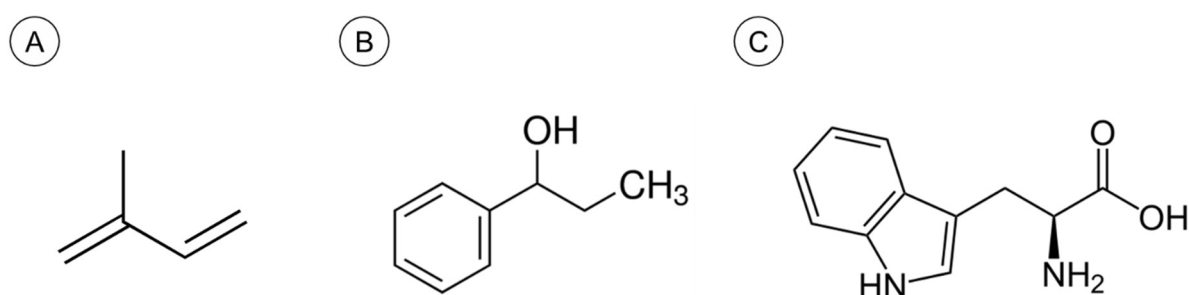


Figura 3. Estrutura dos precursores de classes de metabólitos secundários vegetais. A) Isopreno, precursor dos terpenoides; B) Fenilpropanol, precursor dos compostos fenólicos; C) Triptofano, um dos precursores dos alcaloides (Adaptado de STANIEK et al., 2013).

Das três classes de produtos naturais descritas acima, a que mais é relacionada ao processo de reparo tecidual e a mais estudada é a classe dos polifenóis. A presença de grupos hidroxilas nesses compostos está associada às suas propriedades farmacológicas e, nas feridas, têm sido relacionadas à redução de mediadores inflamatórios, aumento de mediadores anti-inflamatórios, tais como interleucina (IL)-10, além de modular o fenótipo de macrófagos promovendo a expressão dos macrófagos tipo M2, relacionados ao reparo tecidual e aumento de metaloproteinases de matriz (MMPs), importantes para a fase de remodelação tissular pós fechamento de lesão, e, finalmente, aumento da expressão de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (Figura 4) (CARVALHO et al., 2021).

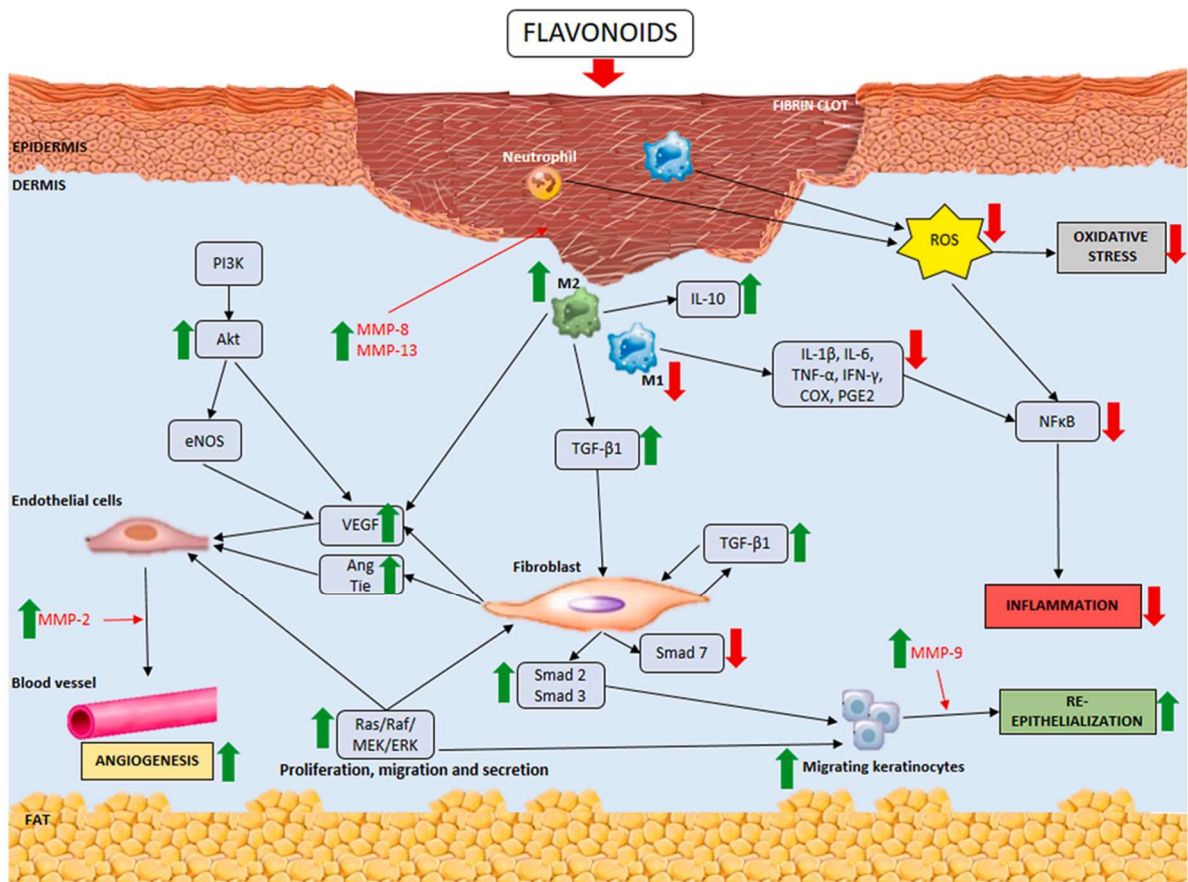


Figura 4. Mecanismos de promoção da cicatrização e reparo cutâneo dos flavonoides em modelo animais segundo CARVALHO et al. (2021).

Um gênero de planta medicinal que tem se destacado por seus compostos, que apresentaram efeitos farmacológicos positivos em várias condições clínicas, mas também por seu uso popular em diversos continentes, é o *Garcinia*.

1.3 GÊNERO *GARCINIA*

O gênero *Garcinia*, antigamente denominado *Rheedia* (ESPIRITO SANTO et al., 2020; GUTT; ELISABETH; BERG, 1979), da Família Clusiaceae (ou Guttiferae Juss. - 1789) contém dezenas de espécies distribuídas mundialmente, especialmente nas zonas tropicais, e apresenta propriedades medicinais relacionadas aos seus compostos do metabolismo secundário (ESPIRITO SANTO et al., 2020; HEMSHEKHAR et al., 2011; KUMAR; SHARMA; CHATTOPADHYAY, 2013).

Na medicina popular e na medicina de povos tradicionais de diferentes origens, diversos órgãos vegetais das espécies do gênero *Garcinia* já foram utilizadas por meio de infusões, decocções e macerações para tratamento de feridas, ulcerações, inflamações, infecções, problemas respiratórios, febre, desintéria e outras condições (ESPIRITO SANTO et al., 2020; HEMSHEKHAR et al., 2011; KUMAR; SHARMA; CHATTOPADHYAY, 2013).

Os produtos naturais mais encontrados nas espécies desse gênero são polifenóis como benzofenonas, xantonas, flavonoides e biflavonoides. Por exemplo, na *G. pedunculata* (Mianmar e Índia), foram isoladas a benzofenona pendunculol, um potente antioxidante, e várias pendunxantonas com propriedades anticâncer (ESPIRITO SANTO et al., 2020). Na espécie *G. subelliptica* (Sudeste da Ásia, incluindo Japão), foram encontradas várias benzofenonas chamadas garcinielliptonas, bactericidas e anti-inflamatórias. Na *G. kola* (países da África Central e Ocidental) foi identificada a kolaflavanona, um biflavonoide anti-inflamatório (HEMSHEKHAR et al., 2011). Na *G. cambogia* (Camboja) foram encontradas as benzofenonas garcinol e isogarcinol, conhecidas por seus efeitos hipolipidêmicos, antiadipogênicos e supressores do apetite. A *G. mangostana* (Indonésia), talvez a espécie do gênero que mais apresenta componentes identificados, possui, em especial, as xantonas chamadas mangostin, com propriedades bactericidas e anti-inflamatórias (ESPIRITO SANTO et al., 2020; HEMSHEKHAR et al., 2011). A espécie brasileira *G. gardneriana*, até o momento foi a única a apresentar o biflavonoide GB-2a, anticancerígeno e anti-inflamatório. Nessas duas últimas espécies citadas (ESPIRITO SANTO et al., 2020), e também na *G. xipshuanba nnaensis* (Índia), foi encontrado o flavonoide Epicatequina. Ainda, na *G. xipshuanba nnaensis* e na *G. bancana* (Tailândia e Malásia), foi identificado o flavonoide Quercetina (HEMSHEKHAR et al., 2011).

Uma outra espécie brasileira, da qual diversos produtos naturais já foram encontrados/isolados, e que despertaram o interesse em serem estudados em diferentes condições clínicas é a *G. brasiliensis*, conhecida popularmente por tratar feridas e úlceras (KUMAR; SHARMA; CHATTOPADHYAY, 2013) e o seu uso, pelo menos para a alimentação, ocorre desde a pré-história em território atualmente pertencente ao Brasil (KNEIP, 2016).

1.4 GARCINIA BRASILIENSIS MART.

A espécie *G. brasiliensis* (Figura 5) é mais encontrada em regiões de floresta, porém é cultivada no Brasil todo por populares, sendo bastante adaptável a outros biomas como o cerrado (ESPIRITO SANTO et al., 2020). A outra espécie nativa e cultivada no Brasil, é a *G. gardneriana*, mais comum na Mata Atlântica (ESPIRITO SANTO et al., 2020) e bastante semelhante à *G. brasiliensis*. Ambas são chamadas de “bacuri-pari” (ESPIRITO SANTO et al., 2020; GUTT; ELISABETH; BERG, 1979), “bacopari” (CAMPOS et al., 2013; GUTT; ELISABETH; BERG, 1979) ou ainda “bacupari” (ARAÚJO et al., 2019; GUTT; ELISABETH; BERG, 1979; MOREIRA et al., 2017; ZAN et al., 2018), mas todas essas variações vêm da linguagem indígena tupi-guarani, que significa “fruta de cerca” (<http://www.colecionandofrutas.com.br/garciniabrasgard.htm>), pois algumas tribos indígenas usavam essas espécies para cercar suas roças. Já na linguagem indígena carajá, existe a denominação “Rrú-uaré-anin” para essas espécies. Ambas possuem frutos amarelos e comestíveis e a diferenciação entre as espécies se dá pela *G. brasiliensis* possuir fruto liso e sem rostro (GUTT; ELISABETH; BERG, 1979) (http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Garcinia_brasiliensis; http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Garcinia_gardneriana).

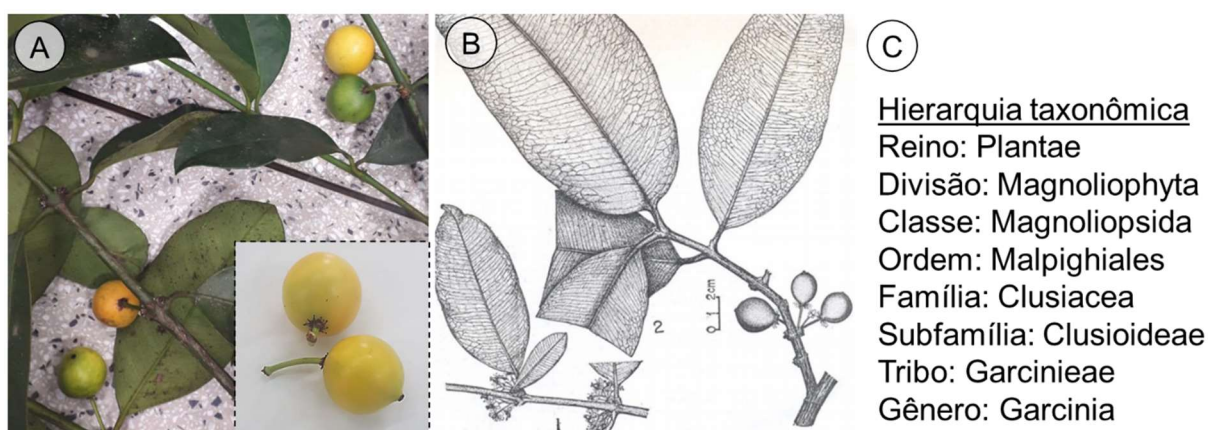


Figura 5. A *Garcinia brasiliensis*. A) Registro de partes coletadas do espécime utilizado nesse estudo; B) Desenho das características de *G. brasiliensis* da sua chave de classificação publicada por GUTT; ELISABETH; BERG, 1979; C) Classificação taxonômica da *G. brasiliensis* (HEMSHEKHAR et al., 2011).

Nas últimas duas décadas, diversos estudos de grupos brasileiros identificaram componentes de interesse farmacológico na *G. brasiliensis*, especialmente compostos

fenólicos, como a 7-epiclusianona (benzofenona); moreloflavona/fukugetina; moreloflavona-7''-O- β -d-glucosídeo/fukugisídeo; moreloflavona-4''-O- β -d-glucosídeo (biflavonoides); gutiferona-A (xantona), sendo que esses compostos foram isolados, especialmente, nas folhas e/ou em partes dos frutos (ESPIRITO SANTO et al., 2020).

Esses estudos evidenciaram na *G. brasiliensis* componentes com propriedades anti-inflamatórias (SANTA-CECÍLIA et al., 2011a, 2011b), antialérgicas (NEVES et al., 2007; VELOSO; MACHADO, 2007), antioxidantes (MARTINS, 2008; NAVES et al., 2019) e antimicrobianas (MARTINS et al., 2011; NALDONI et al., 2009). A presença desses compostos estimulou vários pesquisadores a testar essas propriedades em diferentes condições clínicas. Os efeitos protetores da *G. brasiliensis* e alguns de seus componentes purificados já foram observados na Doença de Chagas (ASSIS et al., 2012) esquistossomose (CASTRO et al., 2015), leishmaniose (PEREIRA et al., 2010; SILVA et al., 2012), tumor de pulmão (MACHADO-SANTELLI; LAGO; SANTOS, 2015), glioblastoma (SALES et al., 2015) e na modulação da inflamação em ratos obesos (MOREIRA et al., 2017). Figueiredo e colaboradores (2014) indicaram os potenciais efeitos fotoprotetores e fotoquimiopreventivos tanto *in vivo* como *in vitro* do extrato do epicarpo do fruto. Ainda, Zan e colaboradores (ZAN et al., 2018) analisaram propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes de fração de acetato de etila de solução extrativa de folhas de *G. brasiliensis*, além de encontrar atividade antibacteriana (G+ e G-) e antifúngica da fração.

Naves (2014) caracterizou os componentes fitoquímicos bem como a atividade biológica de extratos de folhas, cascas e sementes da *G. brasiliensis*. O extrato da folha foi o que apresentou maior teor de compostos fenólicos e flavonoides, bem como o que mais apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, uma das bactérias que mais infectam lesões (DAI et al., 2011). Este extrato também não se mostrou citotóxico em cultura de fibroblastos humanos. No entanto, apesar de todos esses estudos demonstrarem efeitos anti-inflamatórios, antibacterianos e baixa toxicidade celular de extratos da *G. brasiliensis*, não encontramos estudos *in vivo* que avaliassem suas propriedades em lesões cutâneas, exceto em relatos populares.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a propriedade cicatricial do extrato da folha da *G. brasiliensis* aplicado com veículo tópico em modelo de lesão de pele por excisões circulares de 5 mm com *Punch* metálico, infectadas ou não com *S. aureus*, bem como observar a influência do tratamento na expressão da proteína AnxA1, aprofundando estudos do grupo de pesquisa em lesões cutâneas.

1.5 REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F. DE O. et al. Bacupari (*Garcinia brasiliensis*) extract modulates intestinal microbiota and reduces oxidative stress and inflammation in obese rats. **Food Research International**, v. 122, n. December 2018, p. 199–208, 2019.

ASSIS, D. M. et al. Inhibition of cysteine proteases by a natural biflavone: behavioral evaluation of fukugetin as papain and cruzain inhibitor. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 661–70, 2012..

BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M. H.; RAHIMI, R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: An integrative review. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 7, p. 601–617, 2014.

BIZZARRO, V. et al. Annexin A1 N-Terminal Derived Peptide Ac2-26 Stimulates Fibroblast Migration in High Glucose Conditions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–9, 2012.

CAMPOS, P. M. et al. Effect of a *Garcinia gardneriana* (Planchon and Triana) Zappi hydroalcoholic extract on melanogenesis in B16F10 melanoma cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 199–204, 2013.

ALVES, C. T. R. R et al. Cutaneous wound healing modulation of lesions infected by *Staphylococcus epidermidis* and treated with 4% stabilized sodium hypochlorite solution. **World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences**, v. 7, n. 2, p. 32–42, 2021.

CARVALHO, M. T. B. et al. Wound healing properties of flavonoids: A systematic review highlighting the mechanisms of action. **Phytomedicine**, v. 90, n. February, 2021.

CASTRO, A. P. et al. Potent Schistosomicidal Constituents from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 81, n. 9, p. 733–741, 2015.

DAI, T. et al. Animal models of external traumatic wound infections. **Virulence**, v. 2,

n. 4, p. 296–315, 2011.

DAMAZO, A. S. et al. Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. **BMC Immunology**, v. 12, n. 1, p. 59, 2011.

DAVIS, S. C.; PEREZ, R. Cosmeceuticals and natural products: wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 502–506, 2009.

DEL GAUDIO, P. et al. Evaluation of in situ injectable hydrogels as controlled release device for ANXA1 derived peptide in wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 629–633, 2015.

ESPIRITO SANTO, B. L. S. DO et al. Medicinal Potential of Garcinia Species and Their Compounds. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 1–30, 2020.

FIGUEIREDO, S. A. et al. *In vitro* and *in vivo* photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 131, p. 65–73, 2014.

GOBBETTI, T.; COORAY, S. N. Annexin A1 and resolution of inflammation: Tissue repairing properties and signalling signature. **Biological Chemistry**, v. 397, n. 10, p. 981–993, 2016.

GUO, S. et al. Dynamic expression of proteins associated with adventitial remodeling in adventitial fibroblasts from spontaneously hypertensive rats. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 10, p. 1312–1318, 2010.

