UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS CENTRAL SEDE: ANÁPOLIS CET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM RECURSOS NATURAIS DO CERRADO
PATRÍCIA LIMA D'ABADIA

TRATAMENTOS ALTERNATIVOS PARA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: POTENCIAL REGENERATIVO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO SORO DO LÁTEX DE *Hancornia speciosa* Gomes

Anápolis - GO
2021

PATRÍCIA LIMA D'ABADIA

TRATAMENTOS ALTERNATIVOS PARA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: POTENCIAL REGENERATIVO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO SORO DO LÁTEX DE *Hancornia speciosa* Gomes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Recursos Naturais do Cerrado, do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás para a obtenção do título de Doutora em Recursos Naturais do Cerrado.
Orientadora: Profª. Drª. Luciane Madureira de Almeida

Anápolis - GO
2021

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL (BDTD)

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Estadual de Goiás a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UEG), regulamentada pela Resolução, **CsA n.1087/2019** sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

Dados do autor (a)

Nome Completo Patrícia Lima D'Abadia

E-mail patricialimabio@gmail.com

Dados do trabalho

Título Tratamentos alternativos para a cicatrização de feridas: potencial regenerativo e atividade enzimática da fração soro do látex de Hancornia speciosa Gomes.

Tipo

(X) Tese ( ) Dissertação

Curso/Programa Recursos Naturais do Cerrado

Concorda com a liberação documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

Anápolis, 27/07/2021
Local Data

Patrícia Lima D'Abadia
Assinatura do autor (a)

Luciane Madureira de Almeida
Assinatura do orientador (a)

[1] **Casos de impedimento:**
- Período de embargo é de um ano a partir da data de defesa
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

D999t D'Abadia, Patrícia Lima
Tratamentos alternativos para a cicatrização de feridas: potencial regenerativo e atividade enzimática da fração soro do látex de Hancornia speciosa Gomes / Patrícia Lima D'Abadia; orientador Luciane Madureira de Almeida. -- Anápolis, 2021.
92 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação Doutorado em Recursos Naturais do Cerrado (RENAC)) -- Câmpus Central - Sede: Anápolis - CET, Universidade Estadual de Goiás, 2021.

1. Látex. 2. Biomaterial. 3. Cerrado. I. de Almeida, Luciane Madureira, orient. II. Título.

PATRÍCIA LIMA D' ABADIA

TRATAMENTOS ALTERNATIVOS PARA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: POTENCIAL REGENERATIVO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO SORO DO LÁTEX DE *Hancornia speciosa* Gomes

Tese defendida no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais do Cerrado da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do grau de doutora, aprovada em 31 de maio de 2021, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Luciane Madureira de Almeida

Prof. Dra. Luciane Madureira de Almeida
Presidente da banca
Universidade Estadual de Goiás

Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo-Reis
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Susy Ricardo Lemes Pontes

Prof. Dra. Susy Ricardo Lemes Pontes
Centro Universitário Goyazes

Samantha Salomão Caramori

Prof. Dra. Samantha Salomão Caramori

AGRADECIMENTOS

Meus maiores agradecimentos serão sempre dados à Deus. Eu não poderia começar de forma diferente esse momento, mesmo que pareça clichê. Foram 4 anos e 3 meses dedicados a esse trabalho. Muitas coisas eu aprendi. Porém, tive muitos momentos em que minha mente não esteve bem, não esteve conectada ao meu corpo e não foi capaz de realizar certas tarefas nos momentos que eu desejava. Assim foi o meu doutorado, porém, Deus agarrou a minha mão e me fez vencer. Então eu só tenho a agradecer a Jesus Cristo por me fazer tão forte e guerreira. Somente Ele e eu sabemos o que passei e o peso que isso teve. Obrigada, Deus, por me dar essa vitória.

Agradeço aos meus pais pela oportunidade de ter uma vida dedicada aos estudos, por viver o que eu sonhava e poder escolher a minha carreira. Agradeço a vocês por serem meus maiores incentivadores, fãs e amigos. Vocês são os responsáveis por tudo que eu me tornei, inclusive esse título de doutora é tanto de vocês, quanto meu.

Agradeço também à Universidade Estadual de Goiás, que desde o início da minha graduação tem plantado tanto amor pela ciência no meu coração. Quero agradecer a essa universidade como um todo (professores, servidores e colegas) por todas as oportunidades, experiências, acolhimento e conhecimento que aqui adquiri desde 2008. Obrigada UEG e RENAC por ajudar a construir minha carreira e a conquistar o sonho que eu tinha desde menina: o de ser cientista.

Um agradecimento especial à minha orientadora Luciane, que jamais mediu esforços para me incluir na pesquisa e que por isso me proporcionou tantas oportunidades de adquirir conhecimento e de ter experiências que contribuíram com meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço de coração por ter me compreendido nos momentos em que tive a saúde frágil nesse doutorado.

Em especial quero agradecer à Susy, que foi minha grande amiga e parceira no experimento com os ratos e que sempre teve uma palavra de paz para me confortar. Também agradeço à Danielle pela companhia, incentivo, força e empatia a mim doados. Foram muitos dias juntas, na luta, enfrentando o que tivesse que enfrentar. Ao Hasley agradeço pelas milhares de conversas e força a mim passada, além da parceria crucial em um dos meus artigos.

Agradeço aos professores Ruy Lino e Paulo Roberto por terem me recebido em seus laboratórios e me dado a oportunidade de aprender tantas coisas. Agradeço ao professor Ruy por ter me ajudado inúmeras vezes e por ter sido um colaborador essencial em meus trabalhos.

Só tenho a agradecer às várias pessoas maravilhosas que passaram por minha vida durante esse doutorado e que me ajudaram de alguma forma. Pessoas como a Ana Paula, técnica do laboratório da PUC que foi um anjo em minha vida. Amigos como o Bruno, Adriana, Rafael, Fred.

Agradeço às agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por acreditar no potencial desse estudo e pela concessão de bolsa para o desenvolvimento dessa pesquisa.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

RESUMO

Ao longo dos anos, o homem tenta interferir no processo fisiológico de regeneração cutânea, uma vez que, esse processo vem sendo cada vez mais alterado devido a ocorrência de fibrose e o desenvolvimento de feridas crônicas. Assim, é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de acelerar o processo cicatricial e de reduzir possíveis complicações. Muitas vezes as modalidades de tratamento padrão não são suficientes para a cura de feridas difíceis de cicatrizar e necessitam de terapias complementares. É importante que essas terapias sejam acessíveis e de baixo custo. Por isso, o uso de recursos naturais como as plantas representa uma alternativa promissora para a cicatrização de feridas. Na tentativa de fornecer um tratamento alternativo e de baixo custo para o cuidado de feridas, este trabalho avaliou o potencial regenerativo do soro do látex de *Hancornia speciosa* usando como modelo ratos e a membrana corioalantóide do embrião de galinha (MCA). Levando-se em consideração às inúmeras alternativas disponíveis hoje no mercado para o tratamento de feridas, foi realizada nessa tese uma revisão sistemática para avaliar os principais tipos de produtos e/ou terapias que têm sido propostos para o tratamento de feridas de pessoas diabéticas. Em seguida, buscou-se avaliar o potencial regenerativo do soro do látex de *H. speciosa* (incorporado a um gel-creme padronizado) em feridas de espessura total de ratos. Outro objetivo foi avaliar o papel das proteínas na atividade angiogênica do soro do látex de *H. speciosa* usando o modelo MCA. Como resultado foi observado que dentre a ampla variedade de tecnologias que têm sido utilizadas para o manejo e tratamento de feridas, as que se destacaram por sua ampla utilização e relevante efeito regenerativo foram a terapia de feridas por pressão negativa e as terapias com células e com tecidos da bioengenharia. Além disso, a partir dos ensaios biológicos realizados, observou-se que a fração soro do látex de *Hancornia speciosa*, demonstrou ter potencial regenerativo em feridas de rato, além de baixo teor proteico e relevante atividade enzimática. Portanto, o látex de *H. speciosa* é capaz de interferir no processo de cicatrização e de auxiliar nas fases da cura. Essa planta possui potencial terapêutico para ser investigada e possivelmente utilizada futuramente como indutora de regeneração tecidual.

Palavras-chave: biomaterial, lactíferas, lesão tecidual, mangabeira, regeneração cutânea.

ABSTRACT

Over the years, man has tried to interfere in the physiological process of skin regeneration, since this process has been increasingly altered due to the occurrence of fibrosis and the development of chronic wounds. The developing of new technologies able to accelerate the wound healing process and reducing possible complications are necessary. Sometimes the standard treatment modalities are not enough to heal chronic wounds, which are wounds of difficult healing and that require complementary therapies. It is important that these therapies are inexpensive and available to everyone. The use of natural resources such as plants represents a promising alternative for wound healing. With the aim of providing an alternative and low-cost treatment for wound care, this work evaluated the regenerative potential of *H. speciosa* latex serum using mice and the chorioallantoic membrane of the chicken embryo as a model. Considering the different alternatives for the treatment of wounds available on the market nowadays, we performed a systematic review to evaluate the main types of products and / or therapies that have been proposed for the treatment of diabetic wounds. After that, we evaluated the regenerative potential of *H. speciosa* latex serum (incorporated into a standardized gel-cream) in full-thickness wounds of rats. Another objective was to evaluate the role of proteins in the angiogenic activity of *H. speciosa* latex serum using the CAM model. As a result, it was observed that among the wide variety of technologies that have been used for the management and treatment of wounds, those that stood out for their widespread use and relevant regenerative effect were negative pressure wound therapy and therapies with cells and with bioengineering tissues. In addition, the biological tests carried out showed that the serum fraction of the latex of *Hancornia speciosa* has regenerative potential in rat wounds, in addition to having low protein content and relevant enzymatic activity. Therefore, the latex of *H. speciosa* has been shown to be able to interfere in the healing process and to assist in the healing phases. This plant has therapeutic potential to be investigated and possibly used in the future as an inducer of tissue regeneration.

Keywords: biomaterial, mangabeira, tissue damage, lactiferous, skin regeneration.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 9
Hancornia speciosa Gomes 11
Potenciais terapêuticos do látex de *Hancornia speciosa* 13
REFERÊNCIAS 15
CAPÍTULO I 20
PERSPECTIVAS DE TRATAMENTOS PARA FERIDAS DE DIFÍCIL CICATRIZAÇÃO EM DIABÉTICOS 20
RESUMO 20
1. INTRODUÇÃO 21
2. METODOLOGIA 24
2.1 Estratégia de busca 24
2.2 Análises estatísticas 25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 26
3.1 Tendências e indicadores de qualidade dos artigos que abordam cicatrização de feridas em diabéticos 26
3.2 Áreas do conhecimento que publicam sobre cicatrização de feridas de diabéticos 28
3.3 Material de estudo de cicatrização de feridas de diabéticos 29
3.4 Tratamentos em feridas de diabéticos 31
3.5 Correlação entre efeito biológico na ferida e tratamentos 36
3.6 Tratamentos baseados em produtos naturais 40
4. CONCLUSÕES 42
REFERÊNCIAS 44
CAPÍTULO II 51
REGENERAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS TRATADOS COM A FRAÇÃO SORO DO LÁTEX DE *HANCORNIA SPECIOSA* 51
RESUMO 51
1. INTRODUÇÃO 52
2. MATERIAIS E MÉTODOS 53
2.1 Extração do látex 53
2.2 Fracionamento de látex 54
2.3 Formulação do gel creme a base do látex de *H. speciosa* 54
2.4 Modelo de feridas cutâneas em ratos 54
2.5 Etapa experimental 55
2.6 Avaliação morfométrica e histopatológica 55

2.7 Análises estatísticas 57
3. RESULTADOS 57
4. DISCUSSÃO 63
5. CONCLUSÃO 65
REFERÊNCIAS 65
CAPÍTULO III 70
O PAPEL DAS ENZIMAS NA ATIVIDADE ANGIOGÊNICA DO LÁTEX DE *HANCORNIA SPECIOSA* 70
1. INTRODUÇÃO 71
2. MATERIAL E MÉTODOS 72
2.1 Coleta do látex 72
2.2 Fracionamento do látex 72
2.3 Inativação das proteínas usando Proteinase K 73
2.4 Potencial angiogênico/ensaio MCA 73
2.5 Quantificação de proteína total 74
2.6 Quantificação da atividade enzimática 74
2.6.1 Atividade de protease 74
2.6.2 Atividade de β-1,3-glucanase (L9634 Sigma) 75
2.6.3 NAGase, N -acetil- β -D-glicosaminidase (Lot 24H5022 Sigma) 75
2.6.4 Atividade da enzima fosfatase ácida (N3129 Sigma) 75
2.6.5 Atividade de beta-glucosidase (N7006- Sigma) 76
2.6.6 Atividade de quitinase (090M5001V Sigma) 76
2.6.7 Atividade de Lipase (N2752 Sigma) 76
3. RESULTADOS 77
4. DISCUSSÃO 80
5. CONCLUSÃO 82
REFERÊNCIAS 82
CONSIDERAÇÕES FINAIS 87
ANEXO I: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PUC/GO ... 89
ANEXO II: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UEG 90

INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, o homem tenta interferir no processo fisiológico de regeneração tecidual (PENHAVEL et al., 2016). Mediante a isso, os princípios e as técnicas que norteiam o tratamento de feridas têm passado por grandes mudanças, assim como os produtos utilizados para esse fim. Na antiguidade, as feridas eram tratadas segundo técnicas com pouca fundamentação científica, onde se utilizava recursos como teia de aranha, mel, carne fresca, dentre outros (BALAN, 2011). Até 1960, o que se sabia era que a ferida deveria permanecer seca e limpa. Somente em 1962, o pesquisador George Winter constatou que a velocidade de cicatrização de uma ferida era duas vezes maior quando estas eram mantidas em meio úmido (DEALEY, 2001; BALAN, 2008).