GUTT, R. L.; ELISABETH, M.; BERG, V. Revisão das espécies brasileiras do gênero *Rheedia*. **Acta Amazonica**, v. 9, n. 1975, p. 43–74, 1979.

HEMSHEKHAR, M. et al. An overview on genus *Garcinia*: phytochemical and therapeutical aspects. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 3, p. 325–351, 2011.

IBRAHIM, N. et al. Wound healing properties of selected natural products.

International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 15, n. 11, p. 1-23, 2018.

JIA, Y. et al. Regulation of lung fibroblast activation by annexin A1. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. July, p. 476–484, 2013.

KUMAR, S.; SHARMA, S.; CHATTOPADHYAY, S. K. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance. **Fitoterapia**, v. 89, n. 1, p. 86–125, 2013.

LEONI, G. et al. Orchestrate Epithelial Repair. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 443-54, 2013.

LEONI, G. et al. Annexin A1 – containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 10, p. 1215-27, 2015.

MACHADO-SANTELLI, G. M.; LAGO, J. H. G.; SANTOS, M. H. 7-Epiclusianone, a Benzophenone Extracted from *Garcinia brasiliensis* (Clusiaceae), Induces Cell Cycle Arrest in G1/S Transition in A549 Cells. **Molecules**, v. 15, n.20, p. 12804–16, 2015.

MARTINS, F. T. et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis A powder X-ray diffraction method for detection of polyprenylated benzophenones in plant extracts associated with HPLC for quantitative analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 3, p. 451–457, 2011.

MARTINS, T. Composition and Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Volatile Oil from the Fruit Peel of *Garcinia brasiliensis*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 2, p. 251–258, 2008.

MILLÁS, A. et al. Approaches to the development of 3d bioprinted skin models: the case of natura cosmetics. **International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB**, v. 2, n. 1, p. 03, 2019.

MONAVARIAN, M. et al. Regenerative Scar-Free Skin Wound Healing. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 25, n. 4, p. 294–311, 2019.

MOREIRA, M. E. DE C. et al. Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 143–153, 2017.

MUNIANDY, K. et al. Wound healing potential of edible plants. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 2, p. 703–707, 2019.

NALDONI, F. J. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 2, p. 403–407, 2009.

NAVES, V. DE M. L. Caracterização química e biológica *in vitro* de extratos de *Garcinia brasiliensis* e avaliação do seu perfil de permeação cutânea em formulações dermatológicas. Dissertação. p. 89, 2014.

NAVES, V. M. L. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of *Garcinia brasiliensis* extracts. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 244–250, 2019.

NEVES, J. S. et al. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 73, n. 7, p. 644–649, 2007.

NEYMEYER, H. et al. Activation of annexin A1 signalling in renal fibroblasts exerts antifibrotic effects. **Acta Physiologica**, v. 215, n. 3, p. 144–158, 2015.

PAZYAR, N. et al. Skin wound healing and phytomedicine: A review. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 6, p. 303–310, 2014.

PEREIRA, I. O. et al. Phytomedicine Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart . fruits. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 6, p. 557–562, 2011.

RAZIYEVA, K. et al. Immunology of acute and chronic wound healing.

Biomolecules, v. 11, n. 5, p. 1–25, 2021.

RESCHER, U. et al. Proteolytic cleavage of annexin 1 by human leukocyte elastase.

Biochimica et biophysica acta, v. 1763, n. 11, p. 1320–1324, 2006.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 13, p. 2631–2639, 2004.

SALES, L. et al. Anticancer activity of 7-epiclusianone, a benzophenone from *Garcinia brasiliensis*, in glioblastoma. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, n. 15, v. 393, p. 1–8, 2015.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 467–473, 2011a.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 280–285, 2011b.

SAQUAREMA, P. D. A. R. D. E.; JANEIRO, R. D. E.; KNEIP, L. M. A utilização de plantas pelos pescadores, coletores e caçadores pré-históricos da Restinga de Saquarema, Rio de Janeiro. **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 60, n. 1, p. 203–210, 2016.

SILVA, V. et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, [s. n], p. 613–623, 2012.

SOUZA, H. R. et al. Heterogeneity of mast cells and expression of Annexin A1 protein in a second degree burn model with silver sulfadiazine treatment. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–17, 2017.

STANIEK, A. et al. Natural products - modifying metabolite pathways in plants. **Biotechnology Journal**, v. 8, n. 10, p. 1159–1171, 2013.

TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, W. Wound Healing and Skin Regeneration. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2015.

TRENTIN, P. G. et al. Annexin A1-mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 12, p. 3058-71, 2015

VELOSO, M. P. et al. Antianaphylactic Properties of 7-Epiclusianone, a Tetraprenylated Benzophenone Isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Med**, v. 73, [s. n.], p. 644-49, 2007.

WALTON, E. W. Topical phytochemicals: Applications for wound healing. **Advances in Skin and Wound Care**, v. 27, n. 7, p. 328–332, 2014.

WATSON, T. Soft Tissue Repair and Healing Review Introduction. 2014. Disponível em < <http://www.electrotherapy.org/modality/soft-tissue-repair-and-healing-review>> Acesso em 10/01/2022.

YANG, L. et al. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 1–26, 2018.

YILDIRIMER, L.; THANH, N. T. K.; SEIFALIAN, A. M. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 638–648, 2012.

ZAN, R. A. et al. Bioactive properties and phytochemical assessment of Bacupari-anão (*Garcinia brasiliensis* Mart.) leaves native to Rondônia, Brazil. **Food and Function**, v. 9, n. 11, p. 5621–5628, 2018.

2. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo desse estudo foi testar as propriedades cicatriciais, antimicrobianas, e anti-inflamatórias de solução extrativa hidroalcolica e frações orgânicas das folhas de *Garcinia brasiliensis* em lesões cutâneas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar caracterização fitoquímica das soluções extrativas em busca de fitoativos com potencial farmacológico, além de testar suas atividades antioxidantes.
 - Realizar pesquisas qualitativas e quantitativas para as principais classes de fitoativos na solução extrativa pura de *G. brasiliensis* e em suas frações orgânicas.
 - Analisar a citotoxicidade das soluções extrativas por métodos *in vitro* e *in vivo*.
- Estabelecidas as caracterizações, análises de citotoxicidade, seleção de frações e dosagens e verificação do perfil anti-inflamatório, avaliar as propriedades cicatriciais e microbicidas de soluções extrativas de *G. brasiliensis* em modelo de lesão cutânea.
 - Realizar Teste de Estabilidade Acelerada em formulações contendo soluções extrativas de *G. brasiliensis* para definição de tratamento tópico.
 - Testar as propriedades cicatriciais e microbicidas de soluções extrativas de *G. brasiliensis* em modelo de lesão em ratos *Wistar* infectados ou não com *S. aureus* e realizar análises macroscópicas e microscópicas das lesões.
 - Avaliar a expressão da proteína Anexina A1 na epiderme e derme das lesões dos animais tratados com soluções extrativas de *G. brasiliensis*.

- Quantificar células imunomarcadas para a proteína Gasdermina-D na derme das lesões dos animais tratados com soluções extrativas de *G. brasiliensis*.
- Dosar a Interleucina-10 e a proteína quimiotática para monócitos/macrófagos-1 do sobrenadante do macerado das lesões.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos serão apresentados a seguir na forma de manuscrito submetido para a revista *Journal of Ethnopharmacology* (ISSN: 0378-8741).

Ainda, durante o período do doutoramento tive a oportunidade de participar de outras investigações realizadas nos laboratórios de pesquisa da UNIFIPA, algumas delas também relacionadas ao PPG em Biociências, IBILCE, UNESP. Essas investigações envolveram a proteína AnxA1 e extratos/ compostos bioativos em diferentes condições patológicas e estão indicadas nos apêndices.

3.1 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES CICATRIZANTES DE EXTRATOS DE *GARCINIA BRASILIENSIS* EM MODELO DE FERIDA CUTÂNEA

Authors: Helena Ribeiro Souza^{1,2}, Amarilys Reis Zucoloto², Isabela Teodoro Parra Francisco², Harissa Padovez Rays², Natielly Palhares Tinti², Nicolas Joseph Della Matta², Roberto Barros Guandalini², Ariane Harumi Yoshikawa², Jéssica Messias da Silva², Lucas Possebon², Melina Mizusaki Iyomasa-Pilon², Andréia de Haro Moreno², Ana Paula Girol^{1,2,3}

Afiliações:

1 – Universidade Estadual Paulista, (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Campus de São José do Rio Preto.

2 – Centro Universitário Pe. Albino (UNIFIPA), Catanduva.

3 – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo.

Autor correspondente: anapaula.girol@unifipa.com.br

Departamento de Ciências Básicas, Centro Universitário Pe. Albino (UNIFIPA), Catanduva.

Conflito de interesses: os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

Resumo

Relevância etnofarmacológica: A cicatrização de feridas é um processo complexo que pode deixar cicatrizes patológicas, principalmente no caso de infecções por microrganismos oportunistas. Nesse contexto, os fitoterápicos abrem grandes possibilidades de investigação. Uma das espécies de interesse nativas do Brasil é a *Garcinia brasiliensis* (“bacupari”). Tradicionalmente conhecida por tratar feridas e úlceras, a *G. brasiliensis* apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas. Mas, suas propriedades de cicatrização em feridas em modelos experimentais, para validar sua eficácia, ainda é pouco estudado. **Materiais e**

Métodos: Extrato puro (EP), Fração Acetato de Etila (EAF) e Fração Hexânica (HF) foram investigados para verificar a presença de terpenos, compostos fenólicos e alcalóides por meio de testes colorimétricos e cromatográficos (HPTLC), atividade antioxidante e citotoxicidade por hemólise e ensaio de membrana corioalantóide

(CAM). As propriedades microbidas de EP e EAF contra *Staphylococcus aureus* também foram testadas e EP e FAE a 10% foram incorporados em formulações de creme e gel. Após testes de estabilidade, as formulações de gel com EP ou FAE a 10% foram selecionadas e aplicadas em feridas cutâneas infectadas ou não com *Staphylococcus aureus* em ratos *Wistar*. O potencial cicatrizante dos extratos foi verificado pela expressão da proteína Anexina A1 (AnxA1), relacionada aos processos de inflamação e função antifibrótica, a imunomarcagem de células para Gasdermina-D (GSDM-D), um marcador de morte celular piroptótica e dosagem de mediadores inflamatórios de interleucina-10 (IL-10) e proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1. **Resultados:** Estudos fitoquímicos indicaram a presença de compostos de interesse farmacológico e também baixa citotoxicidade de PE e FAE a 10%. Após os tratamentos tópicos de 6 dias, as formulações de gel e EP ou FAE demonstraram controlar o processo de formação do prurido. Os tratamentos diminuíram a expressão de AnxA1 e a quantidade de células imunomarcadas para GSDM-D, e aumentaram a expressão de MCP-1 em feridas infectadas.

Conclusões: Juntos, os resultados mostram importante perfil anti-inflamatório e potencial cicatrizante cutâneo de EP e FAE de folhas de *G. brasiliensis*, mesmo em lesões infectadas, com perspectivas terapêuticas.

Palavras-chave: Pele, Cicatrização, Polifenóis, Flavonoides, Inflamação, Medicina Tradicional da América do Sul, *Garcinia brasiliensis*, Anexina A1, Gasdermina-D.

1. Introdução

As lesões de pele são um problema de saúde pública mundial. Estima-se que aproximadamente 5 milhões de brasileiros sofram com acidentes que rompem a barreira da pele, sendo uma importante causa de afastamento do trabalho no país (Millás et al., 2019), o que estimula a busca por alternativas terapêuticas.

O fechamento de injúrias é vital para o organismo, contudo podem surgir cicatrizes patológicas nesse processo que influenciam na fisiologia da pele. Durante as fases de cicatrização, inflamação inicial, proliferação e remodelação, inúmeros mediadores moleculares, tais como citocinas, fatores de crescimento e mediadores pró e anti-inflamatórios são liberados por células inflamatórias, queratinócitos e fibroblastos (Millás et al., 2019; Souza et al., 2017; Takeo; Lee; Ito, 2015). Dentre os mediadores, destaca-se a proteína anti-inflamatória Anexina A1 (AnxA1), um

membro da superfamília das Anexinas, proteínas que apresentam sua parte estrutural conservada de 60 a 70 aminoácidos. Diferentemente, o trecho N-terminal é único para cada membro da superfamília, conferindo especificidade de ação, sendo que a AnxA1 é relacionada às funções anti-inflamatórias (Gobbetti; Cooray, 2016; Han et al., 2020). Nos últimos anos a proteína AnxA1 tem sido relacionada a funções reparadoras e antifibróticas (Del Gaudio et al., 2015; Leoni et al., 2015; Souza et al., 2017; Trentin et al., 2015). Outra função relacionada à proteína AnxA1 é o processo de morte celular e sinalização para fagocitose da célula apoptótica (Arur et al., 2003; Scannell; Maderna, 2006; Sheikh; Solito, 2018).

A morte celular é um processo biológico comum em feridas, sendo, geralmente, classificada em três morfotipos: apoptose, autofagia e necrose, esta última, caracterizada por inchaço da célula e liberação do conteúdo celular no microambiente (Morgan; Liu, 2013). No entanto, principalmente em relação à apoptose e à necrose, esses morfotipos escondem diferentes tipos de interações moleculares que desencadeiam os processos de morte, inclusive um processo de necrose programada ou regulada, contrapondo-se à aceção de que necrose é um processo unicamente acidental de rompimento celular (Galluzzi et al., 2018; Morgan; Liu, 2013).

Atualmente, vários processos de morte são classificados além dos morfotipos clássicos, pelas diferentes maneiras de como são desencadeados, as vias de sinalização intracelular que são ativadas e quais os efeitos da morte da célula no microambiente em que ela estava. Esses processos são estudados por meio de diversas metodologias e podem ser identificados por marcadores moleculares. Por exemplo, as proteínas Garderminas (GSDM), são indicativas de Piroptose, sendo esse um tipo de morte celular desencadeada por agentes infecciosos, como bactérias (Shi; Gao; Shao, 2017). Embora a Piroptose seja amplamente estudada, há poucas análises desse processo em pele.

O estudo do processo de cicatrização pode ser realizado por meio de modelos laboratoriais de diversos tipos de injúrias, como de origem térmica (Souza et al., 2017), ou por excisões na pele (Del Gaudio et al., 2015), com possibilidade de indução de infecção nas feridas (Alves et al., 2021; Dai et al., 2011). Esses estudos visam compreender melhor os eventos do reparo tecidual, bem como testar novos tratamentos que auxiliem a cicatrização mais rápida e inibam o surgimento de afecções associadas. Nesse contexto, o uso de fitoterápicos como tratamentos

alternativos para tratamento de lesões tem-se destacado devido às suas propriedades anti-inflamatórias, cicatriciais e antimicrobianas (Das et al., 2017; Ibrahim et al., 2018; Muniandy et al., 2019). Além disso, no Brasil, o uso de plantas medicinais no tratamento de diversas condições clínicas é uma prática comum e, atualmente, alguns fitoterápicos estão disponíveis na rede farmacêutica e em instituições de saúde (Boccolini and Boccolini, 2020).

Dentre as plantas com potencial medicinal, *Garcinia brasiliensis* Mart. (Família Clusiaceae) conhecida popularmente como bacupari. Na medicina popular e tradicional de diversas populações, diversos órgãos de plantas do gênero *Garcinia* já foram utilizados por meio de infusões, decocções e macerações para o tratamento de feridas, ulcerações, inflamações, infecções, problemas respiratórios, febre, disenteria e outras condições (Espírito Santo et al., 2020; Hemshekhar et al., 2011; Kumar et al., 2013).

Originária da América do Sul, a espécie *G. brasiliensis* é uma planta arbórea que produz frutos amarelos e comestíveis. Embora a *G. brasiliensis* seja mais encontrada em regiões de floresta, ela é cultivada em todo o Brasil, sendo bastante adaptável a outros biomas como o Cerrado (Espírito Santo et al., 2020). Tradicionalmente conhecida no Brasil por tratar feridas e úlceras (Kumar et al., 2013), a *G. brasiliensis* tem sido alvo de estudos anteriores que identificaram componentes com anti-inflamatórios (Santa-Cecília et al., 2011), antianafiláticos (Coelho et al., 2008; Neves et al., 2007), propriedades antioxidantes (Santa-Cecília et al., 2012; Arwa et al., 2015) e antimicrobianas (Naves et al., 2019; Santa-Cecília et al., 2011; Silva et al., 2009; Zan et al., 2018). Os efeitos protetores da *G. brasiliensis* e alguns de seus componentes purificados já foram observados na doença de Chagas (Assis et al., 2012), leishmaniose (Pereira et al., 2011), câncer (Machado-Santelli et al., 2015; Sales et al., 2015) e modulando a inflamação em ratos obesos (Moreira et al., 2017). Além disso, os efeitos fotoprotetores do extrato de *G. brasiliensis* também foram testados *in vivo* e *in vitro* (Figueiredo et al., 2014).

Outra publicação (Naves et al., 2019) caracterizou os componentes fitoquímicos, bem como a atividade biológica de extratos de folhas, cascas e sementes de *G. brasiliensis*. O extrato da folha apresentou o maior teor de compostos fenólicos e flavonóides, bem como foi o que apresentou maior atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.

Apesar disso, não foram encontrados estudos *in vivo* que avaliassem o perfil de *G. brasiliensis* na cicatrização de feridas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial cicatrizante do extrato de folhas de *G. brasiliensis* incorporado em uma formulação tópica em um modelo de lesão de pele infectada por *S. aureus*, bem como observar a influência do tratamento nas expressões de AnxA1 e GSDM-D.