Atualmente, muitas pesquisas têm sido realizadas acerca do desenvolvimento de novas tecnologias capazes de acelerar o processo cicatricial e de reduzir possíveis complicações (MANDELBAUM et al., 2003). Sabe-se, que para que tais produtos sejam capazes de auxiliar a cicatrização de feridas, é de suma importância que eles sejam: facilmente aplicados e removidos, confortáveis, não exijam trocas frequentes, tenham boa relação custo/benefício, mantenham a ferida com umidade ideal e que se adaptem ao corpo (DEALEY, 2001).

O amplo desenvolvimento de tecnologias que visam acelerar o processo de cicatrização de feridas, vem sendo impulsionado pelo aumento mundial do número de pacientes diagnosticados com feridas crônicas (GWAK; SOHN, 2017). Com o intuito de reduzir o tempo de cicatrização, a formação de cicatrizes e melhorar as propriedades da nova pele, essas tecnologias podem ser classificadas em tradicionais ou modernas, sendo que, cada uma possui um nível de eficácia, de efeitos colaterais e variável aceitação pela comunidade médica e pelo paciente (PEREIRA; BÁRTOLO, 2016). As terapias tradicionais envolvem a utilização de compostos derivados de plantas e animais, ou de outros organismos vivos, de curativos tradicionais e da prata (BODEKER et al., 1999). As terapias modernas, por sua vez, são representadas pelo uso de enxertos, substitutos de pele criados pela bioengenharia, terapias com células ou fatores de crescimento, tecidos criados por biofabricação, dentre outros curativos modernos (BOATENG et al., 2008; GROEBER et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; RUSTAD; GURTNER, 2013).

O mercado farmacêutico conta com uma variedade de dispositivos e medicamentos voltados para o tratamento de feridas, os quais possuem diversas indicações e mecanismos de ação sobre as diferentes fases do processo cicatricial. Frente a essa grande diversidade de

produtos é crucial que estes sejam economicamente acessíveis para a grande maioria da população (SANTOS et al., 2010; DA SILVA et al., 2014).

A regeneração tecidual é didaticamente dividida em 4 fases e se inicia com a formação do coágulo de fibrina na lesão (hemostasia), seguida da fase inflamatória, com a migração de células fagocíticas até a região ferida para defesa contra micro-organismos e eliminação de substâncias estranhas (SHAW; MARTIN, 2009). As células inflamatórias atuam como estímulo para liberação de fatores de crescimento e citocinas responsáveis pela iniciação da fase proliferativa. Nesta fase, ocorre a migração e proliferação de queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos nas imediações da lesão (LI et al., 2007). Ainda na fase proliferativa, onde tem-se a formação do tecido de granulação, assim chamado devido o surgimento de capilares neoformados (angiogênese), os fibroblastos iniciam uma intensa produção de colágeno tipo III e matriz extracelular (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009). Em seguida, inicia-se a fase de remodelamento tecidual, na qual ocorre a transformação do tecido de granulação em uma cicatriz madura, a qual é realizada por meio de uma contínua síntese e degradação de colágeno (VELNAR et al., 2009). Nessa etapa, o colágeno tipo III é substituído por fibras de colágeno tipo I, as quais são mais resistentes a diferentes fontes de estresse (REINKE; SORG, 2012).

Produtos químicos e drogas sintéticas têm se demonstrado capazes de atuar sobre as diferentes fases do processo de cicatrização de feridas, entretanto esses medicamentos possuem limitações funcionais e efeitos colaterais (CORREA et al., 2017). Por esse motivo, recentemente muito tem sido investigado acerca do uso de produtos naturais e seus componentes bioativos, como fonte alternativa de medicamentos para a regeneração tecidual, os quais sejam capazes de acelerar o processo cicatricial, e que gerem o mínimo de complicações possível (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; BAHRAMSOLTANI et al., 2014; JACOB et al., 2015; CORREA et al., 2017). Tais fatos tem impulsionado o desenvolvimento de pesquisas que buscam novos princípios ativos em plantas, a partir do conhecimento popular de diferentes populações (BÜRGER et al., 2003).

O Brasil é detentor da maior biodiversidade vegetal do mundo, contando com mais de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas, das quais muitas são utilizadas na medicina popular, sem que tenham sido avaliadas quanto a sua composição química e ação terapêutica. Entretanto, estima-se que apenas 8% dessas plantas foram estudadas em busca de novas matérias-primas e cerca de 1.100 espécies tiveram suas propriedades medicinais avaliadas (DE CARVALHO et al., 2015).

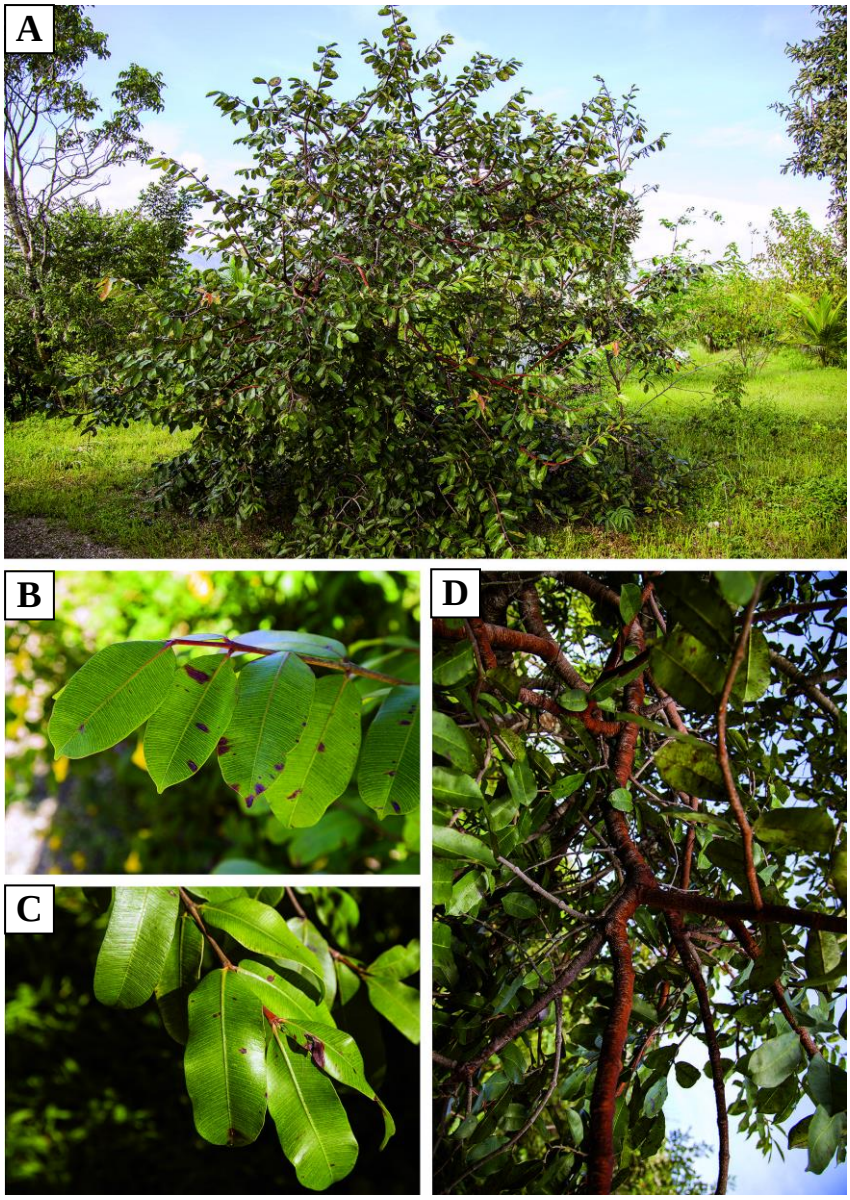
O uso de substâncias naturais, tais como extratos, produtos ou partes de plantas medicinais, com a finalidade de tratar doenças na pele, como as feridas ou lesões agudas e

crônicas, vem ocorrendo desde a antiguidade (MOTALEB et al., 2015). Um exemplo de produto natural com propriedades cicatrizantes é o látex de seringueira. O látex dessa espécie é o principal composto dos produtos comerciais denominados Biocure® e Regederm®, que são medicamentos capazes de estimular a angiogênese e o crescimento do tecido de granulação, acelerando o processo de cicatrização de feridas (Biocure Pharma Biotechnology, 2021). Os resultados obtidos com esses produtos mostraram o excelente potencial do látex de seringueira em produzir reposição e regeneração de tecidos (ERENO et al., 2010; FRADE et al., 2012). Apesar dos expressivos resultados obtidos no uso medicinal e comercial do látex de *H. brasilienses*, existem muitos relatos sobre alergias a produtos à base desse látex (RAULF, 2014). A grande incidência de alergia a esse látex, ocasionada pelo contato direto com proteínas alergênicas nele presentes (WU et al., 2016), representa um dos principais motivos para se buscar outras espécies lactíferas produtoras de látex com menor potencial alergênico. Dentre a gama de substâncias que podem ser extraídas de plantas com potencial cicatrizador está o látex natural da *Hancornia speciosa* Gomes.

Hancornia speciosa Gomes

A *H. speciosa* Gomes (Apocynaceae) é uma planta nativa do Brasil, conhecida popularmente como mangabeira (Figura 1). É uma frutífera perenifólia que se adapta a diferentes solos e climas e tem ampla distribuição por todo o país, sendo encontrada principalmente na região que compreende os Tabuleiros Costeiros e a Baixada litorânea do Nordeste até os Cerrados das regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste (SILVA JUNIOR, 2004; SILVA JÚNIOR; LEDÓ, 2006). Apesar de sua ampla distribuição, essa espécie corre risco de extinção, em especial no Cerrado, devido ao avanço predatório das atividades agropecuárias, o que resulta em perda de potencial genético insubstituível (MANICA, 2002).

Figura 1: Árvore de *H. speciosa* Gomes. A: Árvore, B e C: folhas e D: tronco.



Fonte: https://museucerrado.com.br/mangaba/

O interesse econômico e científico na cultura da mangabeira tem aumentado nas últimas décadas, devido o valor comercial do seu fruto, a mangaba. Além de ser consumido *in natura*, este fruto é utilizado para produzir geleias, doces, sorvetes, sucos, picolés, licores, vinho e xarope (SILVA JÚNIOR; LEDÓ, 2006). Entretanto, além da mangaba, que possui valor nutricional, essa planta possui compostos bioativos descritos na literatura com potencial farmacológico. Por exemplo, de suas folhas podem ser extraídas substâncias como esteroides, triterpenos e taninos, que possuem efeito no controle da pressão arterial (FERREIRA et al., 2007 a,b; SILVA et al., 2011). Da sua casca podem ser obtidos compostos como flavonoides,

catequinas, antocianinas e taninos, que são utilizados no tratamento de gastrite causada por *Heliobacter pylori* (MORAES et al., 2008).

A mangabeira também é amplamente utilizada na medicina popular, tendo o uso de sua casca indicado para o tratamento de dermatoses e doenças hepáticas, tratamentos anti-inflamatórios, hipoglicêmicos e perda de peso. Já as raízes são utilizadas em luxações, reumatismo e como remédio antigástrico e anti-hipertensivo. O látex e folhas, por sua vez, são usados para tratar cólicas menstruais, dermatoses, tuberculose, úlceras, herpes, verrugas e doenças hepáticas (GRANDI et al., 1989; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; SILVA et al., 2010; CERCATO, 2015).

Potenciais terapêuticos do látex de Hancornia speciosa

O látex de *H. speciosa* tem aparência leitosa, coloração ligeiramente rosada e pH alcalino (ALMEIDA et al., 2016). Pesquisas recentes mostram que o látex é biocompatível a diferentes sistemas e possui atividade cicatrizante, angiogênica, osteogênica, anti-inflamatória, antifúngica e antioxidante. A seguir essas propriedades serão discutidas.

Em relação a biocompatilidade, diferentes trabalhos têm mostrado que o látex de *H. speciosa* não causa toxicidade em diferentes modelos experimentais: fibroblasto de camundongos (ALMEIDA et al., 2014); ratos (PEGORIN et al., 2020); *Allium cepa* (RIBEIRO et al., 2016) e células dentrídicas humanas (COSTA, 2020). Esta ausência de toxicidade torna esse biomaterial uma fonte segura de ativos para o desenvolvimento de medicamentos de baixo custo.

Dentre os seus potenciais terapêuticos, se pode citar a atividade angiogênica desse látex na forma de biomembrana (ALMEIDA et al., 2014) e *in natura* isolado na forma de fração soro ou aquosa (D'ABADIA et al., 2020). A angiogênese é um processo biológico complexo que favorece a formação de novos vasos sanguíneos a partir do tecido vascular preexistente (FOLKMAN, 2003). Através de ensaios em membranas corioalantoides de ovos embrionados de galinha, foi demonstrada a capacidade do látex de estimular o surgimento de novos vasos a partir de uma rede vascular pré-existente (ALMEIDA et al., 2014; D'ABADIA et al., 2020). Recentemente, Pegorin e colaboradores (2020), em seu estudo de cicatrização de feridas excisionais em ratos, demonstraram que a biomembrana de látex de *H. speciosa* foi capaz de estimular o recrutamento de infiltrados inflamatórios e estimular a angiogênese nas fases iniciais do processo de cicatrização, além de aumentar a produção de colágeno a partir da fase

proliferativa do processo de cicatrização, o que gerou uma regeneração tecidual melhorada e acelerada.

A literatura relata ainda a capacidade do látex de *H. speciosa* de estimular a osteogênese e a regeneração do tecido ósseo na calvária de coelhos na forma de biomembrana (FLORIANO et al., 2016) e de ratos *in natura* incorporado a um gel (DOS SANTOS NEVES et al., 2016). Dos Santos Neves et al. (2016) destaca a capacidade desse látex de estimular a proliferação celular do periósteo e assim contribuir com a neoformação óssea e Floriano et al. (2016) observaram que suas biomembranas promoveram uma reparação óssea de qualidade, demonstrando ser um biomaterial de excelente aplicabilidade, elasticidade e resistência para aplicação em defeitos ósseos.