2. Materiais e Métodos

2.1 Padronização do extrato e frações

Primeiramente, destacamos que nosso grupo de pesquisa respeitou o saber popular local, não utilizou material coletado em reservas ou áreas de proteção ambiental e fez o registro obrigatório das pesquisas realizadas com o patrimônio genético brasileiro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

A coleta das folhas do espécime de *G. brasiliensis*, cujas exsiccatas estão depositadas no herbário IRINA DELANOVA GEMTCHUJNICOV (BOTU), sob o nº 33511, foi feita em julho/2018 e, no momento da coleta, o espécime apresentava flores e frutos maduros. O extrato foi obtido por infusão do peso seco de 20 g de folhas trituradas em 100 mL de álcool 70% (Castro. et al., 2015; Eliza et al., 2017). O álcool foi rotaevaporizado em pressão reduzida a 175 milibar com temperatura máxima de 45° C para evitar perda de propriedades do material (Eliza et al., 2017), e assim obteve-se o extrato puro (EP). A partir de EP, foram obtidas duas frações orgânicas com partição líquido-líquido, em igual proporção, por 24 horas, com os solventes hexano e acetato de etila ao EP. Em seguida, os solventes foram eliminados e as substâncias que passaram para a porção orgânica foram re-eluídas em água e filtradas, obtendo-se as frações Hexânica (FH) e Acetato de Etila (FAE).

2.2 Caracterização Fitoquímica

2.2.1 Análises qualitativas e quantitativas

As análises fitoquímicas foram realizadas na busca pela identificação da presença de produtos do metabolismo vegetal de interesse farmacológico. Inicialmente foi feita análise qualitativa de Sesquiterpenos adicionando 1 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2 mL do extrato e frações, sendo que a coloração marrom avermelhada indica a presença de terpenoides com 15 C (Dahanayake et al., 2019).

Já a presença de compostos fenólicos do tipo Cumarinas foi investigada com uso de tubos de ensaio contendo 1 mL de EP, FH e FAE, tampados com papel filtro impregnado em solução aquosa de NaOH (10%) e levados para banho-maria. Após 10 minutos no banho, o papel filtro foi retirado e examinado sob luz ultravioleta. A fluorescência no papel indica presença de cumarinas na amostra (Cristina and Lima, 2016).

A seguir, foram feitas análises fitoquímicas quantitativas de compostos fenólicos. Os Polifenóis totais nas amostras foram avaliados pelo método de Folin-Ciocalteu (Figueiredo et al., 2014; Saroni et al., 2015), utilizando ácido gálico (1274 - Dinâmica) para construção da curva padrão (0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL), com carbonato de sódio (NaCO₃) a 10% (1,5 mL) e Folin-Ciocalteu (0,5 mL) como reagentes reveladores colorimétricos da curva e das amostras para leitura em espectrofotômetro a 760 nm.

A quantificação de compostos Fenóis do tipo flavonoides foi determinada por meio da reação estável que forma o Cloreto de Alumínio (AlCl₃) a esses compostos. Para isso, foi utilizada a Quercetina (Q4951 - Sigma) para construção da curva padrão (diluição seriada a partir de 0,25 µg/mL até 0,0156 µg/mL) e realizada a leitura da mistura de 1 mL das diferentes concentrações da curva ou 1 mL das amostras adicionadas a 1 mL de solução alcóolica de AlCl₃ a 2% em 415 nm no espectrofotômetro (Figueiredo et al., 2014; Saroni et al., 2015).

Ainda, a quantificação de Alcaloides totais foi realizada pelo método em que alcaloides que passaram para uma porção clorofórmica após alcalinização com NaOH 2N são revelados pelo reagente verde de bromocresol dissolvido em solução tamponada a pH 4,7 com ácido cítrico. Uma curva (40; 60; 80; 100; 120; 140 µg/mL) de comparação foi feita com atropina (A0123 – Sigma) e analisada a 470 nm no espectrofotômetro (Shamsa et al., 2008).

2.2.2 HPTLC

As leituras cromatográficas foram desenvolvidas no EP e suas Frações. Todas as análises cromatográficas foram realizadas com o aplicador automático CAMAG Linomat 5 (Lab. Multidisciplinar II/UNIFIPA), com gás N (60 psi) e em placas delgadas (0,2 mm) de sílica 10X10 cm (Ref. 818333 - Macherey-Nagel/Alemanha - ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254). O método de aplicação foi o mesmo para todas as análises, utilizando seringa Hamilton de tamanho 100 µL, velocidade da dosagem 50

nL/s, pré-dosagem de descarte de 0,2 µL, bandas feitas com aplicação de 10 µL e tamanho de 8 mm e distância entre bandas de 5 mm.

Os padrões, eluentes e reveladores usados na pesquisa cromatográfica estão detalhados na Tabela 1.

2.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato foi determinada pela capacidade de sequestro de radicais livres com o uso de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (Martins, 2008; Naves et al., 2019; Arwa et al., 2015; Zan et al., 2018). Após adição de solução de DPPH a 2,4 mg/100 mL, a amostra foi mantida ao abrigo da luz durante 30 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro a 520 nm. As determinações foram realizadas em triplicata.

2.4 Citotoxicidade

2.4.1 Análise *in vitro* da citotoxicidade por meio de hemólise

O EP, FH e FAE foram submetidos ao protocolo de citotoxicidade *in vitro* por meio da análise da hemólise. Solução glicosilada (5%) de sangue humano (4%) foi misturada a diferentes concentrações (2,5%; 5%; 7,5%; 10%) das amostras. Para controle positivo foi preparada solução 0,1% de triton e, para solução negativa, apenas soro fisiológico foi adicionado à solução de hemácias. As amostras e os controles foram levados ao banho-maria a 37° C por 15 minutos, centrifugados à 2.000 RPM por 10 min e, posteriormente, levados para leitura no espectrofotômetro a 540 nm, após zerar-se o aparelho com a solução glicosilada.

2.4.2 Análise *in vivo/in ovo* da citotoxicidade (*Chorioallantoic membrane assay-CAM*)

Para o teste CAM de citotoxicidade *in vivo/in ovo* (Protocolo de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa no uso de animais – Centro Universitário Pe. Albino-UNIFIPA nº 06/18), apenas o EP e a FAE foram selecionados, pelos resultados obtidos das análises fitoquímicas. Ovos fertilizados de galinha (*Gallus gallus*), foram incubados à temperatura 37°C e umidade relativa de 50% por 72 horas na chocadeira do Laboratório de Cirurgia Experimental/UNIFIPA. Ovos embrionados foram divididos em três grupos (n=5) experimentais: controle, no qual os ovos foram injetados 50 µL de soro fisiológico na câmara de ar; e grupos tratados, nos quais

foram aplicados 50 µL do EP ou FAE, ambos a 10%. Após os três dias de incubação, ou 72h, a casca dos ovos ao redor da câmara de ar foi removida para avaliação da vascularização na membrana corioalantoide e o desenvolvimento morfológico dos embriões (Kundeková et al., 2021; Ribatti, 2017). Após, todos embriões foram fotografados e nas fotografias foram adicionadas intersecções padronizadas e 3mm e os vasos localizados nas intersecções das linhas foram quantificados para comparação.

2.5 Análise do potencial microbiológico de EP e FAE em cultura de *Staphylococcus aureus*, comum em infecções cutâneas

O EP e FAE foram usadas para realização do teste microbiológico em cultura de *S. aureus* (ATCC 0023) repicada em meio BHI (McFarland: 1.10^5) e aplicada em ágar Müller Hinton com discos embebidos com 10 µL das amostras nas diluições de 20, 50 e 100 %. Para controle, foram utilizados discos embebidos dos antibióticos Ampicilina e Vancomicina. As placas foram colocadas em estufa, a 37 °C e, no dia seguinte, foi mensurado o halo de inibição.

2.6 Teste de estabilidade acelerado de formulações com EP e FAE

O EP e FAE a 10% foram incorporados a creme e gel não iônicos e submetidos ao teste acelerado de estabilidade para formulações tópicas adaptado da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA). Inicialmente, para verificar sinais de instabilidade, as formulações em creme ou gel contendo 10 % de EP ou FAE foram submetidas ao teste de centrifugação (3000 RPM) por 30 min. O creme ou gel com EP ou FAE a 10 % também foram expostos a luz e ar; refrigeração (2-5 °C); aquecimento (45 °C) e ciclos (24 h) de aquecimento e resfriamento. O material foi analisado diariamente, por 15 dias, e foi observado se houve mudança de cor, textura e pH.

2.7 Indução da lesão e protocolos de tratamento

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes dos EUA (publicação do NIH nº 85-23, revisada em 1985) para experimentos com animais, as diretrizes para pesquisas biomédicas estabelecidas pelas Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental e foram aprovadas pelos Comitês de Ética em Uso de Animais na UNIFIPA (aprovação n. 05/2019). Além

disso, todos os cuidados com o bem-estar dos animais foram prestados e acompanhados por um veterinário do biotério da UNIFIPA. 30 ratos *Wistar* (250-350g) foram anestesiados intraperitonealmente com 0,2 mL/100g de ketamina e 0,05mL/100g de xilasina, submetidos à tricotomia e assepsia da região dorsal para excisão, que foi realizada com auxílio de um Punch metálico de 5 mm. Os animais receberam analgésico codeína (1mL/kg) por gavagem logo após a indução da ferida e, no dia seguinte, o analgésico foi oferecido em água (30mg/L). As feridas de metade dos animais foram infectadas com a bactéria *S. aureus* (G+), adicionando 25 µL de solução de meio de cultura com a bactéria na concentração de 10^5 (Dai et al., 2011).

Os tratamentos tópicos iniciaram um dia após a indução das lesões e foram realizados uma vez ao dia. Os animais controle foram tratados com veículo. Assim, foram definidos os seguintes grupos: Controle; Controle-Infectado; tratado com EP; EP-Infectado; tratados com FAE; FAE-infectado, como mostra a Figura 1.

Os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico (isoflurano) para exérese das feridas no 6º dia após a indução. As lesões foram fixadas em formalina tamponada (4%) e processadas para inclusão em parafina. Todas as lesões foram analisadas macroscopicamente e histologicamente em cortes de 3 µm pelas colorações de Hematoxilina & Eosina (H&E) e Picrosírius. Os estudos imunohistoquímicos foram realizados em cortes de mesma espessura e aderidos a lâminas gelatinizadas.

Fragmentos de lesões de todos os grupos também foram macerados em N líquido e uma solução com inibidores de proteases (Protease inhibitor cocktail; Merck/USA; Cat. nº 539131) e fosfatases (Phosphosafe; Merck/USA; Cat. nº 71296-3) foi adicionada. O material obtido após a maceração foi centrifugado e o sobrenadante foi armazenado a -70 °C para dosagem de citocinas.

2.8 Estudo da expressão da proteína Anexina A1

Os cortes histológicos passaram por recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase e foram incubados *overnight* com o anti-Anexina A1 (ThermoFisher/EUA; Cat. nº 71-3400) na diluição de 1:1.000 em câmara úmida a 4°C. Após isso, incubados com o anticorpo secundário biotilado e complexo biotina-estreptavidina (kit Life Technologies/EUA; Histostain®-SP Ref. 95-9943B), e a seguir foram revelados em substrato DAB, contracolorados com Hematoxilina. Para controle da

reação, foi omitido o anticorpo primário. As análises das imunomarcações da proteína foram realizadas por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 255) pelo programa analisador de imagem *Leica Image Analysis*.

A partir dos sobrenadantes do macerado das lesões, que foram previamente padronizados para a mesma concentração proteica com ensaio de Bradford, e estabilizados em solução tampão Tris-HCl contendo Azul de Bromofenol e mercaptoetanol, foi feita corrida de eletroforese em gel de acrilamida a 12% e SDS 0.1%, e transferência para membrana de nitrocelulose. Na membrana, após bloqueio dos sítios inespecíficos, foi aplicado o anticorpo anti-Anexina A1 na diluição de 1:1.000 incubado *overnight* a 4 °C, seguido do anticorpo secundário anti-rabbit na diluição de 1:2:500 (Promega/EUA; Cat. nº W401B) e revelação com DAB. Para controle de carga foi feito o mesmo procedimento de corrida e transferência, mas com uso do anticorpo anti- α -tubulina (Sigma/EUA; Cat. nº T9026), seguido do anticorpo secundário anti-mouse na diluição de 1:1:000 (Promega/EUA; Cat. nº W402B) e revelação com DAB. As bandas reveladas pelo imunoensaio de *Western Blotting* foram comparadas com padrões de peso molecular. A imunomarcação das bandas foi avaliada por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 255) pelo programa analisador de imagem *ImageJ*.

2.9 Quantificação de células imunomarcadas com Gasdermina-D

Para a imunomarcação das células, o mesmo processo descrito no item 2.6 foi aplicado aos cortes apenas das lesões infectadas, mas com o anti-GSDM-D (Biorbyt/Reino Unido; Cat. nº orb390052) na diluição de 1:2.000, por 1h em temperatura ambiente. As análises das imunomarcações da proteína foram realizadas por quantificação de células em várias áreas por animal, por expectador cego e, após, convertidas em 1mm².

2.10 Dosagem de citocinas no macerado das lesões infectadas

A partir do sobrenadante do macerado das lesões foi realizada dosagem da interleucina (IL)-10 e da proteína quimiotática para monócitos/macrófagos (MCP)-1. Para isso, foi utilizado o kit Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead (Merck/EUA; Cat. nº RECYTMAG-65k) e todas as instruções do fabricante foram seguidas. Após adição das beads magnéticas que se conectam aos analitos por meio de anticorpos específicos, das amostras e de incubação pelo tempo indicado, foi adicionado o

anticorpo biotilado de detecção e depois o complexo estraptavidina-ficoeritrina. A análise foi realizada por meio da tecnologia de leitura Luminex xMAP, que se baseia em fluxo de laser duplo, sendo um desses específico à bead e identifica o analito em análise, e o outro capaz de determinar a magnitude do sinal emitido pela ficoeritrina ligada ao imunocomplexo formado na reação. A leitura foi comparada com curva de concentração de padrões fornecidos pelo kit e os resultados foram expressos em pg/mL.

2.11 Análises estatísticas

Os resultados obtidos das imunomarcações, do ensaio de Western Blot e da dosagem de citocinas apresentaram distribuição normal e foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguida do pós-teste de Bonferroni.

3. Resultados

3.1 Caracterização fitoquímica

3.1.1 Terpenos, Compostos fenólicos e alcaloides em EP e FAE

As análises fitoquímicas confirmaram a presença de produtos do metabolismo vegetal de interesse farmacológico. Particularmente, os Sesquiterpenos foram encontrados no EP e na FAE, mas não na FH e ausência de Cumarinas em todas as amostras (Tabela 2).

3.1.2 Análises cromatográficas identificaram Catequinas, Quercetina e outros fitoquímicos em EP e FAE

O triterpeno Lupeol não foi encontrado na pesquisa cromatográfica, no entanto, outro triterpeno foi identificado pelo revelador próprio para esse grupo de fitoquímicos (Figura 2A e B). As análises cromatográficas evidenciaram a presença do flavonoide Quercetina (Figura 2E e F) e, ainda, de outros flavonoides em reação ao revelador NP-PEG em EP e FAE (Figura 2). O flavonoide Catequina também foi identificado no EP e na FAE (Figura 2C e D).

Embora o Ácido Gálico não tenha sido observado (Figura 2G), outros compostos da classe dos fenóis, como taninos, foram confirmados pela reação com ao revelador Cloreto Férrico em FAE e EP (Figura 2H). O alcaloide Berberina, também foi encontrado tanto na FAE como no EP (Figura 2I). Ainda, o relevador de

alcaloides, Dragendorff, também evidenciou a presença de outro alcaloide em outra banda (Figura 2J).

3.1.3 A FAE possui maior atividade antioxidante que EP e FH

Os estudos demonstraram que o EP, a FH e a FAE, possuem, respectivamente, atividade antioxidante de 23,35%; 14,2%; 84,01%.

3.2 Citotoxicidade

3.2.1 EP e frações apresentam baixa toxicidade pelo teste de hemólise

Este estudo mostrou que o FH é o menos citotóxico (Figura 3A e D), porém, essa fração contém menos compostos fitoativos de interesse farmacológico, como terpenos e compostos fenólicos e nitrogenados, conforme demonstrado nas análises fitoquímicas qualitativas e quantitativas e na cromatografia. EP e FAE têm baixa citotoxicidade em uma faixa próxima (Figura 3C e E).

Como EP e FAE apresentaram maior quantidade de compostos fitoativos e atividade antioxidante, eles foram selecionados para o ensaio CAM e atividade antimicrobiana.

3.2.2 EP e FAE não demonstraram citotoxicidade no teste CAM

Não houve diferenças morfológicas e de desenvolvimento embrionário entre os grupos (Figura 4). Todos os embriões estavam vivos no momento da abertura da casca e nenhuma diferença na vascularização da membrana foi observada, seja qualitativamente (Figura 4A, B e C) ou quantitativamente (Figura 4D e E).

3.3 EP em concentração superior a 50% é microbicida

Em relação a atividade antimicrobiana, EP a 10% e a FAE em todas as concentrações testadas não demonstraram inibição do crescimento das bactérias. EP, nas concentrações de 50 e 100%, apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, com a formação de halo de inibição de crescimento da cepa de 0,3 e 0,5 cm, respectivamente (Figura 5).

3.4 As formulações preparadas com gel demonstraram maior estabilidade

No teste de estabilidade, as formulações foram submetidas a centrifugação logo após o seu preparo e a formulação creme-EP mostrou formação de fase (Figura

1 do Material Suplementar). As formulações com creme, especialmente com EP, também demonstraram grande instabilidade na cor e textura, e formação de fases, principalmente aquelas submetidas a luz e ar, aquecimento e ciclos de aquecimento e resfriamento. Nas formulações em gel, especialmente com EP, as alterações foram menos intensas nas mesmas condições. As formulações em gel, com EP e FAE, mantidas em geladeira, não apresentaram alterações organolépticas e houve pouca alteração do pH (Figura 2 e do Material Suplementar Tabelas 1 e 2 do Material Suplementar).

Os testes de estabilidade evidenciaram que as formulações em gel com EP ou FAE a 10% são mais estáveis do que formulações em creme, especialmente se mantidas em geladeira. Portanto, as formulações em gel foram escolhidas para o tratamento tópico das feridas infectadas, sendo que no controle foi utilizado somente o gel, como veículo.

3.5 Análises macroscópicas e histopatológicas das feridas

Após o tratamento das lesões com EP e FAE, nas formulações em gel, foi feita a análise macroscópica e histopatológica que indicaram boa evolução do tratamento das feridas (Figura 6). Os tratamentos com EP e FAE impediram a formação de exudato nas feridas infectadas (Figura 6G, H e I) e na histologia com H&E foi possível observar reepitelização mais rápida, menor edema e melhor reorganização da derme nos grupos tratados. A coloração com Picrossírius permitiu a observação do avanço da organização do colágeno nos grupos não infectados, independente do tratamento (Figura 6D, E e F), mas também, melhor organização tissular dos tecidos tratados (Figura 6E, F, K, L).

3.6 O tratamento com FAE a 10% foi capaz de diminuir a expressão da Anexina A1 nas lesões

Foi observada a modulação na expressão da proteína AnxA1, na epiderme e derme (Figura 7). A AnxA1 é bem expressa nos tecidos dos animais controles e tratados com formulação de EP, infectados ou não (Figura 7A, B, D, E, G e H). Diferentemente, a administração do gel com FAE reduziu a expressão da proteína (Figura 7C, F, G e H) na epiderme das feridas infectadas ou não e na derme das feridas não infectadas. O ensaio de *Western Blotting* corroborou o resultado observado na imuno-histoquímica, mostrando que a expressão da proteína AnxA1

foi reduzida nos grupos tratados com FAE, tanto infectados, como não infectados (Figura 7J).

3.7 Tratamento com FAE diminuiu a quantidade de células imunomarcadas para GSDM-D

As análises de imuno-histoquímica, evidenciaram que o tratamento com FAE a 10% foi eficaz em diminuir a quantidade de células imunomarcadas para a proteína GSDM-D (Controle: $49,96 \pm 8,31$ $p < 0,05$ FAE: $27,65 \pm 4,23$ – Figura 8) e, portanto, possivelmente em progresso de morte celular piroptótica. Já o tratamento com EP, apesar de ter diminuído a quantidade de células imunomarcadas para GSDM-D, não mostrou diferença significativa (EP: $37,58 \pm 7,06$ – Figura 8).

3.8 O tratamento com FAE aumenta a expressão de MCP-1 nas feridas infectadas

A dosagem do analito IL-10 não apresentou diferença significativa entre grupos de tratamentos no macerado das lesões posteriores a 6 dias da indução (Figura 9A). No entanto, nos grupos infectados e tratados com FAE a 10%, houve aumento da expressão de MCP-1 (Figura 9B).

Discussão

O fechamento da ferida e a cicatrização total dos tecidos lesados são eventos complexos que incluem processos como inflamação, reepitelização, formação de tecido de granulação, contração da ferida, entre outros. A partir desses processos, condições patológicas como inflamação crônica, infecções e cicatrizes patológicas podem surgir (Monavarian et al., 2019; Raziyeva et al., 2021; Takeo et al., 2015). Além disso, as feridas na pele impactam os serviços de saúde pública e a qualidade de vida dos pacientes (Millás et al., 2019). Assim, as pesquisas por tratamentos tópicos ou alternativas terapêuticas continuam e, nesse cenário, a investigação por fitoativos ganha destaque.

Existem inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo*, em animais e humanos, que mostram a eficiência de diferentes preparações fitoterápicas com um ou mais tipos de ervas, ou com compostos isolados de ervas medicinais. No tratamento de feridas, compostos fenólicos, alcalóides e saponinas têm demonstrado atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante, além de estimular a angiogênese,

síntese de matriz e proliferação celular na fase de reepitelização (Das; Behera; Pramanik, 2017; Ibrahim et al., 2018; Muniandy et al., 2019; Cesário et al., 2019).

Por esses motivos e em consonância com a política nacional brasileira de plantas medicinais e fitoterápicos, um dos objetivos do nosso estudo foi investigar os compostos fitoativos no extrato alcoólico das folhas de *G. brasiliensis* e suas frações orgânicas, bem como suas atividades antioxidantes e citotóxicas. A busca por terpenóides foi positiva em EP e FAE, o que corrobora outros achados (Dos Santos et al., 1999), embora esses compostos sejam mais raros em extratos polares. A presença do triterpeno Lupeol foi investigada por cromatografia, pois já foi isolado de folhas de *G. brasiliensis* (Corrêa et al., 2009), mas este composto não foi encontrado em nossas soluções extrativas. Essa variação pode estar relacionada ao tempo de coleta do material ou tipo de extração realizada. No entanto, outro triterpeno foi evidenciado na FAE. Os terpenóides são um grupo muito heterogêneo de metabólitos vegetais e relacionados a propriedades anti-inflamatórias, inclusive testados em tumores (Zhu et al., 2018). Compostos nitrogenados como alcalóides também foram encontrados em nossas pesquisas fitoquímicas e cromatográficas em EP e FAE. Os alcalóides são considerados fortes antioxidantes e compostos anti-inflamatórios (Macáková et al., 2019).

Nossa investigação também foi positiva para a presença de compostos fenólicos e corrobora com outros estudos de caracterização fitoquímica de extratos de folhas e outros órgãos de *G. brasiliensis* (Figueiredo et al., 2014; Naves et al., 2019; Arwa et al., 2015; Zan et al., 2018). A pesquisa cromatográfica evidenciou a presença de Catequina e Quercetina em EP e FAE, fenóis que já haviam sido detectados em extratos de folhas da mesma espécie (Zan et al., 2018). Da mesma forma, confirmamos a presença de taninos e do alcaloide Berberina.

Os fenóis parecem ser a classe de compostos mais sintetizada ou mais fácil de extrair de *G. brasiliensis* (Araújo et al., 2019; da Silva et al., 2021; Figueiredo et al., 2014; Naves et al., 2019; Santa-cecília et al., 2011; Arwa et al., 2015; Zan et al., 2018). Vários compostos fenólicos são comuns na alimentação humana e estão relacionados com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. (Zhu et al., 2018). Esses achados também explicam o alto perfil antioxidante encontrado especialmente em FAE, o que corrobora com investigações que testaram a atividade antioxidante de extratos etanólicos de *G. brasiliensis* (Figueiredo et al., 2014; Naves et al., 2019;

Arwa et al., 2015) e extratos etanólicos seguidos de fracionamento com acetato de etila (Zan et al., 2018) pela reação ao DPPH.

Após estabelecer o perfil fitoquímico, testamos a citotoxicidade de diferentes concentrações de EP e suas frações. O ensaio de hemólise mostrou que FH é menos citotóxico que EP e FAE. No entanto, esta fração mostrou a ausência de metabólitos vegetais de interesse farmacológico. Portanto, como EP e FAE não demonstraram alto índice de citotoxicidade, procedeu-se ao teste CAM, considerado um ensaio de avaliação toxicológica *in vivo*, entre outros fins (Kundeková et al., 2021; Ribatti, 2017). Nenhum dos ovos fertilizados injetados com EP ou FAE na câmara de ar apresentou anormalidades. Todos os embriões estavam vivos após 3 dias da injeção de extratos e não apresentaram alterações na vasculogênese.

Definidas as soluções extrativas de acordo com a presença de produtos naturais, procedeu-se à investigação das propriedades microbianas do EP e FAE de *G. brasiliensis* antes de sua aplicação tópica em modelo de lesão infectada. A atividade antimicrobiana de *G. brasiliensis* foi observada em concentrações superiores a 50% de CE, mas não em sua FAE. Diferentemente, outra investigação (Zan et al., 2018) observou atividade antimicrobiana, inclusive em cultura de *S. aureus*, do extrato metanólico de *G. brasiliensis*, em uma fração de acetato de etila na concentração de 10%. Além disso, observaram atividade antimicrobiana dessa mesma fração em culturas de *Escherichia coli* (G-), *Klebsiella pneumoniae* (G-), *Enterococcus faecalis* (G+) e também em culturas de *Candida albicans*. A diferença encontrada em nosso estudo pode estar relacionada ao tipo de extração utilizada.

Diante de nossos dados sobre a presença de compostos de interesse farmacológico encontrados em amostras de EP e FAE, incluindo terpenos, Quercetina, Catequina e Berberina, além de sua alta atividade antioxidante e baixa citotoxicidade, decidimos testar formulações tópicas com EP e FAE, em lesões de animais infectados, para determinar se as soluções extrativas apresentariam proteção antimicrobiana. Portanto, o estudo foi realizado com a indução de lesões e tratamentos e, curiosamente, *in vivo*, tanto EP quanto FAE impediram a formação de exsudato em feridas infectadas.

Embora não tenham sido observadas grandes diferenças macroscópicas no fechamento das lesões entre os grupos, exceto pelo exsudato nos animais com feridas infectadas e não tratadas, a avaliação histológica mostrou reepitelização acelerada e tecido cicatricial mais fino nos grupos tratados com as soluções

extraídas de *G. brasiliensis*. Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, em modelo de queimadura de segundo grau em ratos, também foi observada diminuição do edema e reepitelização acelerada em feridas tratadas com óleo essencial de *Lavandula officinalis* e extrato de *Arctium lappa* (Cesário et al., 2019). Além disso, a organização tecidual e do colágeno apresentou melhora com o tratamento proposto. Esses achados são consistentes com outra investigação (Samadian et al., 2020) que tratou feridas de ratos diabéticos com biomaterial impregnado com Berberina, composto também encontrado em nosso extrato. Em seu estudo, os animais que receberam a cobertura do biomaterial apresentaram menor edema e melhor organização tecidual tanto na coloração de H&E quanto de Masson, que mostra fibras colágenas e está de acordo com os achados da coloração de Picrosirius em nossa investigação.

Após análise histopatológica das feridas, foi realizado o estudo da expressão de AnxA1 e foi possível observar a redução da expressão proteica nos tecidos tratados com FAE a 10%. Existem estudos que relacionam tratamentos fitoterápicos com a modulação da expressão de Anxa1. O tratamento com chá verde aumentou a expressão de AnxA1 em células tumorais do trato urinário (Xiao et al., 2007) e em células de adenocarcinoma pulmonar (Lu et al., 2007) o que foi correlacionado com o bom prognóstico, aumento da adesão celular e diminuição da motilidade através da modulação da actina. Outro estudo, também em células de câncer de pulmão, observou uma diminuição na expressão da Ciclooxygenase-2 (COX-2) através da superexpressão de Anxa1, relacionando também isso a um bom prognóstico (Lu et al., 2012).

Outra investigação (He et al., 2013) encontrou o efeito protetor de Xuebijing, uma formulação chinesa de ervas contendo cinco plantas medicinais, contra infecção generalizada induzida por injeção intraperitoneal de *Acinetobacter baumannii* em ratos *Wistar*. A formulação foi capaz de induzir a superexpressão de AnxA1 em neutrófilos do sangue periférico e diminuir a expressão de citocinas como IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF)- α no plasma dos animais. Por outro lado, outra investigação demonstrou uma diminuição dependente da dose na expressão de AnxA1 em cultura de micróglia de camundongo tratada com Withaferin A, um fitoquímico da classe esteróide lactona (Narayan et al., 2015).

Em modelos de inflamação pulmonar e pré-carcinogênese, estudos do nosso grupo de pesquisa também mostraram a modulação de AnxA1. A piperlongumina

(PL), um composto bioativo extraído da *Piper longum*, manteve alta expressão proteica, mas reduziu os níveis de COX-2 e fator nuclear (NF)-kB (Ashino et al., 2021; Sant'Ana et al., 2020), além de diminuir a proteína do linfoma de células B (Bcl)-2, IL-1 β , IL-17 e TNF- α (Ashino et al., 2021). Em contrapartida, a administração de uma mistura contendo extratos brutos de quatro plantas medicinais (*Arctium lappa*, *Plantago major*, *Mikania glomerata* e *Equisetum arvense*) diminuiu a expressão de AnxA1, NF-kB e citocinas pró-inflamatórias (Possebon et al., 2018), como visto na presente investigação. Esses dados mostram que diferentes extratos ou compostos bioativos podem modular a expressão de AnxA1 de formas variadas.

AnxA1 tem uma forte ação anti-inflamatória, principalmente por inibir a transmigração de neutrófilos e monócitos e também por induzir apoptose. AnxA1 é normalmente superexpresso em condições de inflamação aguda ou crônica e sua expressão é inibida pela administração de corticosteróides (Girol et al., 2021; Possebon et al., 2018; Sant'Ana et al., 2020; Sheikh e Solito, 2018 ; Souza et al., 2017). Assim, a modulação da expressão desta proteína pelo tratamento com FAE sugere um efeito anti-inflamatório e regulador do tratamento tópico. Porém, mesmo sem demonstrar diferença significativa, observou-se aumento da expressão de IL-10 nos tecidos tratados com EP e FAE em relação ao grupo não tratado, no sobrenadante das lesões maceradas 6 dias após sua indução. Tanto a AnxA1 quanto a IL-10 atuam como reguladores e promotores da resolução da inflamação (Ferlazzo et al., 2003; King et al., 2014; Sugimoto et al., 2016), importante para o processo de cicatrização.

A MCP-1 também apresentou expressão aumentada nos grupos infectados e tratados (Figura 10). Os macrófagos são células importantes para o processo de remodelação tecidual durante o fechamento da ferida e podem apresentar tanto um fenótipo pró-inflamatório (M1) quanto um fenótipo anti-inflamatório (M2) (Headland e Norling, 2015). Os polifenóis, principalmente a quercetina, já foram relacionados à capacidade de diminuir o fenótipo das células M1 relacionadas ao processo pró-inflamatório e aumentar o fenótipo M2. As células M2 podem secretar mediadores anti-inflamatórios, promover a fagocitose de leucócitos em apoptose e função de reparo tecidual (Carvalho et al., 2021; Headland e Norling, 2015). Em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, a presença de numerosos macrófagos e altos níveis de MCP-1 foi observada no dia 7 após a indução de queimadura de segundo grau (Souza et al., 2017).

Na literatura, observou-se que a quercetina pode se ligar à molécula AnxA1 e inibir sua atividade pró-tumoral em cultura de células de linfoma (Hirata et al., 2014). Além disso, a quercetina foi diretamente associada a propriedades curativas em estudos *in vitro* e *in vivo*. Um estudo demonstrou que o tratamento tópico com quercetina reduziu a síntese de matriz extracelular, além de aumentar a expressão de moléculas de adesão em culturas de fibroblastos (Doersch e Newell-Rogers, 2017). Outra investigação apontou as propriedades hipoglicemiantes, hipolipídicas e cicatrizantes do fitoativo em feridas de ratos diabéticos (Ahmad et al., 2017). Além disso, a melhora das úlceras de pressão foi observada com o tratamento tópico com quercetina, que acelerou o fechamento da ferida e diminuiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Yin et al., 2018).

A catequina, outro componente encontrado em nossas soluções extrativas, possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e cicatrizantes bem relatadas na literatura (Bernatoniene e Kopustinskiene, 2018). Em um modelo de dermatite induzida pelo reagente de Sanger (1-Fluoro-2,4-dinitrobenzeno), derivados de catequina aplicados topicamente foram capazes de reduzir o inchaço e a expressão de citocinas pró-inflamatórias em camundongos (Nakano et al., 2019). Além disso, a epigalocatequina demonstrou acelerar a cicatrização de lesões em camundongos diabéticos (Huang et al., 2019). Em testes de cicatrização *in vitro* usando fibroblastos humanos, soluções extrativas de *Dioscorea bulbifera*, contendo catequina e quercetina, aceleraram o processo de cicatrização (Chaniad et al., 2020). Todos esses dados reforçam o potencial das soluções extrativas das folhas de *G. brasiliensis* para o tratamento de feridas cutâneas.

Na sequência do estudo, na derme das lesões, analisamos a imunomarcagem da proteína GSDM-D, relacionada ao processo de morte piroptótica. A análise imuno-histoquímica mostrou que o tratamento com EAF foi eficaz na diminuição do número de células positivas para GSDM-D. Essas células imunomarcadas para o GSDM-D eram provavelmente fibroblastos em processo de morte celular piroptótica (Liu et al., 2018). O benefício da formação de poros piroptóticos na membrana das células infectadas é a destruição do sítio de replicação do patógeno e a liberação de mediadores pró-inflamatórios que atrairão os leucócitos para o local infectado. Porém, em excesso, a Piroptose pode causar danos. Assim, a pesquisa de estratégias terapêuticas para inibir a morte celular e outros processos mediados por Gasderminas vem aumentando. Essas estratégias são baseadas na inibição da

clivagem de sítios de inativação da Gasdermina, ou outros mecanismos. Por exemplo, o aminoácido glicina inibe a ruptura celular causada por Gasderminas (Fischer et al., 2021). Outra investigação (Deng et al., 2019) mostrou que um produto natural isolado, um triterpeno, no tratamento da psoríase em camundongos, diminuiu a inflamação e a piroptose, ao reduzir a expressão de GSDM-D. Esses resultados estão de acordo com nossos dados e apoiam o uso de soluções extrativas de *G. brasiliensis* em processos de regeneração da pele.

5. Conclusões

Juntos, nossos dados indicam que os tratamentos com EP e principalmente FAE a 10% incorporados em gel foram eficazes na modulação de mediadores inflamatórios, incluindo AnxA1, e GSDM-D durante o processo de cicatrização de feridas infectadas por *S. aureus*, com implicações terapêuticas e reafirmando *G. brasiliensis* usos tradicionais no tratamento de feridas.

Financiamento: Este trabalho foi financiado pelo Programa de Pesquisa do Centro Universitário Padre Albino [números de concessão PesqMed2019713, PesqPin2021930].

Agradecimentos:

Ao Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)/SP, pela permissão e apoio no uso do Equipamento LUMINEX xMAP MAGPIX.

À Professora Dra. Maria Izabela Ferreira pela ajuda na identificação do espécime de *G. brasiliensis* utilizado neste trabalho, no preparo das exsiccatas e pelo contato com o Herbário.