Outra ação terapêutica comprovada do látex de *H. speciosa* é a sua atividade anti-inflamatória. MARINHO et al. (2011), demonstrou em um modelo de feridas nas patas de camundongos e ratos que esse látex atua como um agente anti-inflamatório, sendo capaz de inibir a produção de óxido nítrico, PGE2 e citocinas nas feridas. Também se destaca na literatura, a atividade antifúngica desse látex, o qual se demonstrou capaz de eliminar a espécie de fungo *Candida albicans* (Silva et al., 2011) e sua atividade antioxidante (D'Abadia et al., 2020).

Além destas propriedades terapêuticas, o látex de *H. speciosa* possui ainda potencial biotecnológico para ser utilizado como um sistema polimérico para a liberação de diferentes tipos de fármacos (GUIDELLI et al., 2013). Dois estudos recentes adicionaram nanopartículas de prata às biomembranas de látex de *H. speciosa* para sua liberação controlada. Como resultado foi obtido um biomaterial que combinou as propriedades angiogênica e anti-inflamatória do látex de *H. speciosa*, com o potencial antibacteriano das nanopartículas de prata (ALMEIDA et al. 2019; BONETE et al. 2020).

Na tentativa de fornecer um tratamento alternativo e de baixo custo para o cuidado de feridas, este trabalho avaliou o potencial regenerativo do soro do látex de *H. speciosa* usando como modelo ratos e a membrana corioalantóide do embrião de galinha. Levando-se em consideração às inúmeras alternativas disponíveis hoje no mercado para o tratamento de feridas, o primeiro objetivo específico desta tese foi realizar uma revisão sistemática para avaliar os principais tipos de produtos e/ou terapias que têm sido propostos para o tratamento de feridas de pessoas diabéticas. O segundo e terceiro objetivos específicos deste trabalho, foram respectivamente, avaliar o potencial regenerativo do soro do látex de *H. speciosa* (incorporado a um gel-creme padronizado) em feridas de espessura total de ratos e analisar o papel das

proteínas na atividade angiogênica do soro do látex de *H. speciosa.* Assim, a tese foi estruturada em três capítulos.

O capítulo 1 intitulado "Perspectivas de tratamentos para feridas de difícil cicatrização em diabéticos" apresenta as principais tendências e lacunas acerca do que tem sido proposto para o tratamento de feridas difíceis de curar, em específico feridas de pessoas diabéticas. Além disso, são relatados os efeitos desses tratamentos sobre o processo de cicatrização de feridas. Por fim, discute-se como os tratamentos alternativos a base de produtos naturais extraídos de plantas podem acelerar o processo de cicatrização.

O capítulo 2 intitulado "Regeneração de feridas em ratos tratados com a fração soro do látex de *Hancornia speciosa*" propõe a utilização de um gel-creme à base de látex de *H. speciosa* para acelerar o processo de regeneração cutânea em feridas de espessura total no dorso de ratos. O gel-creme foi formulado com a fração soro do látex de *H. speciosa*, uma vez que, essa fração foi identificada previamente pelo nosso grupo de pesquisa como a fração responsável pela atividade angiogênica desse látex (D´ABADIA et al., 2020).

O capítulo 3 nomeado como "O papel das enzimas na atividade angiogênica do látex de *Hancornia speciosa*", busca investigar o papel das proteínas contidas no soro do látex de *H. speciosa* sobre a sua atividade angiogênica. Para isso, o soro com proteínas inativadas, através de enzimas (proteinase K), teve sua atividade angiogênica avaliada no ensaio com membranas corioalantoides de galinha. Também foi realizada a quantificação do teor de proteínas totais do soro do látex de *H. speciosa* e a atividade enzimática do mesmo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L.M. et al. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. *J. Mater. Sci. Mater. Med*., v. 25, p. 2153-62, 2014.

ALMEIDA, L.M. et al. The state-of-art in angiogenic properties of latex from different plant species. Curr. Angiogenesis, v. 4, p. 10-23, 2016.

ALMEIDA, L.M. et al. Toxicity of silver nanoparticles released by *Hancornia speciosa* (Mangabeira) biomembrane. Spectrochim *Acta A Mol Biomol Spectrosc*., v.5; n.210, p.329-334, 2019.

BAHRAMSOLTANI, R. et al. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. *Arch. Dermatol. Res*., v.306, n.7, p.601–617, 2014.

BALAN, M. **Guia terapêutico para o tratamento de feridas**. 1ª edição, São Caetano do Su/SP: Editora Difusão, 2008.

BALAN, M. A. J. **Guia terapêutico para tratamento de feridas**. São Caetano do Sul, SP: Difusão Editora, 2011.

BOATENG, J.S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci*, v.97, n.8, p.2892-2923, 2008.

BODEKER, G. et al. Traditional approaches to wound healing. *Clinics in Dermatology*, v.17, n.1, p.93–98, 1999.

BONETE, J. M. et al. Tissue reaction and anti-biofilm action of new biomaterial composed of latex from Hancornia speciosa Gomes and silver nanoparticles. *An Acad Bras Cienc*. v. 92, n.4, e20191584, 2020.

BÜRGER, M. et al. Cicatrização de feridas cutâneas em ratos tratados com Pomada caseira à base de plantas medicinais. *Rev. Bras. Plantas Med*., v.5, p.91-97, 2003.

CERCATO, L.M. Efeito do extrato aquoso da casca de Hancornia speciosa Gomes (mangabeira) sobre a obesidade induzida em camundongos. 2015. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão/Sergipe. 2015.

CORREA, F.R.S. et al. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFkB. *Biomed. Pharmacother*., v.86, p.162–171, 2017.

COSTA, A.F. Potencial irritante e alergênico ao látex de *Hancornia speciosa*. 2020. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Cerrado), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis/Goiás.

D'ABADIA, P.L. et al. *Hancornia speciosa* serum fraction latex stimulates the angiogenesis and extracellular matrix remodeling processes. *An Acad Bras Cienc*, v. 92, n. 2, pp. e20190107, 2020. doi:10.1590/0001-3765202020190107

DA SILVA, P.N. et al. Terapia tópica no tratamento de feridas crônicas. *Enferméria Global*, n.33, p. 46-58, 2014.

DEALEY, C. **Cuidando de Feridas: um guia para as enfermeiras.** São Paulo, Atheneu Editora, 2ª edição, 2001, capítulo 3: p. 49-65, capítulo 4: p. 68-89; cap. 9: p. 200-207.

DE CARVALHO, L.S. et al. Características botânicas, efeitos terapêuticos e princípios ativos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*). *Arq. Cienc. Saúde* UNIPAR, Umuarama, v.19, n.2, p.147-157, 2015.

ERENO, C. et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A*., v.95, p.932–9, 2010.

DOS SANTOS NEVES, J.S. et al. Evaluation of the osteogenic potential of *Hancornia speciosa* latex in rat calvaria and its phytochemical profile. *J. Ethnopharmacol*., v.183, p.151–158, 2016.

FERREIRA, H.C. et al. Endothelium-dependent vasodilatation induced by Hancornia speciosa in rat superior mesenteric artery. Phytomedicine, Germany, v.14, p.473–478, 2007a.

FERREIRA, H.C. et al. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of Hancornia speciosa via phosphatidyl-inositol 3-kinase. J. Ethnopharmacol., Copenhagen, v.109, p.161–164, 2007b.

FLORIANO, J.F. et al. Comparative study of bone tissue accelerated regeneration by latex membranes from *Hevea brasiliensis* and *Hancornia speciosa. Biomed. Phys. Eng. Express*, v.2, n.4, 2016.

FOLKMAN, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr. Mol. Med*., v.3, n.7, p.643-651, 2003.

FRADE, M.A.C. et al. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. *An. Bras. Dermatol*., v.87, n.1, p.45-51, 2012.

GRANDI, T.S.M. et al. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. Acta Bot. Bras., v.3, n.2, p.185-224, 1989.

GROEBER, F. et al. Skin tissue engineering - in vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Ver*, v.63, p.352, 2011.

GUIDELLI, E.J. et al. Silver nanoparticles delivery system based on natural rubber latex membranes. *J Nanopart Res*., v.15, p.1-9, 2013.

GWAK, J. H.; SOHN, S. Y. Identifying the trends in wound-healing patents for successful investment strategies. *PLOS ONE*, v.12, n.3, e0174203, 2017.

JACOB, A. et al. The effects of Malaysian propolis and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.15, p.294, 2015.

LI, J. et al. Pathophisiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.*, v. 25, p.9-18, 2007.

MALMONGE, J.A. et al. Comparative study on technological properties of latex and natural rubber from *Harconia speciosa* Gomes and *Hevea brasiliensis*. *J. Appl. Polym. Sci*., v.111, p.2986–2991, 2009.

MANDELBAUM, S.H. et al. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte II. *An Bras Dermatol*, v.78, n.5, p.525-542, 2003.

MARINHO, D.G. et al. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol*, v.35, p.530-537, 2011.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol*., v.84, n.3, p.257-62, 2009.

MOTALEB, M.A. et al. Herbal healing: an old practice for healthy living among Khumi, Marma and Tripura communities of Thanchi Upazila, Bangladesh. *European J. Med. Plants*, v.5, n.1, p.23-52, 2015.

PEGORIN, G.S. et al. Physico-chemical characterization and tissue healing changes by Hancornia speciosa Gomes latex biomembrane. *J Biomed Mater Res*., p. 1– 11, 2020.

PENHAVEL, M.V.C. et al. Efeito do gel da seiva do látex da *Hevea brasiliensis* na cicatrização de lesões cutâneas agudas induzidas no dorso de ratos. *Rev. Col. Bras. Cir*., v.43, n.1, p.048-053, 2016.

PEREIRA, R. F.; BÁRTOLO, P. J. Traditional Therapies for Skin Wound Healing. *Advances in Wound Care*, v.5, n.5, p.208–229, 2016.

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

RAULF, M. The latex story. *Chem. Immunol. Allergy*, v.100, p.248-255, 2014.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, v.49, n.1, p.35–43, 2012.

RIBEIRO, T.P. et al. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Hancornia speciosa* latex in *Allium cepa* root model. *Braz J Biol*, v.76, n.1, p.245-249, 2016.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais do domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. Cienc. Agrotec., Lavras, v.25, n.1, p.102-123, jan./fev. 2001.

RUSTAD, K.C.; GURTNER, G.C. Mesenchymal stem cells home to sites of injury and inflammation. *Adv Wound Care*, v.1, p.147, 2012.

SANTOS, A.A.R. et al. Nursing students' knowledge of wound evaluation and treatment. *Rev. enferm*. UERJ, Rio de Janeiro, v.18, n.4, p.547-52, out/dez. 2010.

SHAW, T.J.; MARTIN, P. Wound repair at a glance. *Journal of Cell Science*, v.122, n.18, p.3209–3213, 2009.

SILVA, C.G. et al. Hancornia speciosa Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. Journal of Ethnopharmacology. Copenhagen, v.137, p.709-711, 2011.

SILVA JUNIOR, J.F. A cultura da mangaba. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal, v.26, n.1, apr. 2004.

SILVA JÚNIOR, J.F da; LEDÓ, A.S. A cultura da mangaba. Aracajú: EMBRAPA Tabuleiros Costeiros, 2006, 253 p.

SILVA, M. A. B. et al. Ethnobotanical survey of plants used as anti-hyperlipidemic and anorexigenic by the population of Nova Xavantina-MT, Brazil. Rev. Bras. Farmacogn., Curitiba, v.20, n.4, p.549-562, aug./sept. 2010.

SILVA, T.F.et al. Bacterial community associated with the trunk latex of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) grown in the northeast of Brazil. *Anton Leeuw Int J G*., v.99, n.3, p.523-532. 2011.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research*, v.37, n.5, p.1528–1542. 2009.

WU, M. et al. Current prevalence rate of latex allergy: Why it remains a problem? *J. Occup. Health*, v.58, n.2, p.138-144, 2016.

CAPÍTULO I

PERSPECTIVAS DE TRATAMENTOS PARA FERIDAS DE DIFÍCIL CICATRIZAÇÃO EM DIABÉTICOS

RESUMO

Diabetes mellitus representa uma das maiores epidemias no mundo. Dentre as complicações mais comuns e graves dessa doença está o comprometimento das habilidades de autoreparo e cicatrização de tecidos. Assim, é urgente o desenvolvimento de terapias mais eficazes e mais acessíveis economicamente para cicatrização de feridas em diabéticos. O objetivo desse trabalho foi realizar uma revisão sistemática para indicar tendências e lacunas sobre os principais produtos e terapias usados para melhorar o processo de cicatrização de feridas de pessoas diabéticas. Para isso, foi realizada uma análise bibliométrica da literatura mundial buscando identificar: os principais dados cienciométricos, a metodologia do estudo, abordando o ensaio biológico adotado, tipo de tratamento, e os efeitos terapêuticos dessas terapias. Como resultado foi observado o uso de ampla variedade de tecnologias para o manejo e tratamento de feridas. Dentre os métodos físicos mais utilizados, as terapias usando pressão negativa (NPWT) receberam destaque. Os efeitos mais comuns das NPWT sobre as feridas foram redução da umidade, modulação da resposta inflamatória e estímulo da proliferação celular. Além dos métodos físicos, as terapias com células e com tecidos da bioengenharia também estão sendo amplamente usadas. Os efeitos comumente associados a esses tratamentos são o estímulo da proliferação celular, do colágeno e do tecido de granulação, além do efeito anti-inflamatório. A maioria das terapias mencionadas apresentam disponibilidade limitada e são de alto custo. Tratamentos alternativos os quais usam recursos naturais a base de plantas podem ser um recurso promissor para o tratamento de feridas difíceis de curar. Dentre os trabalhos analisados, foram encontradas espécies de plantas que apresentaram efeito antioxidante, anti-inflamatório, angiogênico e hipoglicêmico, que estimulam a produção de colágeno, a proliferação celular e a expressão de genes. Todo esse conjunto de dados tem extrema relevância científica, pois em muitas situações as modalidades padrões de tratamentos não são suficientes para a cura de algumas úlceras e necessitam de terapias alternativas ou complementares.