Referências

- Ahmad M., Sultana M., Raina R., Pankaj N. K., Verma P. K., Prawez S. 2017. Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Wound Healing Potential of Quercetin in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Pharmacogn Mag.* 13, p. 633–9. https://doi.org/10.4103/pm.pm_108_17
- Araújo, F. de O., Moreira, M.E. de C., Lima, C.F., Toledo, R.C.L., de Sousa, A.R., Veloso, M.P., de Freitas, P.G., dos Santos, M.H., de Souza, E.C.G., Mantovani, H.C., Martino, H.S.D., 2019. Bacupari (*Garcinia brasiliensis*) extract modulates intestinal microbiota and reduces oxidative stress and inflammation in obese rats. *Food Res. Int.* 122, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.012>
- Arur, S., Uche, U.E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A.E., Mohler, W., Han, D.K., 2003. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev. Cell* 4, 587–598. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00090-X)
- Arwa, P. S., Zeraik, M.L., Ximenes, V. F., Da Fonseca, L.M., Bolzani, V. S., Silva, D.H.S., 2015. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. *J. Ethnopharmacol.* 174, 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.041>
- Ashino, T.E.B., Sanf Ana, M.L., Yoshikawa, A.H., Possebon, L., de Souza Costa, S., Iyomasa-Pilon, M.M., Souza, H.R., Gonçalves, G.A., Oliani, S.M., Girol, A.P., 2021. Protective effects of piperlongumin in the prevention of inflammatory damage caused by pulmonary exposure to benzopyrene carcinogen. *Int. Immunopharmacol.* 101, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108285>
- Assis, D.M., Gontijo, V.S., Pereira, I.D.O., Nogueira, J.A., Camps, I., Nagem, T.J., Ellena, J., Izidoro, M.A., Luis, I., Meza, N., Barros, T. De, Doriguetto, A.C., Henrique, M., Juliano, M.A., 2012. Inhibition of cysteine proteases by a natural biflavone: behavioral evaluation of fukugetin as papain and cruzain inhibitor 1–10. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.668539>
- Alves C. T. R. R., Junqueira E. M. D., Sandoval-Filho C. de L., Antonio J. C., Iyomasa-Pilon M. M., Souza H. R., Girol A. P., 2021. Cutaneous wound healing modulation of lesions infected by *Staphylococcus epidermidis* and treated with 4% stabilized sodium hypochlorite solution. *World J. Biol. Pharm. Heal. Sci.* 7, 032–042. <https://doi.org/10.30574/wjbphs.2021.7.2.0077>

- Bernatoniene, J., Kopustinskiene, D.M., 2018. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules* 23, 1–11.
<https://doi.org/10.3390/molecules23040965>
- Boccolini, P. M. M., Boccolini, C. S., 2020. Prevalence of complementary and alternative medicine (CAM) use in Brazil. *BMC Complement. Med. Ther.* 20, 51.
<https://doi.org/10.1186/s12906-020-2842-8>
- Carvalho, M.T.B., Araújo-Filho, H.G., Barreto, A.S., Quintans-Júnior, L.J., Quintans, J.S.S., Barreto, R.S.S., 2021. Wound healing properties of flavonoids: A systematic review highlighting the mechanisms of action. *Phytomedicine* 90.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153636>
- Castro A. P., Mattos A. C. A., Pereira N. A., Anchieta N. F., Silva M. S., Dias D. F., Silva C. A., Barros G.V., Souza R. L. M., Santos M.H., Marques M.J . 2015. Potent Schistosomicidal Constituents from *Garcinia brasiliensis*. *Planta Med.* 81, 733–741. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1545927>
- Cesário, J. C. B., Prette, I. B., Forgerini, I., Santis, R., M. De, Iyomasa-Pilon, M. M., Glad, B. G., da S., G. P. R., Souza, H. R., Possebon, L., Pereira, M.L.G., Moreno, A. H., Girol, A.P., 2019. Healing effects of *Lavandula officinalis* essential oil associated with *Arctium lappa* extract in a second degree burn model 7, 1–12. <https://doi.org/10.15413/ajmp.2018.0197>
- Chaniad, P., Tewtrakul, S., Sudsai, T., Langyanai, S., Kaewdana, K., 2020. Anti-inflammatory, wound healing and antioxidant potential of compounds from *Dioscorea bulbifera* L. bulbils. *PLoS One* 15, 1–14.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243632>
- Coelho, L.P., Serra, M.F., Pires, A.L.D.A., Cordeiro, R.S.B., Silva, P.M.R., Dos Santos, M.H., Martins, M.A., 2008. 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 206–214.
<https://doi.org/10.1124/jpet.108.138032>
- Corrêa, R.S., Coelho, C.P., Dos Santos, M.H., Ellena, J., Doriguetto, A.C., 2009. Lupeol. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 65, 97–99.
<https://doi.org/10.1107/S0108270109004910>
- Cristina, A., Lima, R.A., 2016. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. 20, 381–388.
<https://doi.org/10.5902/2236117019537>

- da Silva, C.A., Rosa, I.A., de Souza, T.C., Dos Santos, M.H., 2021. Evaluating four modes of extraction to analyze bioactive compounds in *Garcinia brasiliensis* (bacupari) by high-performance liquid chromatography diode-array detection (HPLC-DAD). *Nat. Prod. Res.* 35, 4073–4077.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1716344>
- Dahanayake, J.M., Perera, P.K., Galappatty, P., Perera, H.D.S.M., Arawwawala, L.D.A.M., 2019. Comparative Phytochemical Analysis and Antioxidant Activities of Tamalakyadi Decoction with Its Modified Dosage Forms. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6037137>
- Dai, T., Kharkwal, G.B., Tanaka, M., Huang, Y.-Y., Bil de Arce, V.J., Hamblin, M.R., 2011. Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence* 2, 296–315. <https://doi.org/10.4161/viru.2.4.16840>
- Das, U., Behera, S.S., Pramanik, K., 2017. Ethno-Herbal-Medico in Wound Repair: An Incisive Review. *Phyther. Res.* 31, 579–590. <https://doi.org/10.1002/ptr.5786>
- Del Gaudio, P., De Cicco, F., Aquino, R.P., Picerno, P., Russo, P., Dal Piaz, F., Bizzarro, V., Belvedere, R., Parente, L., Petrella, A., 2015. Evaluation of in situ injectable hydrogels as controlled release device for ANXA1 derived peptide in wound healing. *Carbohydr. Polym.* 115, 629–633.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.040>
- Deng, G., Chen, W., Wang, P., Zhan, T., Zheng, W., Gu, Z., Wang, X., Ji, X., Sun, Y., 2019. Inhibition of NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in macrophage by cycloastragenol contributes to amelioration of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice. *Int. Immunopharmacol.* 74, 105682.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105682>
- Doersch, K.M., Newell-Rogers, M.K., 2017. The impact of quercetin on wound healing relates to changes in αV and $\beta 1$ integrin expression. *Exp. Biol. Med.* 242, 1424–1431. <https://doi.org/10.1177/1535370217712961>
- Dos Santos, M.H., Nagem, T.J., De Oliveira, T.T., Braz-Filho, R., 1999. 7-epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. *Quim. Nova* 22, 654–660.
<https://doi.org/10.1590/s0100-40421999000500005>
- Doshi, G., Une, H., 2016. Quantification of quercetin and rutin from *Benincasa hispida* seeds and *Carissa congesta* roots by high-performance thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Pharmacognosy*

- Res. 8, 37–42. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.171098>
- Dourado, R.S., Ladeira, Â.M., 2008. Identificação de flavonoides em *Hypericum cordatum* (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). Rev. Bras. Bot. 31, 611–620. <https://doi.org/10.1590/s0100-84042008000400007>
- Eliza, M., Moreira, D.C., Isabel, D., Natal, G., Celi, R., Toledo, L., Medina, N., Machado, S., Ribeiro, R., Benjamin, A., Paranho, M., Henrique, M., Santos, D., Stampini, H., Martino, D., 2017. Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. J. Funct. Foods 29, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.11.001>
- Espirito Santo, B.L.S. do, Santana, L.F., Kato Junior, W.H., de Araújo, F. de O., Bogo, D., Freitas, K. de C., Guimarães, R. de C.A., Hiane, P.A., Pott, A., Filiú, W.F. de O., Arakaki Asato, M., Figueiredo, P. de O., Bastos, P.R.H. de O., 2020. Medicinal Potential of Garcinia Species and Their Compounds. Molecules 25, 1–30. <https://doi.org/10.3390/molecules25194513>
- Ferlazzo, V., D'Agostino, P., Milano, S., Caruso, R., Feo, S., Cillari, E., Parente, L., 2003. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. Int. Immunopharmacol. 3, 1363–9. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(03\)00133-4](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(03)00133-4)
- Figueiredo, S.A., Vilela, F.M.P., Silva, C.A. Da, Cunha, T.M., Dos Santos, M.H., Fonseca, M.J.V., 2014. *In vitro* and *in vivo* photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 131, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.01.004>
- Fischer, F.A., Chen, K.W., Bezbradica, J.S., 2021. Posttranslational and Therapeutic Control of Gasdermin-Mediated Pyroptosis and Inflammation. Front. Immunol. 12, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.661162>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E.H., Barlev, N.A., Bazan, N.G., Bernassola, F., Bertrand, M.J.M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F.K.M., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J.R., Czabotar, P.E., D'Angiolella, V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi,

- V., De Maria, R., Debatin, K.M., Deberardinis, R.J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V.M., Dixon, S.J., Duckett, C.S., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Elrod, J.W., Fimia, G.M., Fulda, S., García-Sáez, A.J., Garg, A.D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D.R., Greene, L.A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Harris, I.S., Hengartner, M.O., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M., Joseph, B., Jost, P.J., Juin, P.P., Kaiser, W.J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R.N., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lee, S.W., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., López-Otín, C., Lowe, S.W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J.C., Martin, S.J., Martinou, J.C., Medema, J.P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E.A., Molkentin, J.D., Moll, U.M., Muñoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nuñez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J.M., Pereira, D.M., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H.M., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M.P., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Ryan, K.M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H.U., Sistigu, A., Stockwell, B.R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S.W.G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M.G., Villunger, A., Virgin, H.W., Vousden, K.H., Vucic, D., Wagner, E.F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J.A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G., Kroemer, G., 2018. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Girol, A.P., Zanon, C.D.F., Caruso, Í.P., Costa, S.D.S., Souza, H.R., Oliani, S.M., 2021. Anti-Inflammatory Profiles in Endotoxin-Induced Uveitis 1–17.
- Glavnik, V., Simonovska, B., Vovk, I., 2009. Densitometric determination of (+)-catechin and (-)-epicatechin by 4-dimethylaminocinnamaldehyde reagent. *J. Chromatogr. A* 1216, 4485–4491. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.026>
- Gobbetti, T., Cooray, S.N., 2016. Annexin A1 and resolution of inflammation: Tissue repairing properties and signalling signature. *Biol. Chem.* 397, 981–993. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0200>
- Han, P.F., Che, X. Da, Li, H.Z., Gao, Y.Y., Wei, X.C., Li, P.C., 2020. Annexin A1

involved in the regulation of inflammation and cell signaling pathways. Chinese J. Traumatol. - English Ed. 23, 96–101.

<https://doi.org/10.1016/j.cjtee.2020.02.002>

He, X. Di, Wang, Y., Wu, Q., Wang, H.X., Chen, Z.D., Zheng, R.S., Wang, Z.S., Wang, J. Bin, Yang, Y., 2013. Xuebijing protects rats from sepsis challenged with *Acinetobacter baumannii* by promoting annexin A1 expression and inhibiting proinflammatory cytokines secretion. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/804940>

Headland, S.E., Norling, L. V., 2015. The resolution of inflammation: Principles and challenges. Semin. Immunol. 27, 149–160.

<https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.014>

Hemshekhar, M., Sunitha, K., Santhosh, M.S., Devaraja, S., Kemparaju, K., Vishwanath, B.S., Niranjana, S.R., Girish, K.S., 2011. An overview on genus garcinia: Phytochemical and therapeutical aspects. Phytochem. Rev. 10, 325–351. <https://doi.org/10.1007/s11101-011-9207-3>

Hirata, F., Harada, T., Corcoran, G.B., Hirata, A., 2014. Dietary flavonoids bind to mono-ubiquitinated annexin A1 in nuclei, and inhibit chemical induced mutagenesis. Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 759, 29–36.

<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.11.002>

Ibrahim, N. 'Izzah, Wong, S.K., Mohamed, I.N., Mohamed, N., Chin, K.Y., Ima-Nirwana, S., Shuid, A.N., 2018. Wound healing properties of selected natural products. Int. J. Environ. Res. Public Health 15.

<https://doi.org/10.3390/ijerph15112360>

King, A., Balaji, S., Le, L.D., Crombleholme, T.M., Keswani, S.G., 2014. Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. Adv. wound care 3, 315–323. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0461>

Kumar, S., Sharma, S., Chattopadhyay, S.K., 2013. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from Garcinia and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance. Fitoterapia 89, 86–125.

<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.05.010>

Kundeková, B., Máčajová, M., Meta, M., Čavarga, I., Bilčík, B., 2021. Chorioallantoic membrane models of various avian species: Differences and applications. Biology (Basel). 10, 1–24. <https://doi.org/10.3390/biology10040301>

Leoni, G., Neumann, P.A., Sumagin, R., Denning, T.L., Nusrat, A., 2015. Wound

- repair: role of immune-epithelial interactions. *Mucosal Immunol.* 8, 959–968.
<https://doi.org/10.1038/mi.2015.63>
- Liu, W., Liu, J., Wang, W., Wang, Y., Ouyang, X., 2018. NLRP6 Induces Pyroptosis by Activation of Caspase-1 in Gingival Fibroblasts. *J. Dent. Res.* 97, 1391–1398.
<https://doi.org/10.1177/0022034518775036>
- Lu, Q.Y., Jin, Y.S., Zhang, Z.F., Le, A.D., Heber, D., Li, F.P., Dubinett, S.M., Rao, J.Y., 2007. Green tea induces annexin-I expression in human lung adenocarcinoma A549 cells: Involvement of annexin-I in actin remodeling. *Lab. Investig.* 87, 456–465. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700534>
- Macáková, K., Afonso, R., Saso, L., Mladěnka, P., 2019. The influence of alkaloids on oxidative stress and related signaling pathways. *Free Radic. Biol. Med.* 134, 429–444. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.026>
- Machado-santelli, G.M., Lago, J.H.G., Santos, M.H., 2015. 7-Epiclusianone, a Benzophenone Extracted from *Garcinia brasiliensis* (Clusiaceae), Induces Cell Cycle Arrest in G1/S Transition in A549 Cells 12804–12816.
<https://doi.org/10.3390/molecules200712804>
- Martins, T., Doriguetto A.C., de Souza, T. C, de Souza K.R.D., Dos Santos M. H., Moreira, M.E.C., Barbosa, L.C.A 2008. Composition , and Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Volatile Oil from the Fruit Peel of *Garcinia brasiliensis* 5, 251–258. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890022>
- Millás, A., Lago, J., Vasquez-Pinto, L., Massaguer, P., Maria-Engler, S.S., 2019. Approaches to the development of 3d bioprinted skin models: the case of natura cosmetics. *Int. J. Adv. Med. Biotechnol. - IJAMB* 2, 03.
<https://doi.org/10.25061/2595-3931/ijamb/2019.v2i1.24>
- Monavarian, M., Kader, S., Moeinzadeh, S., Jabbari, E., 2019. Regenerative Scar-Free Skin Wound Healing. *Tissue Eng. - Part B Rev.* 25, 294–311.
<https://doi.org/10.1089/ten.teb.2018.0350>
- Moreira, M.E. de C., Natal, D.I.G., Toledo, R.C.L., Ramirez, N.M., Ribeiro, S.M.R., Benjamin, L. dos A., de Oliveira, L.L., Rodrigues, D.A., Antônio, J.D., Veloso, M.P., Dos Santos, M.H., Martino, H.S.D., 2017. Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. *J. Funct. Foods* 29, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.11.001>
- Morgan, M.J., Liu, Z.G., 2013. Programmed cell death with a necrotic-like phenotype. *Biomol. Concepts* 4, 259–275. <https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0056>

- Muniandy, K., Gothai, S., Arulselvan, P., Kumar, S.S., Norhaizan, M.E., Umamaheswari, A., Fakurazi, S., 2019. Wound healing potential of edible plants. *Pak. J. Pharm. Sci.* 32, 703–707.
- Nakano, E., Kamei, D., Murase, R., Taki, I., Karasawa, K., Fukuhara, K., Iwai, S., 2019. Anti-inflammatory effects of new catechin derivatives in a hapten-induced mouse contact dermatitis model. *Eur. J. Pharmacol.* 845, 40–47.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.12.036>
- Narayan, M., Seeley, K.W., Jinwal, U.K., 2015. Identification and quantitative analysis of cellular proteins affected by treatment with withaferin a using a SILAC-based proteomics approach. *J. Ethnopharmacol.* 175, 86–92.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.024>
- Naves, V.M.L., dos Santos, M.H., Ribeiro, I.S., da Silva, C.A., Silva, N.C., da Silva, M.A., da Silva, G.A., Dias, A.L.T., Ionta, M., Dias, D.F., 2019. Antimicrobial and antioxidant activity of *Garcinia brasiliensis* extracts. *South African J. Bot.* 124, 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.021>
- Neves, J.S., Coelho, L.P., Cordeiro, R.S.B., Veloso, M.P., Silva, P.M.R., Dos Santos, M.H., Martins, M.A., 2007. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. *Planta Med.* 73, 644–649. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981534>
- Pereira, I.O., Assis, D.M., Juliano, M.A., Cunha, R.L.O.R., Barbieri, C.L., Do Sacramento, L.V.S., Marques, M.J., Dos Santos, M.H., 2011. Natural products from *Garcinia brasiliensis* as Leishmania protease inhibitors. *J. Med. Food* 14, 557–562. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0018>
- Possebon, L., Lebron, I.S.L., da Silva, L.F., Paletta, J.T., Glad, B.G., Sant’Ana, M., Iyomasa-Pilon, M.M., Souza, H.R., Costa, S.S., Rodrigues, G.P.S., Pereira, M. de L., Moreno, A.H., Girol, A.P., 2018. Anti-inflammatory actions of herbal medicines in a model of chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke. *Biomed. Pharmacother.* 99, 591–597.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.106>
- Rathee, Deepti, Rathee, S., Rathee, P., Deep, A., Anandjiwala, S., Rathee, Dharmender, 2015. HPTLC densitometric quantification of stigmasterol and lupeol from *Ficus religiosa*. *Arab. J. Chem.* 8, 366–371.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.01.021>
- Raziyeva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., Saparov, A., 2021.

- Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules* 11, 1–25.
<https://doi.org/10.3390/biom11050700>
- Ribatti, D., 2017. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod. Toxicol.* 70, 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.11.004>
- Sales, L., Pezuk, J.A., Borges, K.S., Brassesco, M.S., Scrideli, C.A., Tone, L.G., Henrique, M., Ionta, M., Oliveira, J.C. De, 2015. Anticancer activity of 7-epiclusianone, a benzophenone from *Garcinia brasiliensis*, in glioblastoma. *BMC Complement. Altern. Med.* 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0911-1>
- Samadian, H., Zamiri, S., Ehterami, A., Farzamfar, S., Vaez, A., Khastar, H., Alam, M., Ai, A., Derakhshankhah, H., Allahyari, Z., Goodarzi, A., Salehi, M., 2020. Electrospun cellulose acetate/gelatin nanofibrous wound dressing containing berberine for diabetic foot ulcer healing: *in vitro* and *in vivo* studies. *Sci. Rep.* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65268-7>
- Sant’Ana, M., Souza, H.R., Possebon, L., Cornélio, M.L., Riffo-Vasquez, Y., Girol, A.P., Oliani, S.M., 2020. Effect of piperlongumine during exposure to cigarette smoke reduces inflammation and lung injury. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 61, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2020.101896>
- Santa-Cecília, F. V., Santos, G.B., Fuzissaki, C.N., Derogis, P.B.M.C., Freitas, L.A.S., Gontijo, V.S., Stringheta, P.C., Nagem, T.J., Brigagão, M.R.P.L., Santos, M.H.D., 2012. 7-Epiclusianone, the Natural Prenylated Benzophenone, Inhibits Superoxide Anions in the Neutrophil Respiratory Burst. *J. Med. Food* 15, 200–205. <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0043>
- Santa-Cecília, F. V., Vilela, F.C., Da Rocha, C.Q., Dias, D.F., Cavalcante, G.P., Freitas, L.A.S., Dos Santos, M.H., Giusti-Paiva, A., 2011. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. *J. Ethnopharmacol.* 133, 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.09.036>
- Santa-cecília, F. V, Vilela, F.C., Cláudia, Q., Dias, D.F., Cavalcante, G.P., Freitas, L.A.S., Marcelo, H., Giusti-paiva, A., 2011. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis* 133, 467–473.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.09.036>
- Scannell, M., Maderna, P., 2006. Lipoxins and annexin-1: resolution of inflammation and regulation of phagocytosis of apoptotic cells. *ScientificWorldJournal.* 6, 1555–73. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.259>
- Shailajan, S., Patil, Y., Joshi, M., Menon, S., Mhatre, M., 2019. Simultaneous

- Quantification of Pharmacological Markers Quercetin and Berberine Using High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) from a Polyherbal Formulation *Pushyanuga Churna*. J. AOAC Int. 102, 1003–1013. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0380>
- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., Verdian-rizi, M., 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. Journal Appl Hort 32, 17–20. http://www.horticultureresearch.net/jah/2010_12_1_69_70.PDF
- Sheikh, M.H., Solito, E., 2018. Annexin A1: Uncovering the many talents of an old protein. Int. J. Mol. Sci. 19, 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms19041045>
- Shi, J., Gao, W., Shao, F., 2017. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. Trends Biochem. Sci. 42, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.10.004>
- Silva, P.M.F., Veloso, M.P., Santos, M.H. Dos, 2009. Antimicrobial Activity of Benzophenones and Extracts from the Fruits of *Garcinia brasiliensis* 12, 403–407. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.0622>
- Souza, H.R., De Azevedo, L.R., Possebon, L., De Souza Costa, S., Iyomasa-Pilon, M.M., Oliani, S.M., Girol, A.P., 2017. Heterogeneity of mast cells and expression of Annexin A1 protein in a second degree burn model with silver sulfadiazine treatment. PLoS One 12, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173417>
- Sugimoto, M.A., Sousa, L.P., Pinho, V., Perretti, M., Teixeira, M.M., 2016. Resolution of inflammation: What controls its onset? Front. Immunol. 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00160>
- Takeo, M., Lee, W., Ito, W., 2015. Wound Healing and Skin Regeneration. Cold Spring Harb Perspect Med 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023267>
- Trentin, P.G., T Ferreira, T.P., Arantes, a C.S., Ciambarella, B.T., Cordeiro, R.S.B., Flower, R.J., Perretti, M., Martins, M. a, Silva, P.M.R., 2015. Annexin A1-mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice. Br. J. Pharmacol. n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/bph.13109>
- Vovk, I., Simonovska, B., Vuorela, H., 2005. Separation of eight selected flavan-3-ols on cellulose thin-layer chromatographic plates. J. Chromatogr. A 1077, 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.096>
- Wei, L., Zhang, W., Yin, L., Yan, F., Xu, Y., Chen, F., 2015. Extraction optimization of total triterpenoids from *Jatropha curcas* leaves using response surface methodology and evaluations of their antimicrobial and antioxidant capacities.

- Electron. J. Biotechnol. 18, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.005>
- Xiao, G.S., Jin, Y.S., Lu, Q.Y., Zhang, Z.F., Beldegrun, A., Figlin, R., Pantuck, A., Yen, Y., Li, F., Rao, J.Y., 2007. Annexin-I as a potential target for green tea extract induced actin remodeling. *Int. J. Cancer* 120, 111–120. <https://doi.org/10.1002/ijc.22164>
- Yin, G., Wang, Zhijing, Wang, Zhaoxia, Wang, X., 2018. Topical application of quercetin improves wound healing in pressure ulcer lesions. *Exp. Dermatol.* 27, 779–786. <https://doi.org/10.1111/exd.13679>
- Zan, R.A., Fernandes, Â., Jedoz, S., Oludemi, T., Calhelha, R.C., Pires, T.C.S.P., Alves, M.J., Martins, R.C.C., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Bioactive properties and phytochemical assessment of Bacupari-anão (*Garcinia brasiliensis* Mart.) leaves native to Rondônia, Brazil. *Food Funct.* 9, 5621–5628. <https://doi.org/10.1039/c8fo01474d>
- Zhu, F., Du, B., Xu, B., 2018. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58, 1260–1270. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1251390>

Tabela 1. Padrões e suas diluições, fases móveis e derivatização utilizados em HPTLC.

Padrão	Fase Móvel	Derivatização
Lupeol – Sigma 18692 – 100 µg/mL (Etanol)	Tolueno / Metanol (9:1) (Rathee et al., 2015)	1 g de vanilina em 15 mL de ácido acético e 35 mL de ácido sulfúrico. 1 mL dessa solução de ácidos foi diluída 100 X em etanol (Wei et al., 2015)
Catequina - Sigma C1251 - 500 µg/mL (Metanol)	Acetato de Etila / Tolueno / Metanol / Ácido Fórmico (70:30:10:5)	1 g de vanilina em 30 mL de ácido acético foi acidionado a 70 mL de ácido fosfórico. Essa solução de ácidos foi diluída em etanol na proporção de 30/70 (Glavnik et al., 2009; Vovk et al., 2005)
Quercetina - Sigma Q4951100 - µg/mL (Metanol)	Tolueno / Acetato de Etila / Ácido Fórmico (5:4:0,2) (Doshi and Une, 2016)	NP-PEG 1% observado em UV (Dourado and Ladeira, 2008)
Ácido Gálico - Dinâmica1274- 100 µg/mL (Metanol)	Tolueno / Acetato de Etila / Ácido Fórmico (5:4:0,2) (Doshi and Une, 2016)	FeCl ₃ 0,2% (Possebon et al., 2018)
Berberina – Sigma B2151100 - µg/mL (Metanol)	Tolueno / Acetato de Etila / Metanol / Ácido Fórmico (6:6:3:0,3) (Shailajan et al., 2019)	Dragendorff 1% (Dahanayake et al., 2019; Possebon et al., 2018)

Tabela 2: Resultados da pesquisa qualitativa e quantitativa de fitoquímicos em EP, FH e FAE.

	Terpenos	Compostos fenólicos			Compostos nitrogenados
	Sesquiterpenos (Presença)	Polifenóis totais	Flavonoides totais	Cumarinas (Presença)	Alcaloides totais
EP	+	18,42 µg/mL	7,8 µg/mL	-	240,58µg/mL
FH	-	0,05 µg/mL	0,05 µg/mL	-	0,45 µg/mL
FAE	+	5,08 µg/mL	5,38 µg/mL	-	136,21 µg/mL

Figura 1. Representação esquemática dos grupos experimentais.

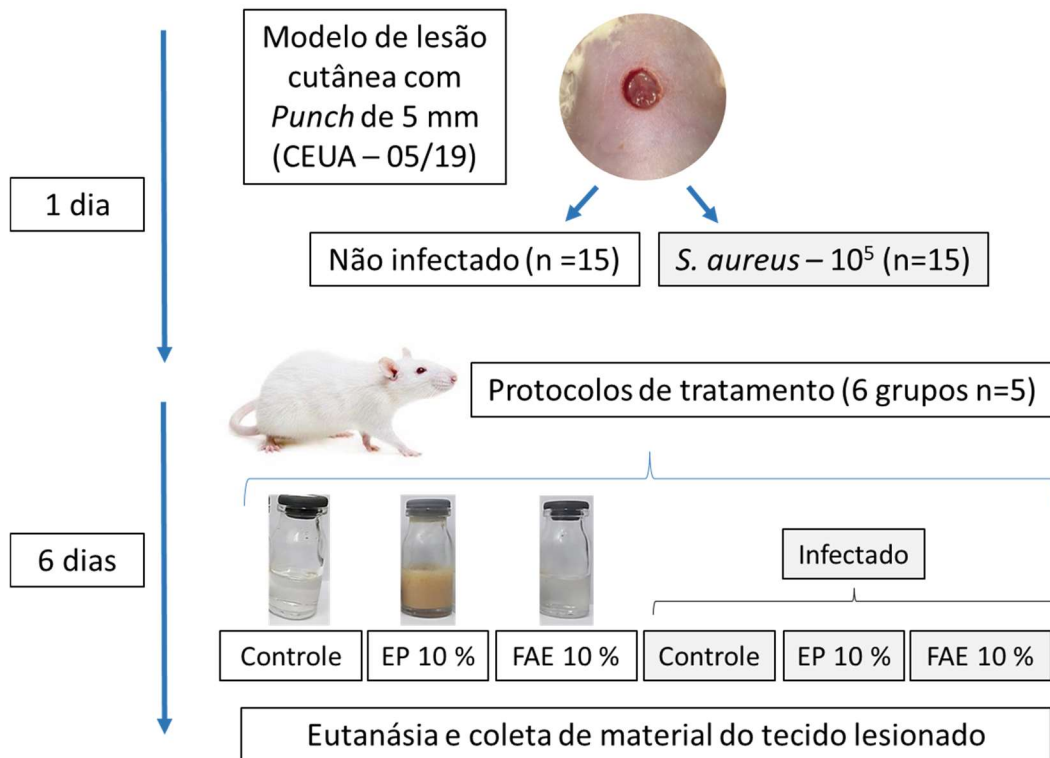


Figura 2. Resultados da pesquisa de fitoquímicos por HPTLC: A) não há banda correspondente em nenhuma das amostras para o padrão Lupeol. B) Cabeça de seta indica triterpeno revelado em FAE. Em C) e D) setas indicam bandas correspondentes ao padrão Catequina em EP e FAE. Em D) cabeças de seta indicam outra banda correspondente a um outro tipo de catequina. E) e F) padrão Quercetina, setas indicam a presença do composto em bandas correspondentes em FAE e EP e, em F) cabeças de setas indicam presença de outros flavonoides em outras bandas que reagiram ao revelador NP-PEG. (G) não há banca correspondente em nenhuma das amostras ao Ácido Gálico; H) as cabeças de setas mostram taninos em outras bandas de FAE e EP. Banda correspondente à Berberina (I) em FAE e EP e, J) outra banda indicada pela cabeça de seta reagiu igualmente ao revelador de alcaloides.

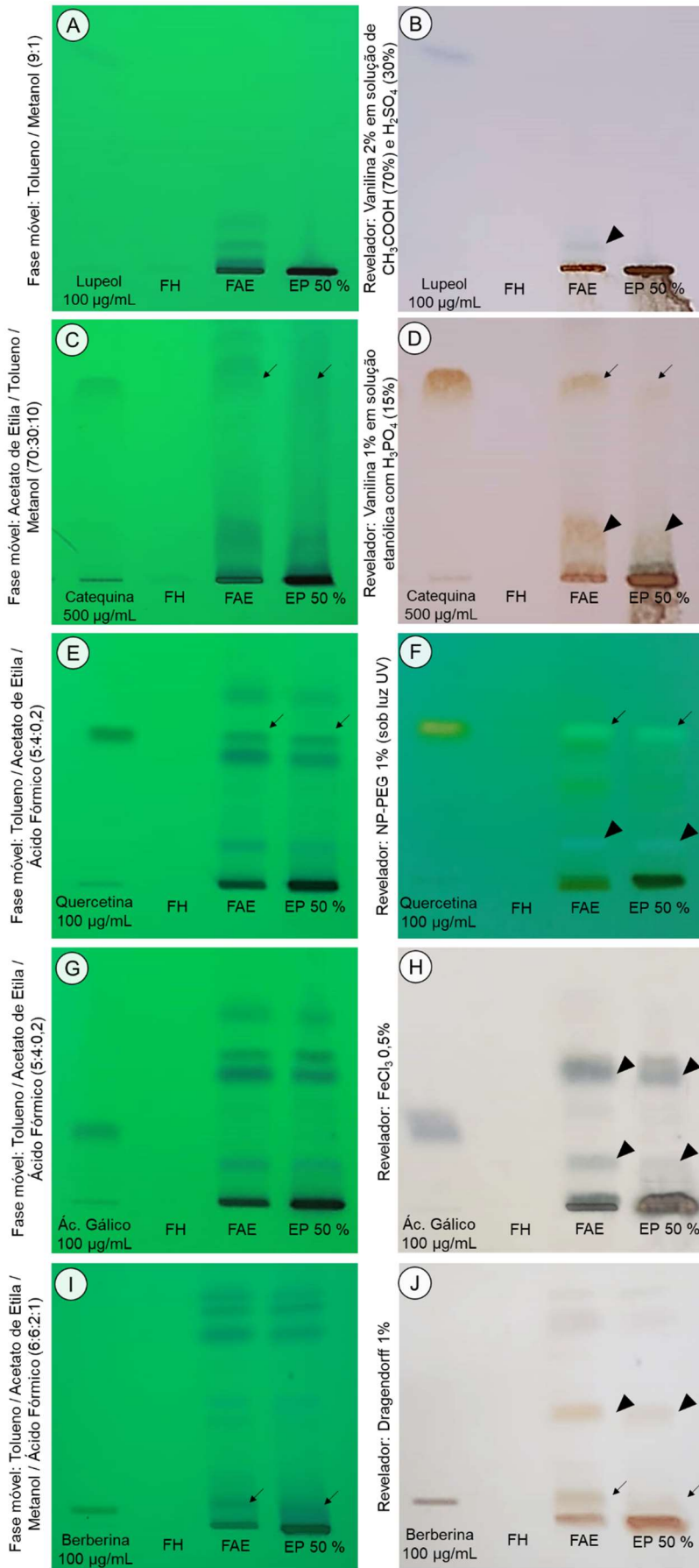


Figura 3. Teste de citotoxicidade *in vitro* com hemólise: A) comparação das absorvâncias da hemólise provocadas pelas amostras. B) Controles positivo e negativo com 0,1% de Triton. C) EP, D) FH e E) FAE.

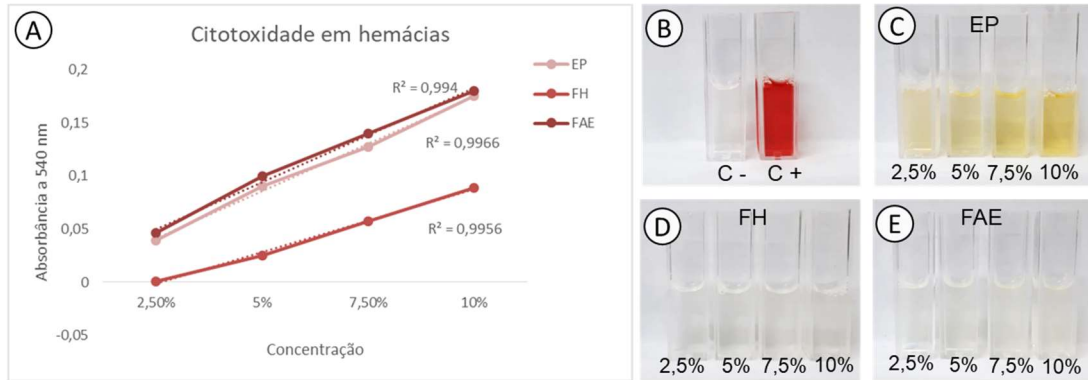


Figura 4. Teste de citotoxicidade *in vivo/in ovo* CAM: A) ovo controle, onde foi injetado soro. Em B) ovo que recebeu EP a 10 % e; em C) ovo que recebeu FAE a 10 %. Não se observa alterações na vascularização da membrana CAM. Setas indicam o coração dos embriões. Em D) dados quantitativos referentes a vasos sanguíneos quantificados na intersecção das linhas.

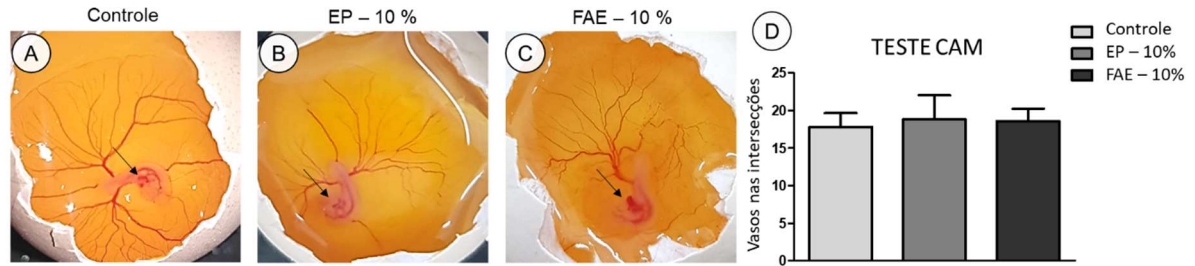


Figura 5. Teste da atividade antimicrobiana: A) setas indicam halos de inibição de crescimento microbiano nas concentrações de 50 e 100% de EP. Controles positivos com os antibióticos B) Vancomicina e C) Ampicilina.