Palavras-chave: cicatrização de feridas, diabetes, revisão sistemática, regeneração de tecidos

1. INTRODUÇÃO

A Diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica de origem múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade deste hormônio exercer adequadamente suas funções no organismo, e, consequentemente causar a elevação nos níveis de glicose no sangue (SPAMPINATO et al., 2020). É considerada uma doença grave, crônica, de evolução lenta e progressiva que necessita de tratamento longo e continuado (BRASIL, 2006). Existem diferentes tipos e classificações para essa doença, causada tanto por fatores genéticos quanto por ambientais. A diabetes tipo 1 é uma doença autoimune de herança poligênica, na qual ocorre uma destruição das células produtoras de insulina do pâncreas (células β). A diabetes tipo 2, uma doença também poligênica, possui etiologia complexa e multifatorial com fortes fatores ambientais, como hábitos dietéticos e sedentarismo. Este tipo de diabetes se desenvolve quando as células β pancreáticas não conseguem produzir insulina suficiente para compensar a resistência à insulina causada, por exemplo, pela obesidade (ADA, 2014; CHAUDHARY; TYAGI, 2018). A diabetes mellitus gestacional pode ocorrer durante a gravidez, pois neste período grandes quantidades de hormônios hiperglicemiantes são produzidos com consequente aumento compensatório na produção de insulina devido à resistência à insulina gerada. Essa condição pode ou não persistir após o parto. Ainda existem outros tipos de diabetes, as quais são decorrentes de defeitos genéticos associados com outras doenças ou com o uso de medicamentos (BAYNEST; 2015; SDB, 2019).

DM representa uma das maiores epidemias já enfrentadas pelo mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em subdesenvolvidos (ZIMMET et al., 2016). Dentre as causas desta doença, a adoção de estilos de vida pouco saudáveis como sedentarismo, dieta inadequada e obesidade são os grandes responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência do diabetes em todo o mundo. Estimativas globais da Federação Internacional de Diabetes (IDF) demonstram que atualmente 463 milhões de adultos com idades entre 20 e 79 anos são portadores de diabetes, o que representa 9,3% da população mundial em 2019. Além disso, ela prevê que esse número aumente para 578 milhões (10,2%) em 2030 e para 700 milhões (10,9%) em 2045 (IDF, 2019).

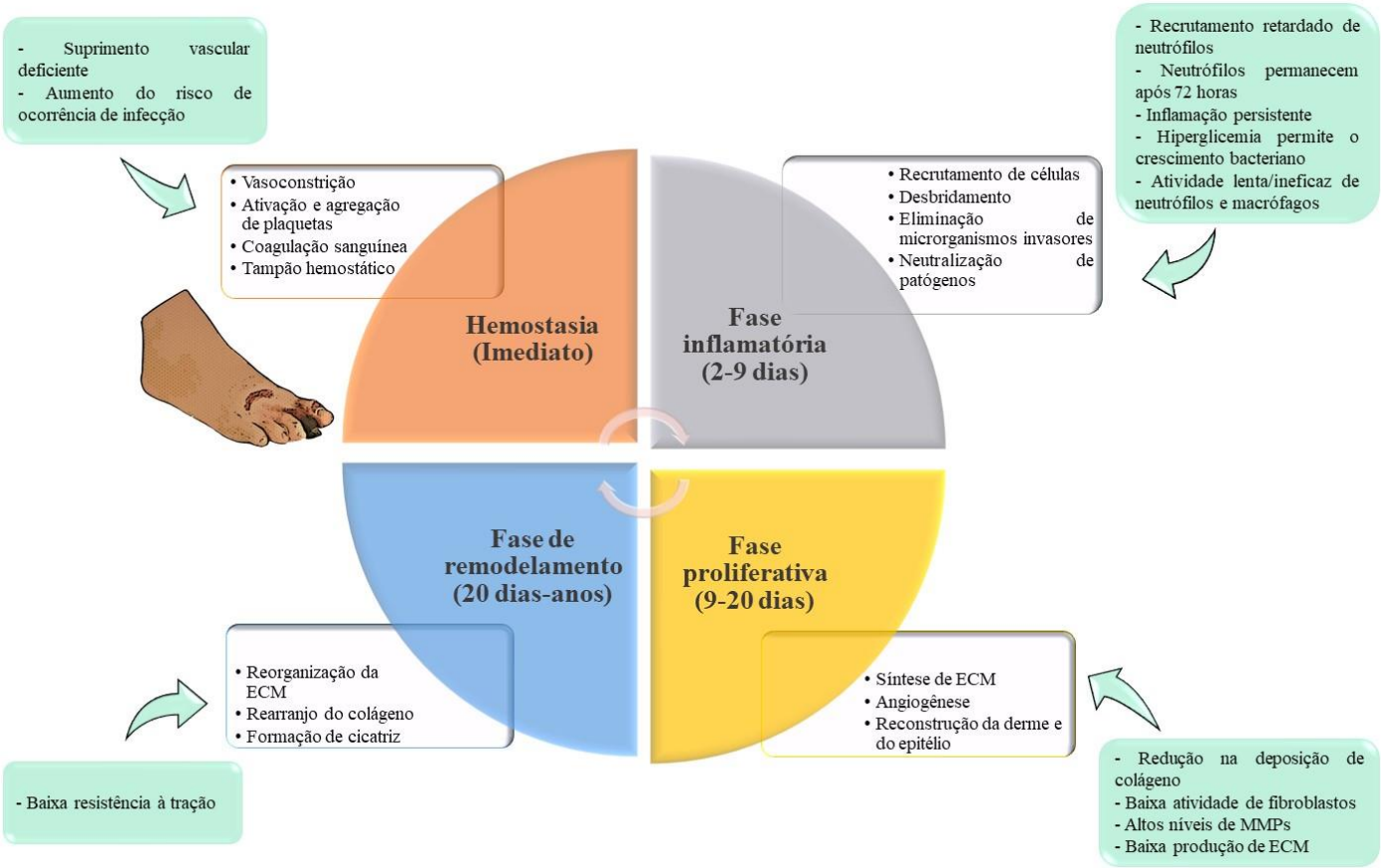
O aumento no número de casos impacta diretamente nos gastos para tratamento dessa doença. As despesas com serviços de saúde estão ligadas principalmente as complicações desta doença, tais como: a necessidade de realizar diálise por insuficiência renal crônica, problemas cardiovasculares, enfarte, e as cirurgias para amputações de membros inferiores (BRASIL,

2016). Em números, a IDF calculou um gasto anual de cerca de US$ 760 bilhões para tratamento de diabetes em 2019 em todo mundo. A mesma instituição estima que as despesas poderão chegar a US$ 825 bilhões em 2030 e US$ 845 bilhões em 2045 (IDF, 2019).

Dentre as complicações mais comuns e graves do diabetes mellitus está o comprometimento das habilidades de autoreparo e cicatrização de tecidos (DINH et al., 2011). O processo de cicatrização é prejudicado no diabetes devido a fisiopatologia complexa dessa doença que envolve problemas vasculares, neuropáticos, imunológicos e bioquímicos (GREENHALGH et al., 2003). No estado normal de cicatrização segue 4 fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação, que se sobrepõem no espaço e no tempo e ocorrem de forma altamente integrada (GOSAIN; DIPIETRO, 2004). No entanto, as feridas de diabéticos, não seguem uma cascata de cicatrização orquestrada e saudável (MUSTOE et al., 2006) podendo se transformar em feridas crônicas. As feridas crônicas exibem um processo de cicatrização patologicamente atrasado, não apresentando progresso razoável em um intervalo de tempo esperado entre 3-6 semanas (OLSSON et al., 2018; MARTINENGO et al., 2019).

Na diabetes, a alta taxa de glicose no sangue está associada com aumento da rigidez vasos sanguíneos, que por sua vez causam circulação mais lenta e disfunção microvascular, resultando na redução oxigenação dos tecidos (DINH et al., 2011). As alterações vasculares também são responsáveis por redução da migração de leucócitos para tecido lesionado (GREENHALGH et al., 2003). Outras consequências destes problemas são: inflamação prolongada, disfunção em fibroblastos e queratinócitos, diminuição da angiogênese e neovascularização, alta expressão de metaloproteases, danos causados por espécies que reativas ao oxigênio (ROS) e pela formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), diminuição da resistência imunológica do paciente e neuropatia (GUO; DIPIETRO, 2010). Todos estes eventos prejudicam a cura da ferida nos diabéticos (Figura 1) e uma das complicações mais comuns são as úlceras do pé diabético (DFUs). Pacientes diabéticos têm um risco ao longo da vida de 15–25% de desenvolver úlceras de pé diabético, dos quais 40–80% torna-se tão gravemente infectado que envolve o osso, levando à osteomielite (GERAGHTY; LAPORTA, 2019).

Figura 1. As quatro etapas do processo de cicatrização e alterações comumente encontradas em cada etapa no processo de cicatrização de feridas em pacientes diabéticos (quadros verdes).



Estima-se que, em âmbito mundial, a cada 20 segundos um membro inferior é perdido devido a complicações relacionadas ao diabetes (ARMSTRONG et al., 2013). Esse dado, reflete o grande impacto das feridas crônicas sobre à saúde do diabético, já que, representam a principal causa de amputações nesses pacientes (MALONE-POVOLNY et al., 2019). Além disso, as feridas crônicas, causam dor, alteram o padrão de sono e a mobilidade do indivíduo, o que afeta diretamente sua capacidade de trabalho e suas atividades do cotidiano. Associada a essa perda de produtividade, os altos gastos com tratamento geram impactos negativos sobre a qualidade de vida do paciente e de seus familiares (SEN et al., 2009; SALOMÉ et al., 2011). Todos esses aspectos afetam a saúde mental dos indivíduos que possuem feridas crônicas que frequentemente se sentem inseguros, impotentes e incapazes de realizar atividades diárias e de cumprir seu papel na sociedade (DE ALMEIDA et al, 2014).

Mediante aos prejuízos causados aos portadores dessa doença, o desenvolvimento de novas estratégias que aumentem a eficácia terapêutica do tratamento dessas feridas se tornou o foco nas pesquisas da área de diabetes (LI et al., 2019). Existem hoje no mercado mais de 3.000

tipos de produtos destinados ao tratamento de feridas difíceis de curar, como as úlceras diabéticas (JAFFE; WU, 2019). Dentre essas opções, cita-se como padrão ouro o uso de alginatos, hidrogéis, *foams* e hidrocoloides, que ajudam na manutenção de um ambiente com condições ideais de umidade (BROUSSARD; POWERS, 2013). Por outro lado, encontra-se a utilização de terapias mais sofisticadas como fatores de crescimento, enxertos de pele, células-tronco, proteínas da matriz extracelular, nanopartículas, terapia gênica, oxigenoterapia, pressão negativa, dentre outras tecnologias, as quais ainda possuem uso limitado devido aos seus altos custos e evidência clínica insuficiente acerca de sua eficácia (GILLETTE et al., 2019; JAFFE; WU, 2019).

Embora exista uma grande diversidade de produtos disponíveis para o tratamento de feridas é crucial que estes sejam economicamente acessíveis para a grande maioria da população (SANTOS et al., 2010; DA SILVA et al., 2014). O uso de plantas medicinais em medicamentos para a regeneração de tecidos representa um recurso acessível e economicamente viável, que pode ser adquirido e utilizado também em países subdesenvolvidos. Tais países possuem alta incidência de lesões crônicas, em especial em populações carentes e portadores de diabetes (MALDELBAUM et al., 2003).

Apesar desses inúmeros procedimentos e produtos destinados ao tratamento de feridas crônicas, não há no mercado um tratamento definitivo e completamente eficaz para as feridas crônicas. Aqui, é proposto uma revisão sistemática frente ao amplo espectro de produtos e terapias que têm sido estudados e indicados para melhorar a cicatrização de feridas de pessoas diabéticas. Assim, esta revisão discute tendências e lacunas acerca de modalidades padrões e as novas tecnologias, bem como seus efeitos sobre o processo de cicatrização de feridas. Além disso, será discutido como os tratamentos alternativos a base de produtos naturais extraídos de plantas podem acelerar o processo de cicatrização.

2. METODOLOGIA

2.1 Estratégia de busca

Para identificar estudos elegíveis sobre tratamentos que têm sido utilizados no processo de cicatrização de feridas de pessoas diabéticas, realizou-se uma pesquisa na base de dados *Web of Science* Core collection (WoS), na qual foram selecionados artigos científicos publicados entre 1991 a 2019. O WoS foi usado neste estudo porque é amplamente reconhecido pela

comunidade científica e abriga as principais plataformas e tópicos de publicações (LI et al., 2018). A busca dos artigos se deu através da pesquisa de uma combinação de palavras-chave presentes no título, resumo ou na lista de palavras-chave das publicações indexadas no Web of Science. Foi utilizada a combinação das seguintes palavras: "healing" AND "diabet*" AND "ulcer*" OR "healing" AND "diabet*" AND "chronic*" OR "healing" AND "diabetic foot" OR "wound" AND "diabet*" AND "ulcer*" OR "wound" AND "diabet*" AND "chronic*".

O uso do asterisco permite a pesquisa de palavras em derivadas e formas plurais. A pesquisa da literatura científica foi realizada em 07/2020 e se restringiu a artigos publicados entre 1991 (quando os resumos dos artigos eram adicionados pela primeira vez à plataforma WOS) e 2019. Para evitar a inserção de estudos que não se enquadrassem no tema de pesquisa, alguns refinamentos foram feitos. Portanto, excluímos 3.967 de 5.485 artigos, resultando em 1.518 publicações. Neste último refinamento foram também retirados os artigos de revisão bibliográfica e meta-análise.

Os títulos e resumos dos artigos científicos foram avaliados pelos autores para seleção dos estudos que se enquadravam na temática de cicatrização de feridas de pessoas diabéticas. Alguns estudos foram lidos na íntegra, uma vez que, as informações do resumo não eram suficientes para essa tomada de decisão. Os dados extraídos dos artigos científicos elegíveis foram: dados cienciométricos (ano de publicação, número de citações do artigo e fator de impacto do periódico e área de estudo); metodologia do estudo (ensaio biológico adotado; tipo de tratamento, destacando se foram utilizados compostos de plantas, dispositivos tecnológicos, técnicas cirúrgicas ou outros compostos químicos). Após detecção dos tipos de tratamentos foram ainda coletados os dados referentes as fases da cicatrização sobre as quais eles atuam, para inferências a respeito de seus efeitos terapêuticos.