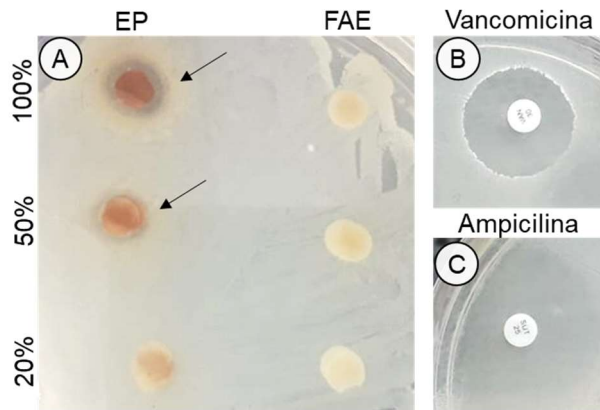


Figura 6. Registro das lesões no 6º dia após indução e histopatologia: Feridas não infectadas e tratadas com A) veículo (gel puro), B) EP a 10% e C) FAE a 10%. Feridas infectadas e tratadas com D) veículo, E) EP a 10% e F) FAE a 10%. Os detalhes mostram características macroscópicas das lesões, e, no detalhe em D), é possível observar formação de exudato no Controle-Infectado. Setas indicam reepitelização. Colorações: HE em A), B), C), G), H) e I); Picrosírius em D), E), F), J), K) e L).

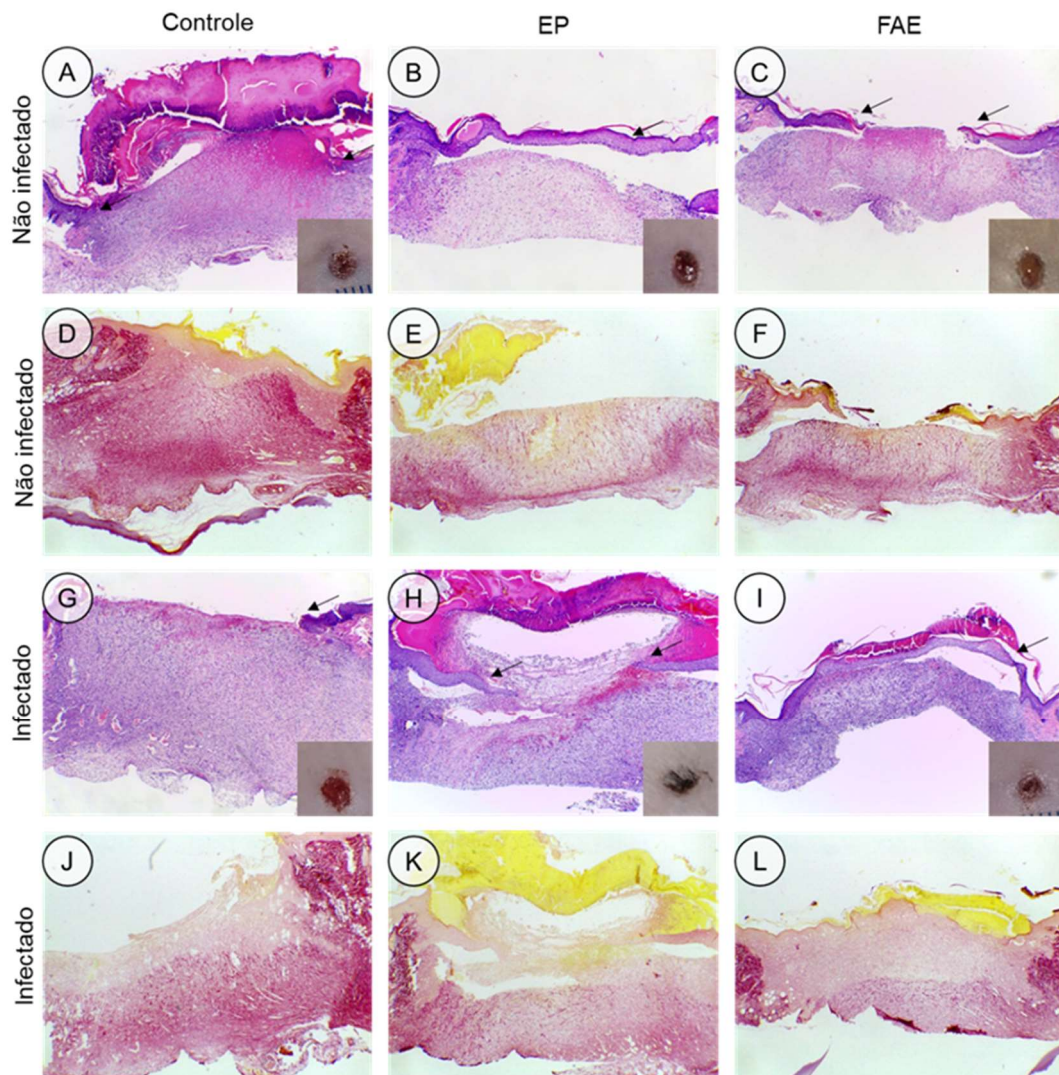


Figura 7. Estudo da expressão da AnxA1 na epiderme e derme: imunomarcção das lesões em A) controle; D) controle infectado; B) lesão não infectada e E) infectada de animais tratados com EP (10 %); C) lesão não infectada e F) infectada de animais tratados com FAE (10 %), sendo essas, menos imunomarcadas. Análises densitométricas (Unidades Arbitrárias de 0 a 255) mostram as diferenças entre os grupos na epiderme (G) e derme (H). Os valores são apresentados como média \pm S.E.M. (n=5/grupo). Contra-coloração: hematoxilina de Harris. (I) Ausência de imunorreatividade no controle da reação. Barras de 50 μ m. Em J) ensaio de Western Blotting evidenciando as bandas da AnxA1 intacta e clivada em todos os grupos. K) Densitometria das bandas de AnxA1 no Western Blotting: * EP $p > 0,05$ vs Controle e $p > 0,01$ vs Controle infectado.

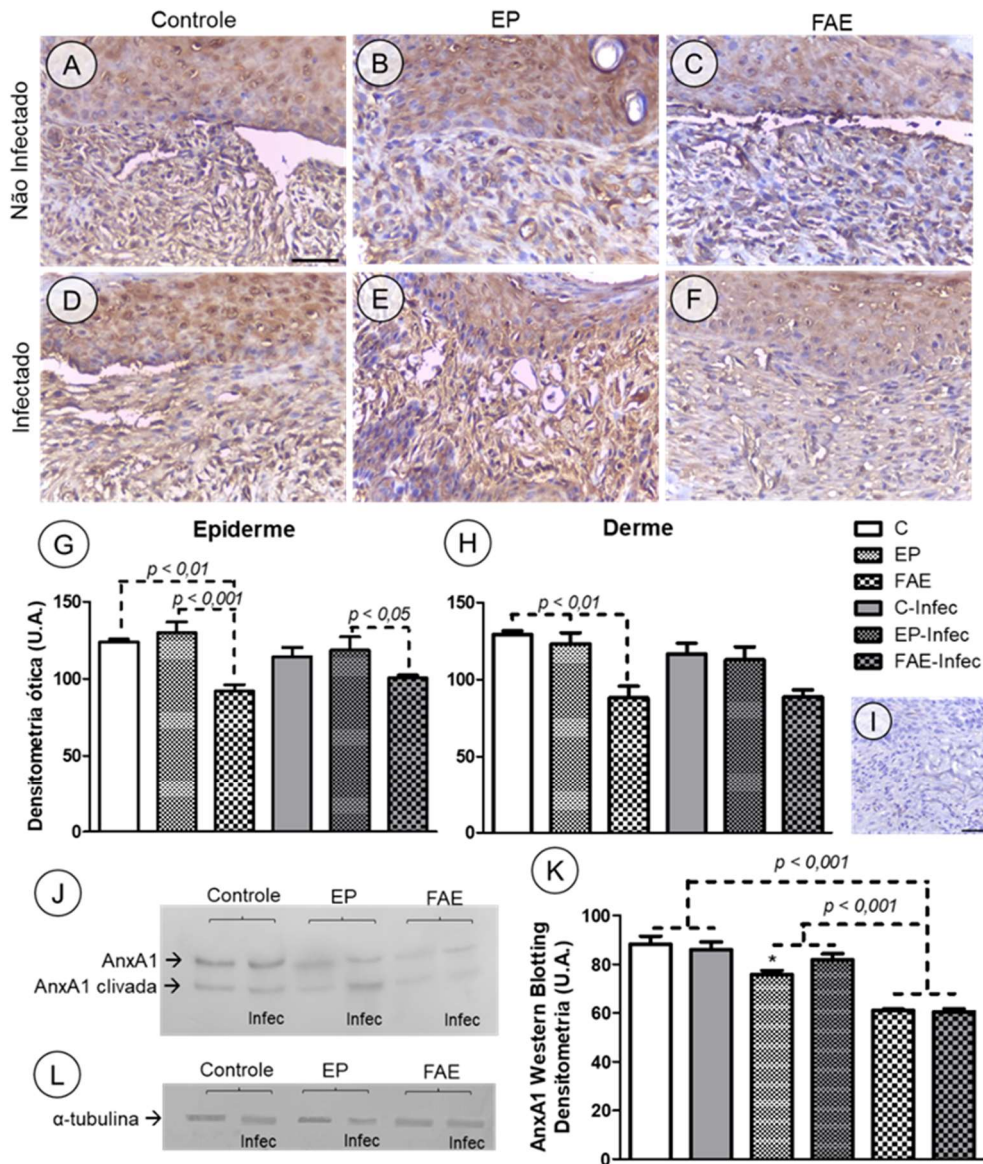


Figura 8. Imunomarcção das células no estroma para GSDM-D. A) Controle tratado apenas com gel puro; B) Ferida tratada com gel + EP a 10 %; C) Ferida tratada com gel + FAE a 10 %; setas indicam células imunomarcadas. D) Especificidade de reação evidenciada pelo controle, barra de 50 μm . Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. E) Gráfico da quantificação das células imunomarcadas.

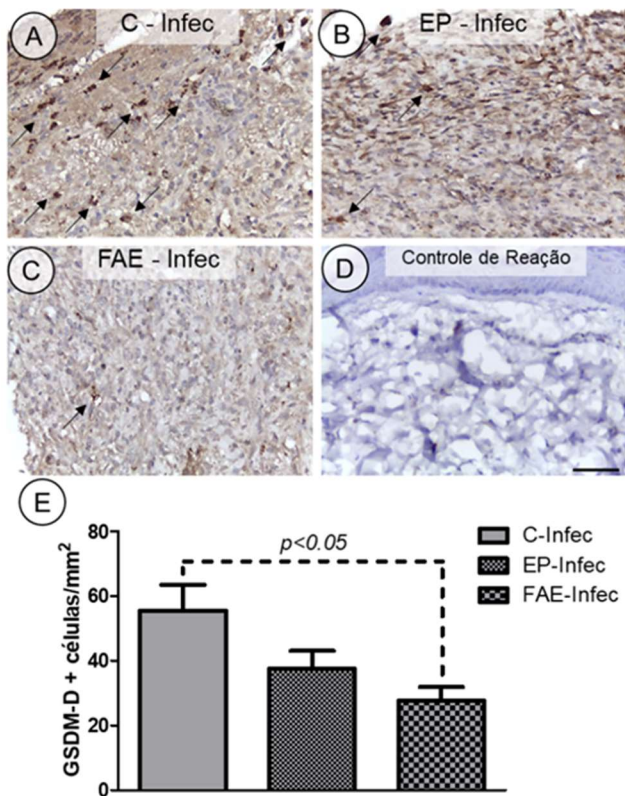


Figura 9. Dosagem de citocinas no macerado das lesões infectadas: Dosagem de citocinas no macerado das lesões: Em A), IL-10, sem diferença estatística entre grupos. Controle-infectado: $13,06 \pm 2,66$; EP-infectado: $35,12 \pm 9,40$; EP-Infectado: $61,66 \pm 18,57$. Em B), MCP-1, com diferença de $p < 0.05$ entre Controle-Infectado e FAE-Intectado. Controle-Infectado: $199,71 \pm 80,50$; EP-Infectado: $709,28 \pm 123,60$; FAE-Infectado: $1322,77 \pm 420,95$.

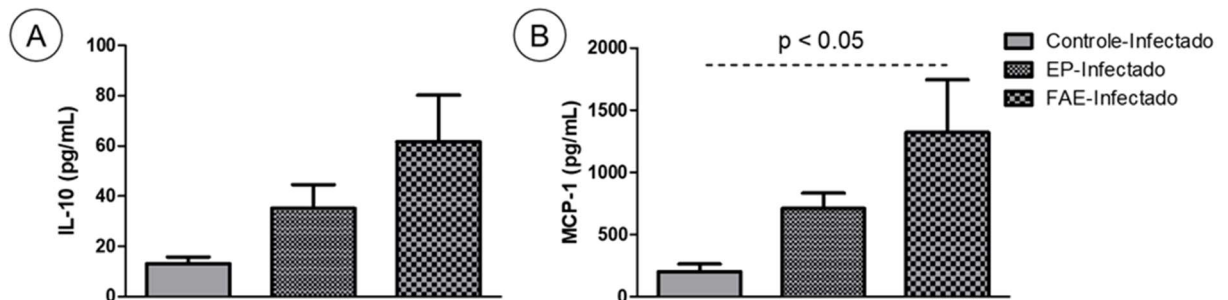
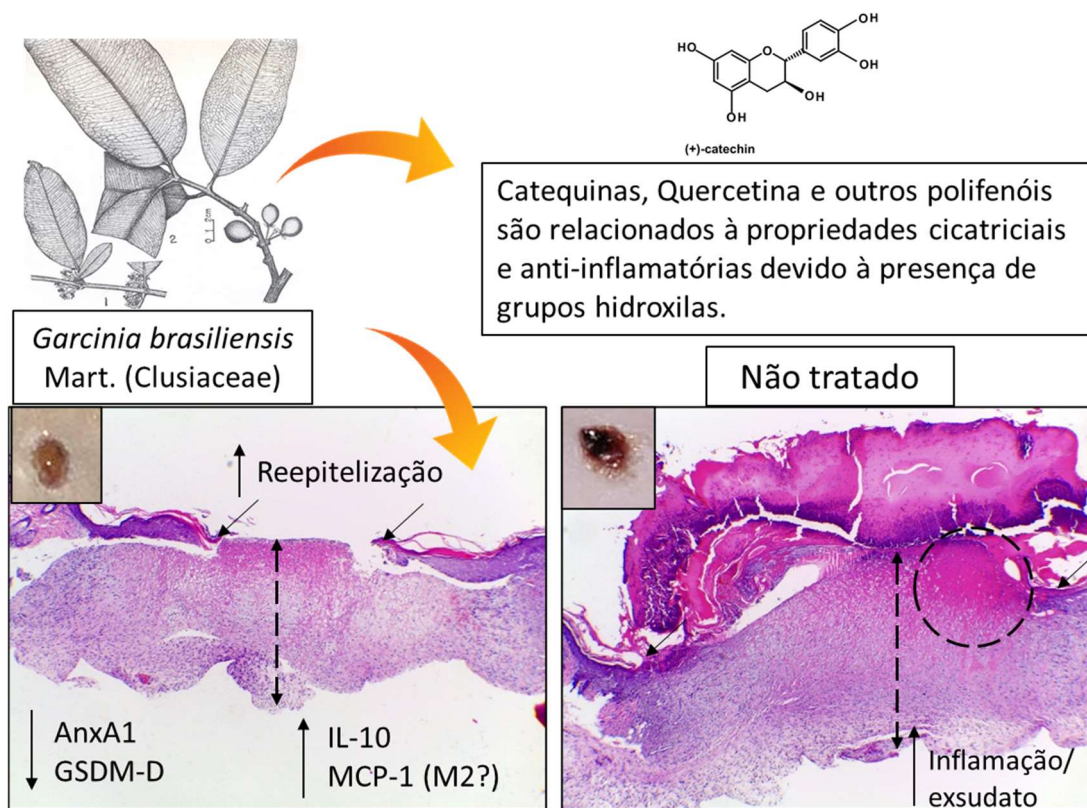


Figura 10. Proposta de um modelo de ação de tratamento tópico com soluções extrativas de *G. brasiliensis* no processo de fechamento de feridas.



Material Suplementar:

Figura 1. Teste de estabilidade à centrifugação: amostras apresentadas nessa ordem: Creme – EP (10%); Creme – FAE (10%); Gel – EP (10%); e Gel – FAE (10%). Seta indica fase na formulação Creme – EP após centrifugação.



Figura 2. Registros do teste de estabilidade preliminar das formulações em creme: amostras apresentadas nessa ordem: Creme – EP (10%); Creme – FAE (10%); Gel – EP (10%); e Gel – FAE (10%). Comparação das formulações em teste de estabilidade aos 1º, 5º, 10º e 15º dias, em todas as condições testes. Em A), formulações controle, que não foram expostas a condições extremas de armazenamento. Em B), formulações expostas à luz direta e ar. Observar alteração de cor das formulações em creme, especialmente no 15º dia. Em C), formulações armazenadas em geladeira. Em D), formulações armazenadas em estufa. Observar formação de fases e intensa alteração de coloração nas formulações com creme. Em E), formulações expostas a ciclos de aquecimento e resfriamento. Observar formação de fases e intensa alteração de coloração nas formulações com creme.