2.2 Análises estatísticas

A fim de verificar se a proporção dos artigos publicados dentro da temática está aumentando temporalmente em relação ao total da plataforma, foi realizada uma correlação de *Spearman*, através da função *cor.test* do pacote *stats* à nível de significância de 5% (BEST; ROBERTS, 1975). Para observar a distribuição dos artigos dentre as técnicas, equipamentos, fármacos e áreas abordadas, utilizou-se a estatística descritiva representada em gráficos obtidos via pacote *ggplot2* (WHICKHAM, 2016). Para verificar a variação da média das citações e dos

fatores de impacto das revistas por ano foi utilizado as análises de correlação conforme citadas anteriormente.

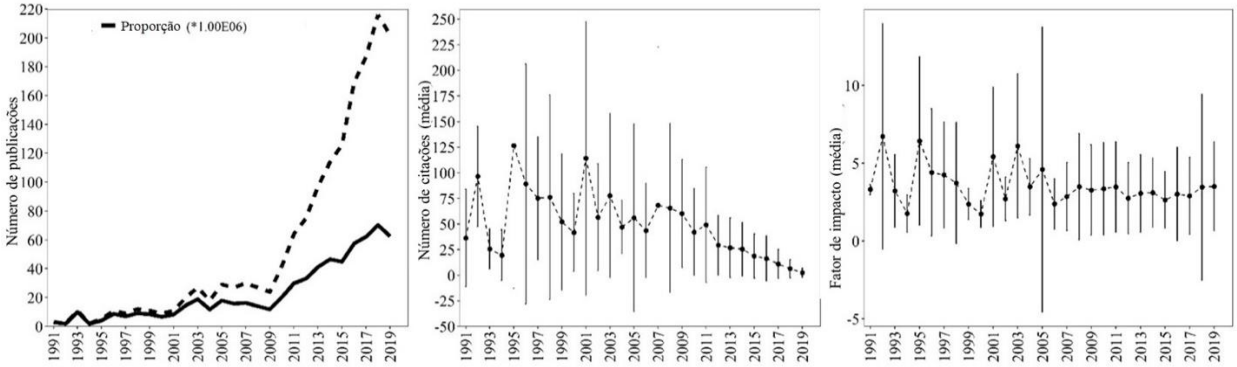
No intuito de avaliar os efeitos dos tratamentos realizados e relatados nos artigos (por ex. a utilização dos diferentes equipamentos) primeiramente converteu-se a matriz de dados em uma matriz de distância de *Bray-Curtis* através da função *Vegdist* e depois realizou-se uma *Análise de Coordenadas Principais (PCoA),* através da função *Cmdscale nos pacotes Vegan e Stats* respectivamente (GOWER, 1966; OKSANEN et al., 2013). Após isso, foi elaborado um plot aluvial para demonstrar a relação de cada equipamento com as células que se proliferaram no tratamento. Além disso, a fim de agrupar os fármacos e as plantas utilizadas de acordo com efeitos que obtiveram, foram elaborados dendrogramas (clusters) através da função *Hcluster* do pacote *Stats* e método *UPGMA* como coeficiente de correlação cofenética (LANGFELDER; HOVATH, 2012). Deve-se ressaltar que as explicações das abreviações utilizadas nos gráficos estão na Tabela 1 do material suplementar. Além disso, todos os gráficos e análises foram realizadas no programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Tendências e indicadores de qualidade dos artigos que abordam cicatrização de feridas em diabéticos

Entre 1991 a 2019, a proporção anual entre o número de publicações sobre o tema avaliado e o número total de artigos disponíveis na plataforma, apesar das oscilações, aumentou significativamente ($r = 0.94$, $P = 1.169e^{-07}$) (Figura 2 a). Além disso, para o mesmo período, no que diz respeito às publicações somente da área em questão, o número de artigos científicos que investigaram o mecanismo de cicatrização de feridas de pessoas diabéticas e como interferir nesse processo também aumentou ($r = 0,96$, p $P < 2.2e^{-16}$) (Figura 2 a). De uma forma geral os dados obtidos mostram que o número de publicações tem aumentado ao longo do tempo, indicando que a pesquisas nesta área tem recentemente atraido mais atenção dos pesquisadores. Esse aumento de interesse provavelmente é consequência do aumento no número de casos da doença, o que traz consigo o maior investimento por parte dos governantes e empresas privadas na busca por novos medicamentos. Atualmente, aproximadamente 9,3% da população mundial sofre de diabetes, sendo que o número de mortes devido a essa doença e suas complicações em 2019 foi estimado em 4,2 milhões (IDF, 2019).

Figura 2. Informações bibliométricas dos artigos a respeito de tratamentos usados em feridas de diabéticos. **A**. Número e proporção anual de publicações que tratam sobre o tema de cicatrização de feridas de pessoas diabéticas da coleção principal da plataforma Web of Science entre 1991 e 2019. Número relativo dessas publicações em proporção (linha continua) ao número total de publicações da plataforma, e o número total de publicações relacionadas às feridas de pessoas diabéticas (linha pontilhada de publicações por ano; **B**. frequência de citações por artigo; **C**. fator de impacto dos periódicos que publicaram artigos sobre o tema.



Já está bem estabelecido na comunidade científica que o número de citações é uma ferramenta importante para avaliar o impacto de um determinado trabalho em uma área de conhecimento (CARNEIRO et al., 2008). Neste estudo foi observado que o número de citações dos artigos variou de zero a 873, tendo um valor médio de 1,03 citações (Figura 2 b). O trabalho mais citado foi elaborado por Wu e colaboradores (2007) e é intitulado *"Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis"*. Esse artigo mostra os benefícios das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BM-MSCs) na cicatrização de feridas de pessoas diabéticas. Naturalmente, os artigos mais antigos (mais de 20 anos) apresentaram maior número de citações, isso é comportamento comum em pesquisas bibliométricos (CARNEIRO et al., 2008).

Outro parâmetro utilizado para avaliar a qualidade da produção científica foi o fator de impacto das revistas no qual os artigos foram publicados (Figura 2 c). Fator de impacto (IF) é um método bibliométrico para avaliar a importância de periódicos científicos em suas respectivas áreas. É uma medida que reflete o número médio de citações de artigos científicos publicados em determinado periódico (CAMPBELL, 2008; YANG; ZHANG, 2013). Em relação ao fator de impacto (JCR), dentre os periódicos que apresentaram avaliação, os valores variaram entre 0,03 e 59,1, apresentando valor médio de 3,31 (Figura 2c). Esse alto valor médio de IF indica que, de forma geral, os artigos sobre potenciais tratamentos para feridas em diabetes são publicados em revistas de comunicação científica de alta qualidade e reconhecidas no meio científico.

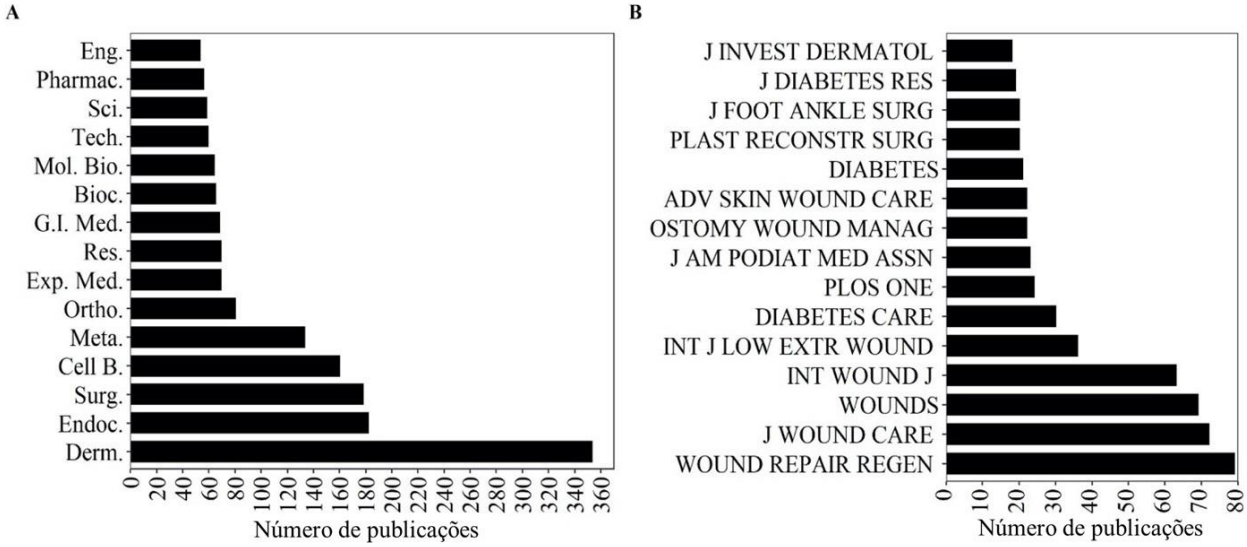
3.2 Áreas do conhecimento que publicam sobre cicatrização de feridas de diabéticos

Os artigos referentes ao tema foram publicados principalmente nas seguintes áreas do conhecimento: dermatologia, endocrinologia, cirurgia, biologia celular e metabolismo (Figura 3-A). Essas áreas foram pré-definidas pela plataforma Web of Science e utilizadas no presente estudo. Destaca-se a área de dermatologia, a qual reuniu o maior número das publicações (350). O principal foco da dermatologia é a pele, a qual é o tecido que separa o corpo humano do ambiente externo. Esta função o expõe a inúmeras agressões físicas, químicas e biológicas. É conhecido que os portadores de diabetes miellitus apresentam peculiaridades que os tornam suscetíveis a dermatoses por vezes pouco frequentes em não-diabéticos. Muitas de suas doenças necessitam de diagnostico rápido e tratamento imediato, para que sejam evitadas complicações ocasionalmente graves ou mesmo fatais (MINELLI et al., 2003).

Quanto aos periódicos que publicaram sobre a temática (N= 486) (Figura 3-B), destacam -se a "Wound Repair and Regeneration" (N= 79, 5,2% do total de publicações), o "Journal of Wound Care" (N= 72, 4,7% do total de publicações), "Wounds: a Compendium of Clinical Research and Practice" (N= 69, 4,5% do total de publicações) e "International Wound Journal" (N= 63, 4,1% do total de publicações). Essas publicam 4 ou mais volumes anuais, a submissão é gratuita, fator de impacto médio de 1,96 (entre 0,54 e 2,82) e, quando pago pelo autor, há a possibilidade de publicação em *open access*. Apesar dessas revistas se sobressaírem, é perceptível que o interesse é global e que não há um periódico principal quando objetiva-se publicar sobre feridas de pessoas diabéticas, diante ao número de periódicos que se expuseram o tema. De fato, a escolha de um periódico para publicação não é fácil e/ou clara, essa pode ir além da composição do manuscrito e depender também de fatores determinados pelos periódicos como: visibilidade, impacto, tempo de revisão, periodicidade, valores cobrados, dentre outros (ZIOBROWSKI; GIBLER, 2000; LEWALLEN; CRANE, 2010). A gratuidade para submissão e o fator de impacto são bastante atrativos e gera uma competição entre as editoras/periódicos (LABAND; PIETTE, 1994; GASPARYAN, 2013), logo, é comum não haver uma hegemonia para a publicação da temática. A possibilidade de disponibilizar os artigos de modo aberto (*open access)* também têm influenciado bastante na escolha do meio de publicação, visto que a gratuidade no acesso garante maior visibilidade e divulgação, porém, a exigência de pagamento para ofertar as publicações, pode impedir que eles sejam acessados ou que o periódico seja escolhido (WARLICK; VAUGHAN, 2007; GASPARYAN, 2013). Dessa

forma, fica evidente que todos esses fatores podem variar em importância para o autor e influenciará na tomada de decisão sobre onde um manuscrito deve será enviado para que tenha o impacto desejado. Isso, adicionado a alta oferta de periódicos, resultou aqui em uma ampla gama de revistas que trazem a temática discutida.

Figura 3. **A.** Distribuição do número de artigos por área do conhecimento (15 principais). **B.** Nome dos 15 periódicos que paresentam maior número de publicações sobre o tema.



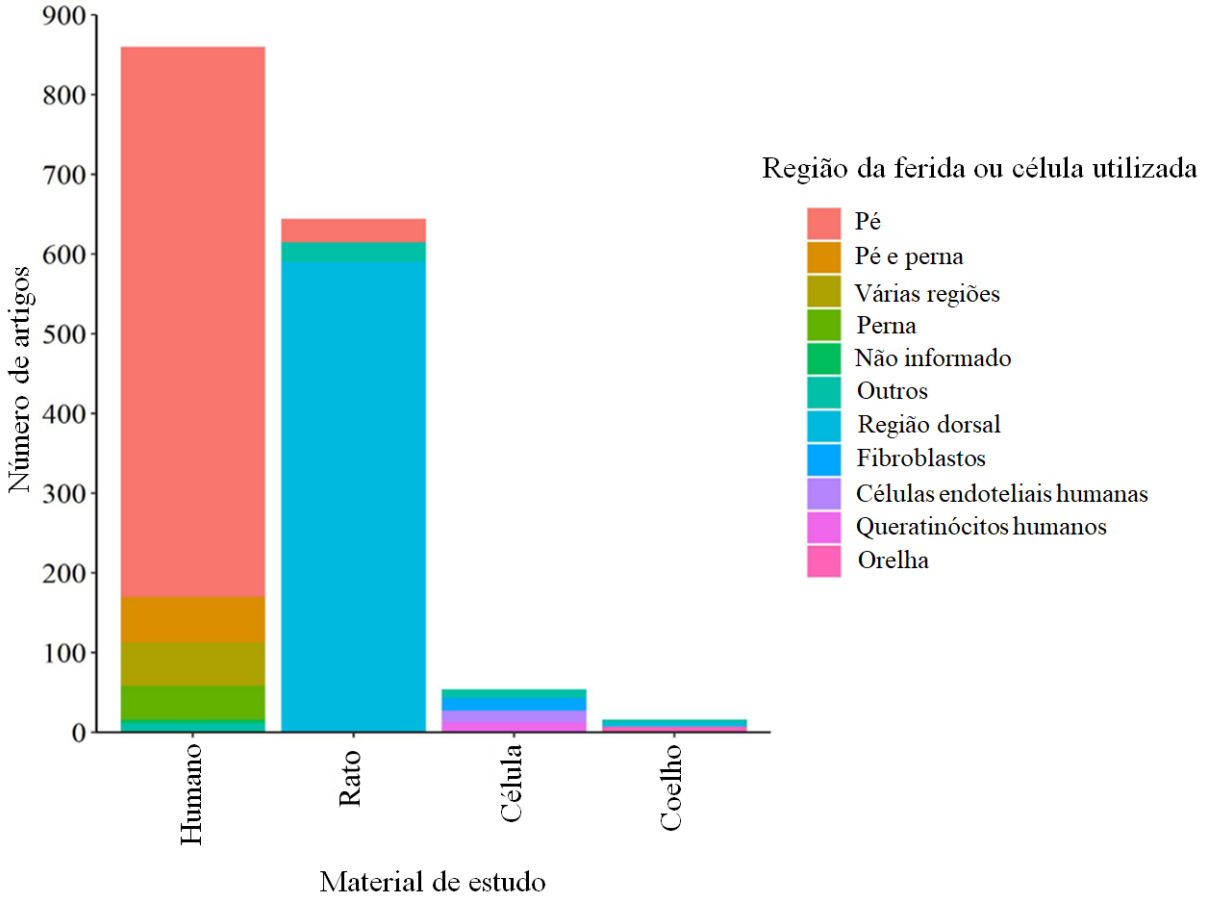
Abreviações: Derm.:Dermatology, Endoc.:Endocrinology, Surg.: Surgery, Cell B.: Cell Biology, Meta.: Metabolism, Ortho.Orthopedics, Exp. Med.: Experimental Medicine, Res.: Research, G.I. Med.: General & Internal Medicine, Bioc.: Biochemistry, Mol. Bio.: Molecular Biology, Tech.: Technology, Sci.: Science, Pharmac.: Pharmacology e Eng.: Engineering.

3.3 Material de estudo de cicatrização de feridas de diabéticos

No tocante aos dados metodológicos avaliados neste trabalho, a maioria dos estudos (860 artigos) avaliaram o processo de cicatrização diretamente em pacientes diabéticos, sendo os estudos realizados com autorização dos pacientes e do comitê de ética em pesquisa com humanos (Figura 4). Nesses estudos, a maioria dos pacientes tinham a área dos pés atingida (Figura 4), o que é classificada como pé diabético (647 estudos foram realizados em pés). O acometimento dos pés nestes pacientes está associado com um processo crônico que inclui complicações da neuropatia, vasculopatia, imunodeficiência e descontrole da glicemia, e que criam condições propícias para o aparecimento da úlcera plantar no pé. Diferentes fatores estão associados ao agravamento das úlceras nos pés diabéticos, pode-se citar: 1) perda na sensibilidade protetora dos pés, consequência da neuropatia periférica; 2) doença arterial periférica, condição circulatória a qual os vasos sanguíneos estreitos reduzem o fluxo de sangue

para os membros; 3) as alterações biomecânicas provocadas pela destruição osteoarticular e deformidades decorrentes da neuroartropatia de Charcot, responsáveis por alterar as pressões de apoio na planta do pé (BRODSKY, 1993; DEL CORE et al., 2018). Estes problemas costumam sobrepor-se às deformidades previamente instaladas, tais como dedos em garra, contratura do pé equino e distúrbios cutâneos provocados pelo ressecamento da pele (FERREIRA, 2020). Mesmo com tratamento, muitos casos de pé diabéticos evoluem e a amputação do membro é necessária. Estudos demonstram que o risco de amputação ultrapassa 20% dos casos de infecção moderada ou grave (WUKICH et al., 2013). Os níveis de amputação geralmente usados envolvem o antepé, o mediopé, Syme, transtibial (abaixo do joelho), e transfemoral (acima do joelho) (DEL CORE et al., 2018).

Figura 4. Distribuição do número de artigos de acordo com o modelo experimental utilizado nos estudos de cicatrização de feridas de pessoas diabéticas da coleção principal da plataforma Web of Science entre 1991 e 2019.



Modelos experimentais em animais também são muito importantes nos estudos de cicatrização em diabéticos (Figura 4), e têm sido usados extensivamente na obtenção do

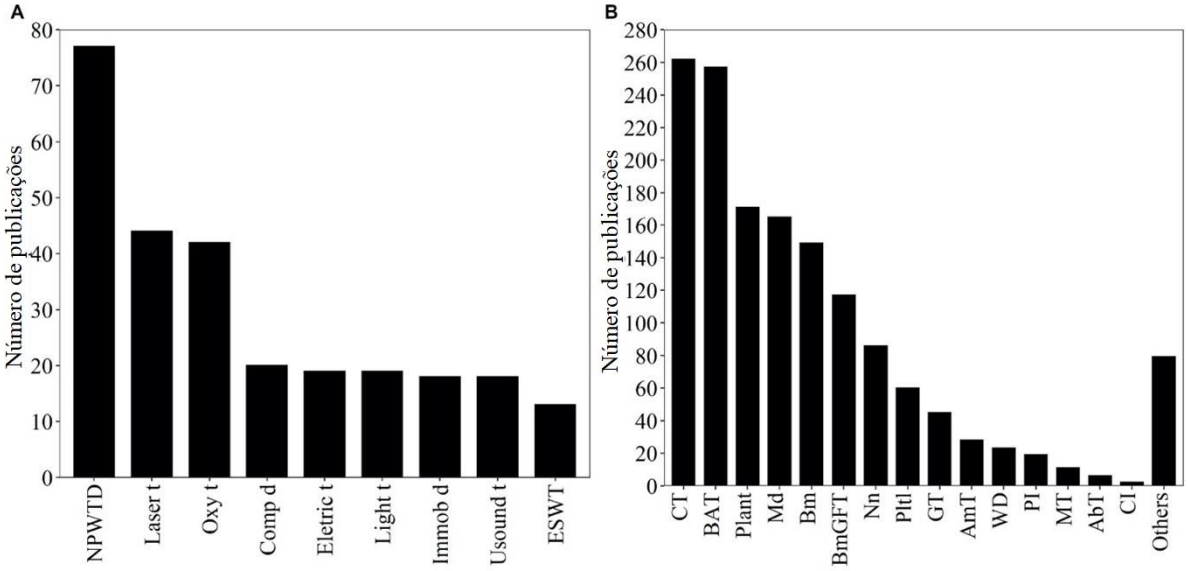
esclarecimento sobre esta doença (SIEHER; TRAYSTMAN, 1993). Neste trabalho foram identificados 644 artigos os quais usaram roedores (ratos e/ou camundongos) como modelo experimental de diabetes, predominando os estudos com feridas dorsais. Dentre os modelos citados podem se destacar: 1.) modelos genéticos, nos quais os animais possuem mutação gênica ou foi produzido um knock-out de um ou mais genes; 2.) modelos induzidos quimicamente, nos quais a diabetes é induzida por drogas; modelos induzidos por dietas ricas em açucares e gorduras; 3.) modelos de diabetes espontâneo, tais como os ratos BB (Biobreading) e os camundongos NOD (Non Obese Diabetic).

Outros modelos experimentais utilizando outros animais ou cultura de células foram pouco citados em estudos de cicatrização de feridas em diabéticos (Figura 4). Para se ter resultados de qualidade no método de indução de diabetes, é necessário a escolha de um modelo que represente a patogenia, o histórico do DM, e ainda, através da indução, reproduza o desenvolvimento de complicações específicas, relacionadas ao diabetes (RADENKOVI”C et al., 2015). Assim, a baixa utilização de sistemas in vitro podem ser explicados pela limitação dessa técnica com relação ao uso de somente um tipo de célula ou uma combinação de apenas alguns tipos de células, o que prejudica a análise em caso de doenças metabólicas multifatoriais, como o caso da diabetes.

3.4 Tratamentos em feridas de diabéticos

Para realizar uma descrição dos principais tratamentos utilizados para curar feridas de pessoas diabéticas, foram criados nesse trabalho dois grandes grupos. No grupo I foram agrupados os principais dispositivos que utilizaram métodos físicos para cicatrização das feridas de pessoas diabéticas, e no grupo II estão agrupados os tratamentos realizados com material biológico obtido de diferentes organismos, fármacos e compostos isolados desses fármacos ou mesmo de organismos como plantas e bactérias (Figura 5).

Figura 5. Principais tratamentos utilizados para curar feridas de pessoas diabéticas. **A.** Distribuição do número de artigos de acordo com os tratamentos categorizados no grupo I, os quais utilizaram métodos físicos como técnicas potenciais para a cicatrização de feridas de pessoas diabéticas. **B**. Distribuição do número de artigos de acordo com os tratamentos categorizados no grupo II, os quais utilizaram materiais biológicos obtidos de diferentes organismos, fármacos e compostos isolados desses fármacos ou mesmo de organismos como plantas e bactérias, como método de cura dessas feridas.



Abreviações: A. Grupo I - NPWTD: Negative pressure wound therapy devices, Laser: Laser therapy, Oxygen: Oxygen therapy, COMPRSN: Compression devices, Eletric: Electric therapy, Light: Light therapy, Immob: Immobilization devices, USG: Ultrasound therapy e ESWT: Extracorporeal shock wave therapy. **B.** Grupo II – Cell: Cell therapy, B.A.tissues: Bioengineered alternative tissues, Growth factor t.: Growth factor therapy, Antimicrobial t.: Antimicrobial therapies e W. dressings: Wound dressings.

Dentre os métodos físicos merecem destaque os dispositivos que se valeram da técnica de terapia de feridas por pressão negativa (NPWT), seguidos da laserterapia (laser) e oxigenoterapia (Oxygen) (Figura 5a).

A terapia de feridas por pressão negativa (NPWT) ou curativo a vácuo (VAC) foi introduzida no Estados Unidos em 1997 e vem sendo cada vez mais utilizada como alternativa aos curativos padrão administrados a feridas complexas. É um método curativo não invasivo, no qual é utilizada uma esponja com poros dilatados sobre ferida, sendo exercida uma pressão controlada subatmosférica sob a mesma, para promover a cura (SEPÚLVEDA et al., 2009). Esse sistema traz como benefícios para a ferida: aumento do fluxo sanguíneo, redução do edema, desenvolvimento precoce de tecido de granulação, diminuição da ferida, remoção de exsudato, redução da carga bacteriana e redução da concentração de proteases no local da lesão, a qual pode prejudicar a cura (MORYKWAS et al, 2001; MOUËS et al., 2004; SAXENA et al., 2004; APELQVIST et al, 2017; JAFFE; WU, 2019). Além disso, foi demonstrado números

reduzidos de amputações de pé diabéticos em grupos de pacientes tratados com NPWT em comparação com aqueles tratados por terapias tradicionais (FRYKBERG; WILLIAMS, 2007). Todos estes efeitos positivos contribuem para um tratamento bem sucedido e de cicatrização mais rápida, o que culmina na diminuição dos gastos com recursos médicos por um longo período e de assistência de enfermagem (LAVERY et al., 2007). Entretanto, a decisão de se utilizar esse tipo de tratamento deve levar em consideração o alto custo dos produtos do sistema NPWT e a necessidade de se ter profissionais treinados para aplicação desse tipo de curativo (HINGORANI et al., 2016).

A terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) é uma alternativa de tratamento capaz de estimular o metabolismo celular através de fotobiomodulação, o que resulta em controle do processo inflamatório e aceleração da cicatrização da ferida (SAMANEH et al., 2015). As alterações físicas e biológicas causadas no tecido geram um baixo fluxo de radicais livres na ferida, estimulam a expressão gênica, a proliferação de fibroblastos, a síntese de colágeno e a angiogênese, além do aumentar a produção de componentes da matriz extracelular, resultando na epitelização precoce da ferida (WHELEN et al., 2001; FARIVAR et al., 2014; SOUSA; BATISTA, 2016). Dentre os efeitos da terapia laser, pode-se observar ainda a sua atividade antibacteriana (MONAMI et al., 2017). Os efeitos biológicos do laser dependem da densidade de energia, comprimento de onda, quantidade de dose, tipo de laser aplicado (se visível ou infravermelho, contínuo ou pulsado) (SAMANEH et al., 2015). No que diz respeito a segurança do uso dessa terapia, um trabalho de revisão e meta-análise sobre os efeitos da LLLT no tratamento do pé diabético, mostrou que este recurso alternativo é seguro, uma vez que nenhum dos estudos selecionados relatou quaisquer efeitos adversos (SANTOS et al., 2020).

A terceira terapia mais empregada como tratamento de feridas de pessoas diabéticas observada nesse trabalho, foi a terapia à base de oxigênio. O oxigênio representa um componente crucial para o processo de cicatrização por ser modulador das respostas celulares e da atividade angiogênica (BISHOP, 2008). O aporte de oxigênio em lesões difíceis de curar é capaz de melhorar e acelerar o processo de cicatrização de feridas (DISSEMOND et al., 2015). Dentre as terapias com oxigênio, destaca-se a oxigenoterapia tópica, um método barato, flexível e que não apresenta efeitos colaterais marcantes. Esse tratamento fornece oxigênio para a ferida por meio de dispositivos portáteis que criam uma pressão externa e aumentam a concentração de oxigênio na área lesionada (DISSEMOND et al.; 2015; AHANGAR et al., 2018). Por outro lado, tem-se a oxigenoterapia hiperbárica (HBOT), um procedimento de alto custo e que demanda elevados esforços por ser um tratamento diário prologando (HINGORANI et al., 2016). Nesse método, o paciente é colocado em uma câmara com alta pressão de oxigênio (de

2 a 3 vezes maior que a pressão atmosférica), o que resulta na entrada de grandes quantidades de oxigênio nos tecidos feridos (TIBBLES; EDELSBERG, 1996). De acordo com a literatura, pacientes que possuíam úlceras no pé diabético e que foram tratados com HBOT apresentaram aumento da angiogênese no leito da ferida, melhora na deposição de colágeno e da função leucocitária e diminuição do edema (LÖNDAHL, 2013). Meta-análise realizada para verificar a eficácia da HBOT no tratamento de úlceras do pé diabético mostrou que esse tratamento possui as taxas mais altas de DFUs totalmente curadas e taxas mais baixas de amputação maiores (SHARMA et al., 2021).