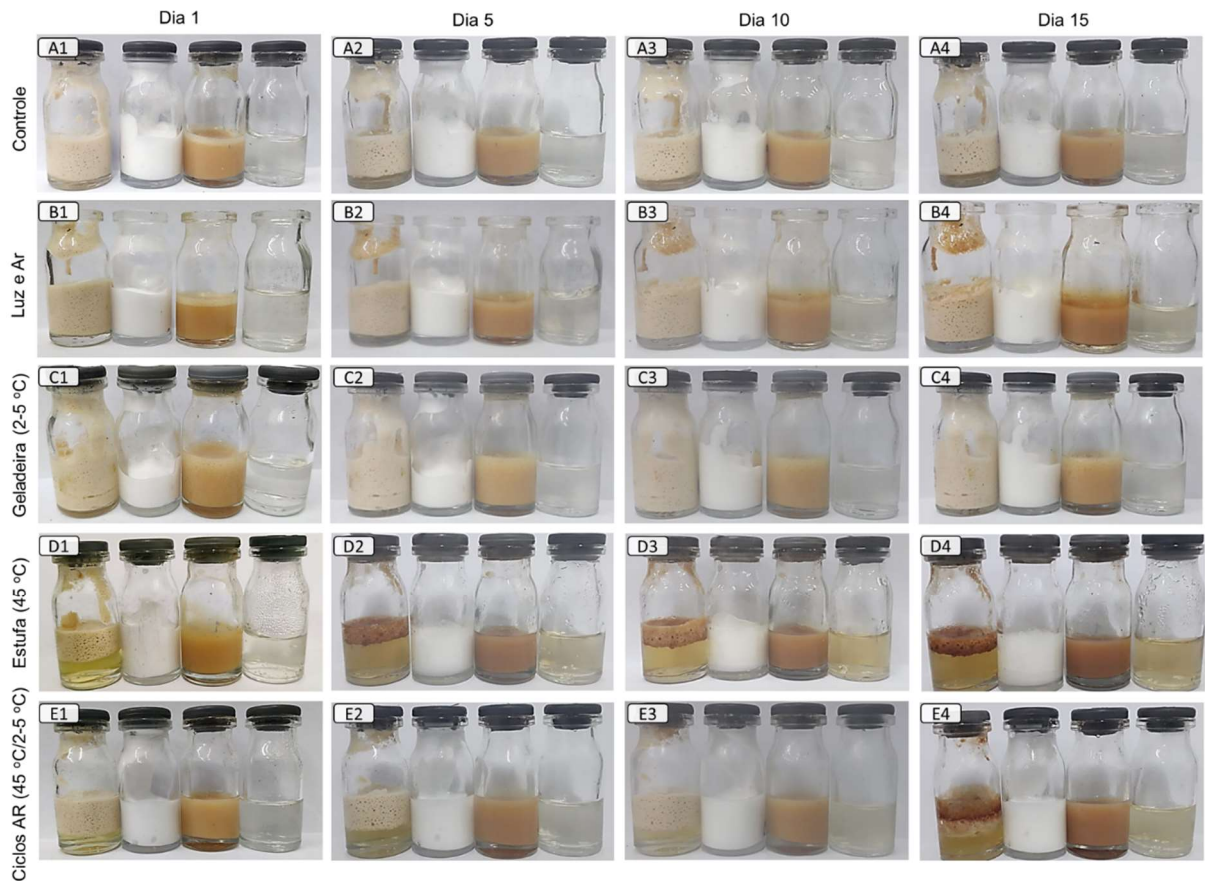


Tabela 1. Dados do teste de estabilidade preliminar das formulações em creme: LM: levemente modificado; M: modificado e; IM: intensamente modificado.

Creme não iônico - Extrato Puro (10%)															
Alteração	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15
Luz e Ar	Cor	---	---	---	---	---	---	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	pH	4.2	4.3	4.2	4.2	4.1	4.3	4.4	4.2	4.3	4.3	4.3	4.3	4.2	4.4
(2-5 °C)	Cor	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	pH	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.0	4.3	4.1	4.2	4.3	4.3	4.2	4.4	4.3
(45 °C)	Cor	---	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)
	Textura	M (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)
	pH	4.3	4.3	4.2	4.3	4.2	4.2	4.1	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.3	4.1
Ciclos AR	Cor	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Textura	LM (2 fases)	LM (2 fases)	M (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)	IM (2 fases)
	pH	4.3	4.3	4.3	4.1	4.3	3.1	4.2	4.2	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.2
Creme não iônico - Fração Acetato de Etila (10%)															
Alteração	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15
Luz e Ar	Cor	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	LM (+ escuro)
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	pH	5.2	4.6	4.6	4.9	5.0	4.7	4.5	4.7	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9
(2-5 °C)	Cor	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	pH	4.7	4.5	4.7	4.6	4.6	4.8	5.1	5.2	5.2	5.1	5.0	4.8	4.8	4.8
(45 °C)	Cor	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	---	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)
	pH	4.9	4.7	4.8	4.8	4.8	4.9	5.0	5.0	5.0	5.1	5.1	5.0	5.0	4.9
Ciclos AR	Cor	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	LM (+ escuro)
	pH	5.1	4.7	4.7	5.0	4.9	4.9	4.6	4.8	4.9	4.9	5.0	4.9	4.9	4.7

Tabela 2. Dados do teste de estabilidade preliminar das formulações em gel: LM: levemente modificado; M: modificado e; IM: intensamente modificado.

Gel não iônico - Extrato Puro (10%)																
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15	
Luz e Ar	Cor	---	---	---	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	---	---	LM (2 fases)	LM (2 fases)	LM (2 fases)	LM (2 fases)	LM (2 fases)	
	pH	4.6	4.6	4.6	4.5	4.6	4.5	4.4	4.5	4.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
(2-5 °C)	Cor	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	pH	4.6	4.5	4.6	4.6	4.7	4.6	4.7	4.6	4.6	4.7	4.7	4.9	4.7	4.5	4.6
(45 °C)	Cor	---	---	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	LM (2 fases)	LM (2 fases)	LM (2 fases)	LM (2 fases)	LM (2 fases)	LM (2 fases)	LM (2 fases)	LM (2 fases)
	pH	4.8	4.7	4.6	4.5	4.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Ciclos AR	Cor	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	pH	4.7	4.5	4.6	4.5	4.5	4.6	4.6	4.6	4.6	4.5	4.6	4.6	4.5	4.5	4.5

Gel não iônico - Fração Acetato de Etila (10%)															
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15
Luz e Ar	Cor	---	---	---	---	---	---	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	pH	5.2	4.9	5.0	5.0	5.1	5.1	5.0	5.0	5.0	4.9	4.9	4.9	5.0	5.0
(2-5 °C)	Cor	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	pH	4.9	4.9	5.0	4.9	5.2	5.1	5.0	5.0	5.0	5.0	5.2	5.0	5.0	5.0
(45 °C)	Cor	---	---	---	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	LM (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)	M (+ escuro)
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	pH	5.0	5.2	5.0	5.0	5.2	5.0	5.0	5.0	5.1	5.0	5.0	4.9	5.2	5.1
Ciclos AR	Cor	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Textura	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	pH	5.0	5.2	5.1	4.9	5.1	4.9	5.0	5.0	5.0	4.9	5.0	5.0	5.0	4.9

4. CONCLUSÕES

- As pesquisas qualitativas e quantitativas para as principais classes de fitoativos em EP, FH e FAE revelaram:
 - Presença de Sesquiterpenos em EP e FAE;
 - Ausência de Cumarinas em todas as soluções extrativas;
 - Maior quantidade de polifenóis, flavonoides e alcaloides em EP e FAE do que em FH.
- As análises cromatográficas em EP, FH e FAE revelaram:
 - Ausência de Lupeol em todas as soluções extrativas, porém presença de outro composto da mesma classe em FAE;
 - Presença de Catequinas em EP e FAE;
 - Presença de Quercetina e outros flavonoides em EP e FAE;
 - Ausência de Ácido Gálico em todas as soluções extrativas, porém presença de outros compostos da mesma classe em EP e FAE;
 - Presença de *Berberina* e outros alcaloides em EP e FAE.
- A FAE foi a solução extrativa com maior atividade antioxidante seguida por EP e FH.
- Na análise de citotoxicidade *in vitro*, FH demonstrou menor citotoxicidade que EP e FAE.
- A análise de citotoxicidade pelo método CAM, EP e FAE não demonstraram citotoxicidade a 10%, sem alterar a vascularização da membrana corioalantoide dos ovos, nem promover a morte dos embriões.
- Somente EP em concentração superior a 50% demonstrou atividade microbicida em cultura de *S. aureus*.
- O Teste de Estabilidade Acelerada em formulações com EP e FAE a 10% mostrou que o veículo gel manteve-se mais estável, especialmente se mantido em geladeira, quando comparado ao creme.
- As análises macroscópicas e histológicas das lesões infectadas ou não com *S. aureus* demonstraram melhor cicatrização nos grupos tratados com EP ou FAE a 10%.

- O tratamento com FAE modulou e reduziu a expressão de Anexina A1 na epiderme e derme das lesões infectadas ou não.
- O tratamento com FAE reduziu a quantidade de células imunomarcadas para Gasdermina-D na derme das lesões infectadas.
- O tratamento com FAE aumentou a expressão de MCP-1 no sobrenadante do macerado das lesões.

Nossos resultados mostraram fitoativos de interesse farmacológico principalmente em EP e FAE, ausência de citotoxicidade dessas soluções extrativas a 10%. No modelo de lesão cutânea associada a infecção por *S. aureus* a formulação de EP ou FAE a 10% em gel proporcionaram rápida cicatrização e o gel com FAE reduziu a expressão de AnxA1 e GSDM-D e aumentou os níveis de MCP-1. Em conjunto, esses dados corroboram a potencialidade anti-inflamatória das soluções extrativas de *G. brasiliensis* e sustentam o uso da FAE nos processos de regeneração cutânea.

APÊNDICE A 1ª página do Artigo: “*Healing effects of Lavandula officinalis essential oil associated with Arctium lappa extract in a second degree burn model*”, publicado na Revista **ACADEMIA JOURNAL OF MEDICINAL PLANTS**, v. 7, p. 1-12, 2019, desenvolvido durante o período do Mestrado da aluna Helena Ribeiro Souza, e que contribuiu para o desenvolvimento de uma linha de pesquisa em fitoterápicos para regeneração de feridas cutâneas.

Academia Journal of Medicinal Plants 7(1): 001-012, January 2019
DOI: 10.15413/ajmp.2018.0197
ISSN: 2315-7720
©2019 Academia Publishing



Research Paper

Healing effects of *Lavandula officinalis* essential oil associated with *Arctium lappa* extract in a second degree burn model

Accepted 31st December, 2018

ABSTRACT

Burns present major impacts worldwide which stimulate the search for therapeutic alternatives, and the herbal medicines with anti-inflammatory and healing properties are potential targets. In the present study, we evaluated topical treatments with *Lavandula officinalis* essential oil (EO) and *Arctium lappa* extract in a second degree burn model. Wistar rats were anesthetized and submitted to thermal burns. The lesions were treated 2x/day with a cream containing 0.5% of *L. officinalis* EO plus 10% of *A. lappa* extract. Healing process evolution was evaluated on days 3, 7, 14, 21 and 30 after burns. Macroscopical and histopathological analyses showed more discreet edema and better reepithelialization in herbal treated animals. Higher expression of epidermal growth factor receptor in all phases of wound healing and lower expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 especially at remodeling stages were observed in treated animals. Phytotherapeutic treatment reduced levels of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in scar tissues after 30 days. Aspartate aminotransferase levels were also decreased in herbal-treated animals. Our data showed better healing in animals treated with *L. officinalis* EO in association with *A. lappa* extract, pointing these phytotherapies as strategies for skin burns treatment.

Key words: Inflammation, mast cells, matrix metalloproteinases, medicinal herbs, wound healing.

Cesário, J. C. B.¹, Prette, L. B.¹, Forgerini, L.¹, Santis, R. M. De², Iyomasa-Pilon, M. M.³, Glad, B. G.³, da Silva, G. P. R.², Souza, H. R.^{1,3}, Possebon, L.^{3,4}, Pereira, M. L. G.⁴, Moreno, A. H.¹ and Girol, A. P.^{1,3*}

¹Department of Physical and Biological Sciences, University Center Padre Albino (UNIFIPA), Rua dos Estudantes, 225, Catanduva, SP, Brazil. 15.809-144.

²Department of Biology, Municipal Institute of Education (IMES), Catanduva, São Paulo, Brazil.

³Department of Biology, São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁴Department of Biology and CICEGO - Aveiro Institute of Materials, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal.

*Corresponding author. E-mail: anapaulagirol@hotmail.com, anapaulagirol@unifipa.com. Tel: +55-17-3311-3340/3361.

Abbreviations: ANOVA, Analysis of variance; AST, aspartate serum aminotransferase; DAB, diaminobenzidine; EO, essential oil; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; ECM, extracellular matrix; HE, hematoxylin and eosin; IL-1 β , interleukin-1 beta; MCs, mast cells; MMPs, matrix metalloproteinases; PDGF-A, platelet-derived growth factor A; TGF- β , transforming growth factor beta; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha.

INTRODUCTION

Burns are complex traumas that present high mortality rate and generate strong economic and psychosocial impact due to prolonged treatment (Richardson and Mustard, 2009; Xue et al., 2018). To restore the skin and prevent sequelae, the degree and extent of injury, infection, techniques and drugs available are considered in selecting the treatment of burns (Summer et al., 2007). In this sense, easily

reproducible animal models that show clinical and histopathological similarities with second degree burns in human were established to evaluate the use of therapeutic agents in healing evolution (Meyerholz et al., 2009; Souza et al., 2017).

Wound healing is a highly complex process orchestrated by different cell types (Evers et al., 2010). Mast cells (MCs)

APÊNDICE B – 1ª página do Artigo: “*Cutaneous wound healing modulation of lesions infected by Staphylococcus epidermidis and treated with 4% stabilized sodium hypochlorite solution*”, publicado na Revista **WORLD JOURNAL OF BIOLOGY PHARMACY AND HEALTH SCIENCES**, v. 7, p. 32, 2021, desenvolvido anteriormente ao período de doutoramento da aluna Helena Ribeiro Souza, e que contribuiu para o desenvolvimento do modelo de lesão cutânea infectada usado nessa tese.



Cutaneous wound healing modulation of lesions infected by *Staphylococcus epidermidis* and treated with 4% stabilized sodium hypochlorite solution

Carolina Telini Rosa Rodrigues Alves ¹, Eduardo Monteiro Diniz Junqueira ¹, Camillo de Lellis Sandoval Filho ¹, Juliana Cruzera Antonio ¹, Melina Mizusaki Iyomasa-Pilon ¹, Helena Ribeiro Souza ^{1,2} and Ana Paula Girol ^{1,2,*}

¹ University Center Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva, SP, Brazil (Department of Basics Sciences).

² São Paulo State University, (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE), São José do Rio Preto Campus, SP, Brazil (Department of Biology, Laboratory of Immunomorphology).

World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences, 2021, 07(02), 032-042

Publication history: Received on 17 June 2021; revised on 01 August 2021; accepted on 03 August 2021

Article DOI: <https://doi.org/10.30574/wjbphs.2021.7.2.0077>

Abstract

Background: Stabilized sodium hypochlorite solution at 4% (4% NaClO) is a product with healing properties but still little studied scientifically. Here we evaluated the administration of 4% NaClO in a model of clean and infected skin lesions.

Methods: Lesions were obtained on the dorsal region of *Wistar* rats. The wounds of some animals were inoculated with *Staphylococcus epidermidis* (50uL, 10⁻⁷) and clean and infected lesions were treated with Trofodermin® or 4% NaClO (diluted at 0.4%) as the following groups: Trofodermin®; *S. epidermidis* + Trofodermin®; 4% NaClO; *S. epidermidis* + 4% NaClO. Wounds sizes were daily measured and the excision of lesions was performed on day 8 for histopathological evaluation and immunohistochemical studies of Annexin A1 (AnxA1), receptors for formylated peptides (FPR)1 and FPR2 and vascular endothelial growth factor (VEGF). Levels of interleukin (IL)-1β and tumor necrosis factor (TNF)-α in the supernatants of the macerated lesions were also measured.

Results: Wounds treated with 4% NaClO closed faster than those treated with Trofodermin®, especially in the infected group. 4% NaClO reduced the expressions of AnxA1, FPR1, FPR2 and VEGF, as well as decreased the levels of IL-1β.

Conclusion: These results pointed the potential of 4% NaClO in wound healing which opens the possibility for new therapeutic strategies.

Keywords: Wound healing; NaClO; AnxA1; FPR; VEGF

* Corresponding author: Ana Paula Girol
University Center Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva, SP, Brazil (Department of Basics Sciences).

ANEXO A – Aprovação da CEUA/UNIFIPA 05/18 para modelo de lesão cutânea



CENTRO UNIVERSITÁRIO PADRE ALBINO
 MANTIDO PELA FUNDAÇÃO PADRE ALBINO
 Rua dos Estudantes, 225 - CEP 15809-144 - Catanduva-SP
 www.unifipa.com.br




C E R T I F I C A D O

Nº 05/18

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação das Propriedades Cicatrizantes do Extrato de *Garcinia brasiliensis* e Modulação da Proteína Anexina A1 em Modelo de Lesão Cutânea**”, registrada com o Número **05/18**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Ana Paula Girol** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) das Faculdades Integradas Padre Albino – FIPA, em reunião de 20/06/2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2018 a 01/08/2020
Espécie/ Linhagem/ Raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	30
Peso/Idade	250g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério UNIFIPA

Catanduva (SP), 20 de junho de 2018.


Profa. Dra. Andréia de Haro Moreno
 Coordenadora da CEUA-FIPA

CEUA – FIPA
 Fone: (17) 3311-3340 – e-mail: ceua@fipa.com.br

ANEXO B – Aprovação da CEUA/UNIFIPA 06/18 para teste CAM



CENTRO UNIVERSITÁRIO PADRE ALBINO
 MANTIDO PELA FUNDAÇÃO PADRE ALBINO
 Rua dos Estudantes, 225 - CEP 15809-144 - Catanduva-SP
 www.unifipa.com.br



C E R T I F I C A D O

Nº 06/18

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da atividade biológica dos extratos bioativos naturais em modelos experimentais**”, registrada com o **Número 06/18**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Ana Paula Girol** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Centro Universitário Padre Albino – UNIFIPA, em reunião de 25/06/2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/07/2018 a 15/07/2020
Espécie/ Linhagem/ Raça	<i>Rattus norvegicus/ Wistar</i> <i>Mus musculus/ BalbC</i> <i>Gallus gallus</i>
Nº de animais	40/40/40
Peso/Idade	250g/ 25g
Sexo	Machos
Origem	Biotério UNIFIPA

Catanduva (SP), 25 de junho de 2018.


Profa. Dra. Andréia de Haro Moreno
 Coordenadora da CEUA-UNIFIPA

ANEXO C – Comprovante de submissão do Manuscrito

Journal of ETHNO-PHARMACOLOGY  Editorial Manager
 HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • POLICIES
 Role: Author Username: anapaulagirol@hotmail.com

← Submissions Being Processed for Author

Page: 1 of 1 (1 total submissions) 

Results per page 10 

Action 	Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
View Submission Send E-mail		Evaluation of the healing properties of <i>Garcinia brasiliensis</i> extracts in a cutaneous wound model	Jan 28, 2022	Jan 28, 2022	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Results per page 10 