Dentre as três metodologias citadas, nossos resultados mostraram que os procedimentos realizados com NPWT foram os mais utilizados para cicatrização de feridas em diabéticos, sendo empregados praticamente 2 vezes mais que os dispositivos de laser e a base de oxigênio e 4 vezes mais que os demais dispositivos.

Apesar dos métodos físicos serem amplamente usados, os dados desse trabalho mostram que os tratamentos do grupo II são mais frequentes. Assim, foi observado um maior número de publicações no grupo II referentes a feridas de pessoas diabéticas no período analisado. Nessas publicações destacaram-se as terapias realizadas com células, tecidos da bioengenharia, plantas e seus extratos, medicamentos comerciais e biomoléculas isoladas (como aminoácidos, nucleotídeos, glicídios, dentre outros). Destes, chamam a atenção as terapias com células e com tecidos da bioengenharia que juntos representaram praticamente 1/3 das publicações analisadas neste trabalho.

As terapias com células são realizadas geralmente com células como fibroblastos, queratinócitos, células-tronco derivadas da medula óssea (BM-SCs), plaquetas e a fração celular do estroma vascular (SVF) do tecido adiposo para induzir a expressão de citocinas, fatores de crescimento e enzimas que promovem a regeneração das feridas (YOU; HAN, 2014; SAVOJI et al., 2018). No que diz respeito ao mecanismo de ação de cada tipo celular, os queratinócitos atuam principalmente na liberação de fatores de crescimento, como TGF-α, PDGF, bFGF, VEGF e TGF-β) e citocinas (IL-1, -6, -8 e -10), mas não são capazes de sintetizar matriz extracelular. Já os fibroblastos, além de controlarem a proliferação celular através da produção de várias citocinas e fatores de crescimento, induzem a angiogênese, modulam o processo inflamatório e produzem matriz extracelular rica em colágeno, e outras proteínas (YOU; HAN, 2014). As BM-SCs são células-tronco multipotentes capazes de se diferenciar em condrócitos, osteoblastos, adipócitos, miócitos, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais e neuronais (LIU et al., 2009). Além disso, as BM-SCs liberam diferentes mediadores químicos que estimulam a proliferação, migração e diferenciação de células que

participam do processo de regeneração de feridas (CHEN et al., 2012). Estudos pré-clinicos com estas células demonstraram seu potencial regenerativo em feridas difíceis de curar ao reduzir cicatrizes, reduzir o tamanho da úlcera e, também atuar na diminuição da dor do paciente (DEHKORDI et al., 2019). As plaquetas são células que contém proteínas, chamadas de fatores de crescimento, os quais estimulam a migração, proliferação e diferenciação celular e a angiogênese, compensando a atividade prejudicada de células cruciais para a cicatrização de feridas (PATZELT; LANGER, 2012; COBOS et al., 2015). Ainda pode-se citar como efeitos terapêuticos das plaquetas sua capacidade de regular a inflamação na ferida e outras respostas imunes, como o rápido combate às infecções devido seu poder de destruir diretamente as bactérias ou até aumentar a diferenciação de outras células imunes. Além disso, evidências demonstram que mediadores plaquetários estimulam a formação de matriz extracelular e a reestruturação de tecido conjuntivo, o que contribui com a remodelação do tecido, uma etapa importante da cicatrização de feridas (EISINGER et al., 2018). Por sua vez, as células SVF são formadas por uma mistura heterogênea de células endoteliais, fibroblastos, pericitos, pré-adipócitos, células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs), mastócitos e células musculares lisas, as quais mediante diferentes estímulos, apresentam plasticidade e capacidade de proliferar e se diferenciar em várias linhagens celulares (GENTILE et al., 2012). As células SVF aceleram o processo de cicatrização por serem capazes de promover a migração de fibroblastos, estimular a angiogênese, a produção de colágeno e de matriz extracelular nos tecidos feridos (BI et al., 2019).

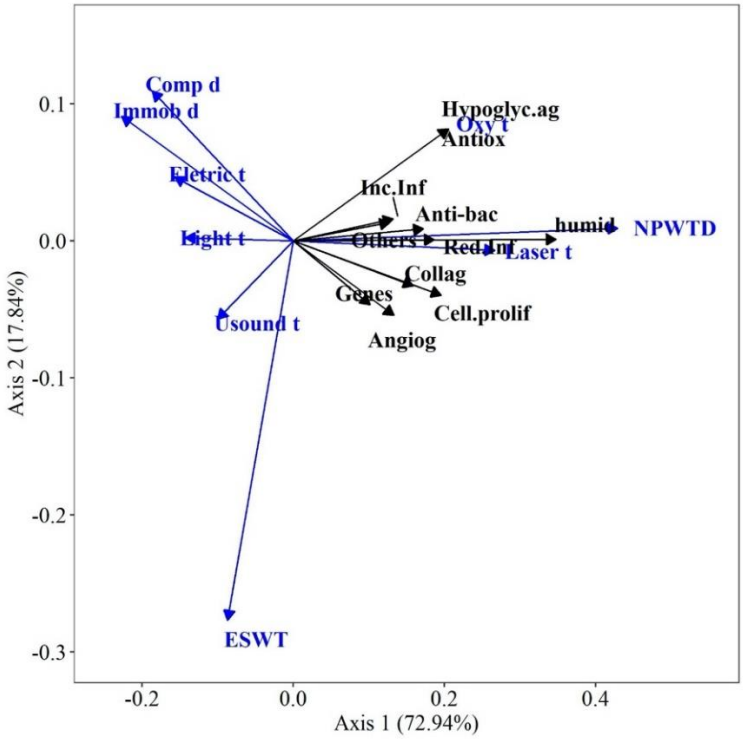
Os tecidos alternativos da bioengenharia (BATs), utilizados como substitutos da pele, são representados por um grupo heterogêneo de biomateriais sofisticados formados basicamente por componentes celulares e acelulares, tanto de origem animal quanto vegetal, os quais tem como objetivo principal estimular o hospedeiro a regenerar o tecido lesionado, substituindo-o por uma nova pele funcional (SNYDER et al., 2012). Os BATs acelulares podem ser subdivididos em diferentes tipos, como os xenoenxertos, colhidos de animais doadores como suínos, bovinos ou equinos; os aloenxertos, os quais são colhidos de tecido humano (derme descelularizada e membranas da placenta humana, por exemplo), ou ainda podem ser combinados a materiais sintéticos para formar uma nova matriz (PARK et al., 2013). São exemplos destes tipos de tecidos: Integra (Integra Life Sciences, Plainsboro, New Jersey), AlloDerm (Life Cell Corp., Woodlands Texas), Graftjacket (Wright Medical Technology, Arlington, Texas), Acell (Acell Inc, Columbia, MD), Primatrix (TEI Biosciences, Massachusetts, USA), Oasis (Healthpoint, Fort Worth, Texas), EZ Derm (Molnlycke, Gothenburg, Sweden), dentre outros (SNYDER et al., 2020). Já o outro tipo de BAT (celular)

contém células vivas, em especial células da pele contidas em uma matriz e podem ser subdivididos em produtos de camada única ou bicamada. Por mais de duas décadas, células de tecidos neonatais estão disponíveis no mercado para tratamento de feridas, sendo que o primeiro produto (Apligraf; Organogenesis, Canton, MA) foi construído em duas camadas que consistem em uma matriz de colágeno bovino semeada com fibroblastos humanos vivos e uma neoepiderme de queratinócito, ambos de origem fetal/neonatal. Tem-se também os produtos de camada única, como o Dermagraft; Organogenesis, Canton, MA. Essa matriz dérmica contém fibroblastos humanos metabolicamente ativos e serve como um substrato dérmico equivalente (NYAME et al., 2014; FRYKBERG; BANKS, 2015). Atualmente, esses substitutos de pele são utilizados para tratar feridas profundas e crônicas, e se demonstram capazes de reduzir a carga bacteriana da ferida, de diminuir a perda de fluidos, de melhorar a produção de citocinas e fatores de crescimento, além de servirem como um curativo que protege a ferida que está cicatrizando (AHANGAR et al., 2018). O sucesso da terapia com substitutos dérmicos está diretamente relacionado com uma adequada preparação do leito da ferida, que deve passar por desbridamento, controle da infecção e restauração da perfusão (SIBBALD et al., 2007; NYAME et al., 2014).

3.5 Correlação entre efeito biológico na ferida e tratamentos

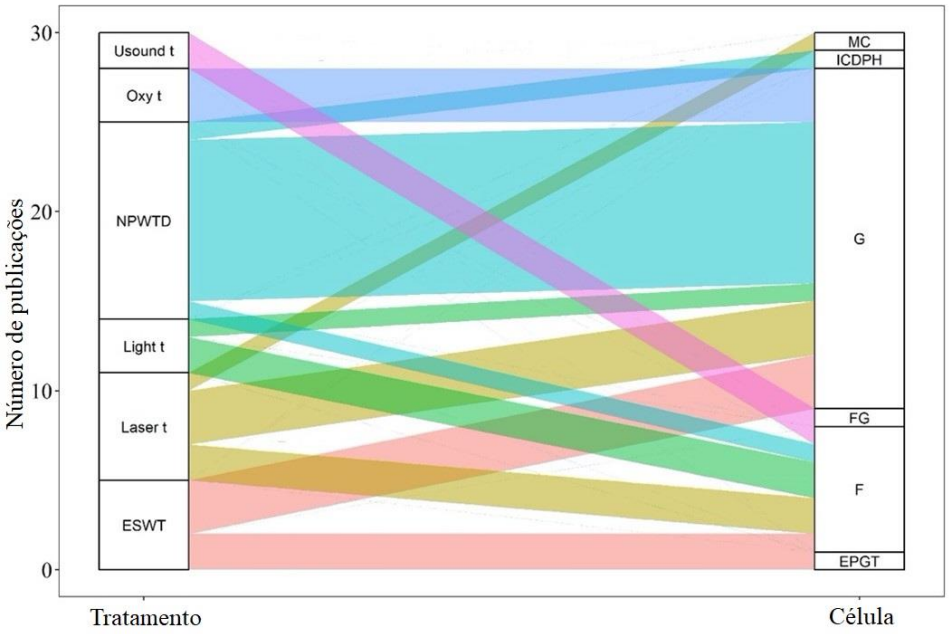
Para entender melhor o efeito biológico de cada tratamento foi realizada uma análise de PCoA, que reteve 90,78 % das informações nos dois eixos (Figura 6). Como resultado, pode-se destacar que os dispositivos de terapia de feridas de pressão negativa- NPWTD promoveram redução da umidade e inflamação das feridas. Já as terapias baseadas em laser (Laser t) também expressaram esses efeitos, além de apresentarem ações antibacterianas. Por outro lado, a oxigenoterapia (Oxy t) se demonstrou eficiente como agente antioxidante e hiploglicêmico. Além disso, essas três classes de dispositivos promoveram, principalmente, a proliferação de granulócitos na área da ferida (Figura 7). Os demais tratamentos não apresentaram como muito efetivos para o tratamento das feridas.

Figura 6. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) repesentando a relação dos dispositivos físicos utilizados para tratamento de feridas em diabéticos e suas respectivas relações com os efeitos.



Abreviações: Comp d: Compression devices, Eletric t: Electric therapy, ESWT: Extracorporeal shock wave therapy, Immob d: Immobilization devices, Laser t: Laser therapy, Light t: Light therapy, NPWTD: Negative pressure wound therapy devices, Oxy t: Oxygen therapy, Ultrasoud t: Ultrasound therapy, Antiox: Antioxidant, Anti-bac:Anti-bacterial, humid: humidity, Hypoglyc ag: Hypoglycemic agent, Genes: Genes, Inc Inf: Increased inflammation, Red Inf: Inflammation reduction, Angiog: Angiogenesis, Cell prolif: Cell proliferation, Collag: Collagen e Others:Others.

Figura 7. Plot Aluvial demonstrando a proporção da relação entre os tratamentos com diferentes dispositivos e os tipos de células que eles promoveram crescimento.

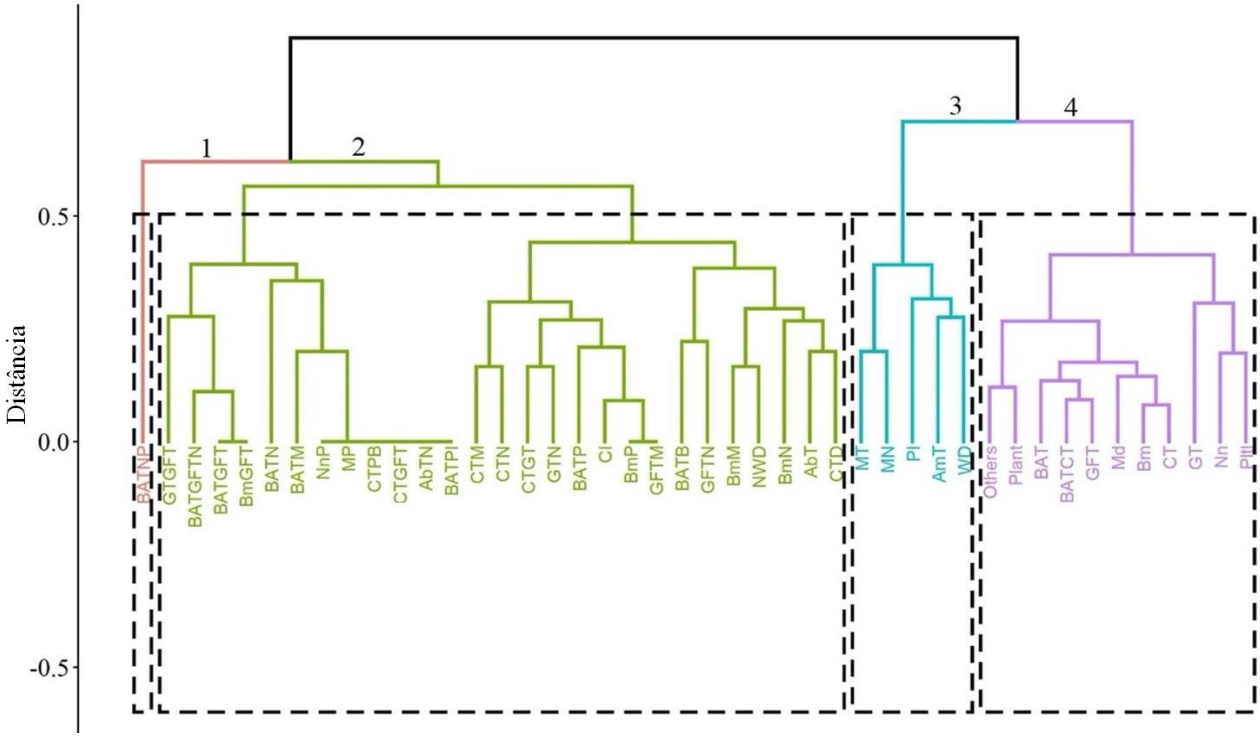


Abreviações: Comp d: Compression devices, Eletric t: Electric therapy, ESWT: Extracorporeal shock wave therapy, Immob d: Immobilization devices, Laser t: Laser therapy, Light t: Light therapy, NPWTD: Negative pressure wound therapy devices, Oxy t: Oxygen therapy, Ultrasoud t: Ultrasound therapy, Mast cells: MC, Inflammatory cells and dinuclear and polynuclear histiocytes: ICDPH, Granulocytes: G, Fibroblasts and granulocytes: FG, Fibroblasts: F, Epidermal proliferation and granulation tissue: EPGT.

Ao agrupar os tratamentos baseados em materiais biológicos e fármacos, grupo II (Figura 8), obteve-se a formação de quatro subconjuntos de procedimentos de acordo com seus efeitos. No subgrupo 1 foram reunidos procedimentos específicos que utilizavam: tecidos alternativos de bioengenharia, nanopartículas e planta - BATNP. Os principais efeitos biológicos observados nos tratamentos com substâncias descritas no subgrupo 1 foram: redução da inflamação, proliferação epidérmica, aumento de tecido de granulação e aceleração do fechamento da ferida. No subgrupo 2 foram reunidos os tratamentos baseados principalmente em terapias de fator de crescimento, nanopartículas, terapia celular, medicamentos e biomoléculas. A resposta ao tratamento observada nesses casos foram principalmente a diminuição da inflamação, deposição de colágeno e aceleração para o fechamento das feridas. No subgrupo 3 foram reunidos os tratamentos baseados em terapias com larvas, inibidores de protease, terapias antimicrobianas e curativos. Nesses casos as repostas observadas foram ação antibacteriana, regulação da expressão de genes que promovem angiogênese, deposição de colágeno, proliferação de células de músculo liso e de células estromais derivadas do tecido adiposo, e aumento da velocidade da cicatrização das feridas. Por fim, no subgrupo 4 foram

reunidos diversos tratamentos semelhantes aos já citados, porém, destacam-se nesse grupo os efeitos relacionados as plantas e ao tratamento com plaquetas, que de forma geral, são agentes antioxidantes, antibacterianos e hipoglicêmicos. Como resposta ao tratamento foi observado o estímulo na angiogênse, o aumento na deposição de colágeno, proliferação de células de músculo liso e aceleramento da cicatrização.

Figura 8. Dendograma contendo o agrupamento dos tratamentos baseados em materiais biológico e fármacos de acordo com seus efeitos.



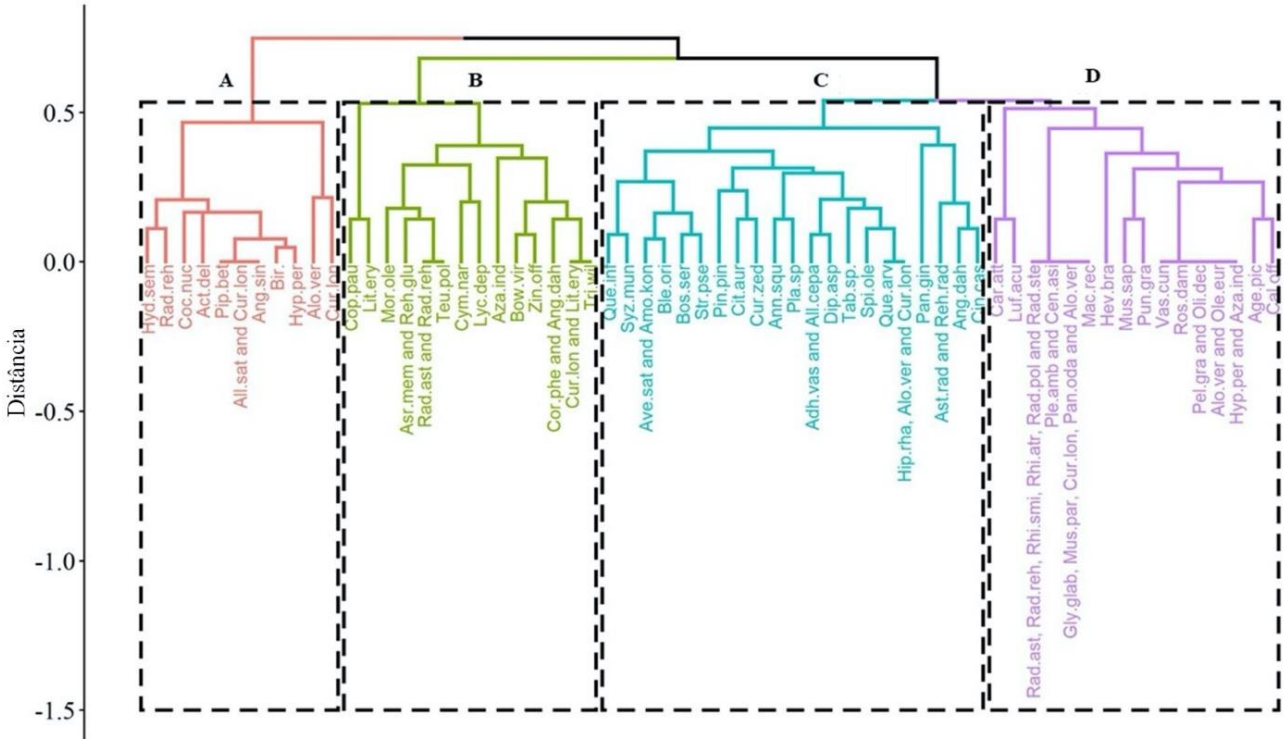
Abreviações: AbT: Antibody therapy, AbTN: Antibody therapy and Nanoparticles, AmT: Antimicrobial therapies, BAT: Bioengineered alternative tissues, BATB: Bioengineered alternative tissues and Biomolecules, BATCT: Bioengineered alternative tissues and Cell therapy, BATGFT: Bioengineered alternative tissues and Growth factor therapy, BATM: Bioengineered alternative tissues and Medications, BATN: Bioengineered alternative tissues and Nanoparticles, BATP: Bioengineered alternative tissues and Platelets, BATPI: Bioengineered alternative tissues and Protease inhibitors, BATGFTN: Bioengineered alternative tissues; Growth factor therapy and Nanoparticles, BATNP: Bioengineered alternative tissues; Nanoparticles and Plant, Bm: Biomolecules, BmGFT: Biomolecules and Growth factor therapy, BmM: Biomolecules and Medications, BmN: Biomolecules and Nanoparticles, BmP: Biomolecules and Plant, CT: Cell therapy , CTGT: Cell therapy and Gene therapy, CTGFT: Cell therapy and Growth factor therapy, CTM: Cell therapy and Medications, CTN: Cell therapy and Nanoparticles, CTD: Cell therapy and Platelets, CTPB: Cell therapy; Platelets and Biomolecules, CI: Connexin inhibitor, GT: Gene therapy, GTGFT: Gene therapy and Growth factor therapy, GTN: Gene therapy and Nanoparticles, GFT: Growth factor therapy, GFTM: Growth factor therapy and Medications, GFTN: Growth factor therapy and Nanoparticles, MT: Maggot therapy, Md: Medications, MN: Medications and Nanoparticles, MP: Medications and Plant, Nn: Nanoparticles: NnP Nanoparticles and Plant, NWD: Nanoparticles and Wound dressings, Others: Others, Plant: Plant, Pltl: Platelets, PI: Protease inhibitors e WD: Wound dressings.

Como relatado anteriormente, não existe medicamento ou produto que promova a completa cura das feridas crônicas de diabéticos. Assim, é urgente o desenvolvimento de terapias ou tratamentos mais eficazes e mais acessíveis economicamente para cicatrização de feridas em diabéticos. Neste trabalho foi mostrado um conjunto de diferentes estratégias utilizadas para tratar feridas crônicas, incluindo as terapias tópicas com o uso de produtos naturais. A seguir será feita uma análise do emprego do uso de produtos naturais como aceleradores do processo de cicatrização de feridas crônicas. A principal vantagem do emprego de produtos naturais é o baixo custo e fácil acesso.

3.6 Tratamentos baseados em produtos naturais

Para analisar os efeitos dos produtos extraídos de plantas no processo de cicatrização foram montados quatro agrupamentos baseados nos efeitos promovidos pelo uso deste material em feridas de pessoas diabéticas (Figura 8). No agrupamento A foram incluídos os extratos vegetais extraídos de espécies tais como: *Aloe vera*, *Curcuma longa*, *Cocos nucifera*, as quais tem como principais efeitos a ação antioxidante, a redução da inflamação, promoção da angiogênese, a regulação de genes e a proliferação celular. Outras espécies tais como: *Azadirachta indica*, *Copaifera paupera*, *Moringa oleífera*, foram agrupadas no grupo B, pois tiveram como principais efeitos a redução da inflamação, o estímulo da angiogênese e a deposição de colágeno. O grupo C incluíram espécies tais como: *Angelica dahurica*, *Dipsacus asper*, *Pinus pinaster*, as quais apresentaram como efeito principal a capacidade de estimular a angiogênese e a deposição de colágeno. O grupo D foi formado com espécies tais como: *Ageratina pichinchensis*, *Matricaria recutita*, *Vasconcellea cundinamarcensis*, as quais apresentam como principal efeito agir como agentes hipoglicêmicos. Todas as características citadas nos 4 grupos atuam sobre as feridas acelerando do processo cicatricial.

Figura 8. Dendograma contendo o agrupamento dos tratamentos baseados em plantas de acordo com seus efeitos.



Abreviações: Act.del=*Actinidia deliciosa;* Adh.vas and All.cepa=*Adhatoda vasica, Allium cepa*; Age.pic=*Ageratina pichinchensis*; All.sat and Cur.lon=*Allium sativum and Curcuma longa*; Alo.ver=*Aloe vera and Olea europaea;* Ang.dah=*Angelica dahurica*; Ang.sin=*Angelica sinensis*; Ann.squ=*Annona squamosa l.*; Asr.mem and Reh.glu=*Astragalus membranaceus and Rehmannia glutinosa libosch*; Ast.rad and Reh.rad=*Astragli radix and Rehmanniae radix*; Ave.sat and Amo.kon=*Avena sativa and Amorphophallus konjac*; Aza.ind=*Azadirachta indica*; Bir.=*Birch*; Ble.ori=*Blechnum orientate*; Bos.ser=*Boswellia serrata*; Bow.vir=*Bowdichia virgilioides Kunth*; Cal.off=*Calendula officinalis*; Car.att=*Caralluma attenuata*; Cin.cas=*Cinnamomum cassia*; Cit.aur=*Citrus aurantium*; Coc.nuc=*Cocos nucifera*; Cop.pau=*Copaifera paupera*; Cor.phe and Ang.dah=*Cortex phellodendri and Angelica dahurica*; Cur.lon=*Curcuma longa*; Cur.lon and Lit.ery=*Curcuma longa and Lithospermum erythrorhizon*; Cur.zed=*Curcuma zedoaria*; Cym.nar=*Cymbopogon nardus*; Dip.asp=*Dipsacus asper*; Que.arv=*Equisetum arvense*; Gly.glab, Mus.par, Cur.lon, Pan.oda and Alo.ver *Glycyrrhiza glabra, Musa paradisiaca, Curcuma longa, Pandanus odaratissimus and Aloe vera*; Hev.bra=*Hevea brasiliensis*; Hip.rha, Alo.ver and Cur.lon=*Hippophae rhamnoides, Aloe vera, Curcuma longa*; Hyd.sem=*Hydnocarpi Semen*; Hyp.per=*Hypericum perforatum*; Hyp.per and Aza.ind=*Hypericum perforatum and Azadirachta indica*; Lit.ery=*Lithospermum erythrorhizon*; Luf.acu=*Luffa acutangula*; Lyc.dep=*Lycium depressum*; Mac.rec=*Matricaria recutita*; Mor.ole=*Moringa oleífera*; Mus.sap=*Musa sapientum Linn. var. paradisíaca*; Pan.gin=*Panax ginseng*; Pel.gra and Oli.dec=*Pelargonium graveolens and Oliveria decombens*; Pin.pin=*Pinus pinaster*; Pip.bet=*Piper betel*; Pla.sp=*Plantago sp*; Ple.amb and Cen.asi=*Plectranthus amboinicus and Centella asiática*; Pun.gra= *Punica granatum*; Que.inf=*Quercus infectoria*; Rad.ast and Rad.reh=*Radix astragali and Radix rehmanniae*; Rad.ast, Rad.reh, Rhi.smi, Rhi.atr, Rad.pol and Rad.ste=*Radix astragali, Radix rehmanniae, Rhizoma smilacis chinensis, Rhizoma atractylodis macrocephalae, Radix polygoni multiflori and Radix stephania tetrandrae*; Rad.reh=*Radix rehmanniae*; Ros.dam=*Rosa damascena*; Spi.ole=*Spinacia oleracea*; Str.pse=*Strychnos pseudoquina*;Tab.sp.=*Tabebuia sp.*; Teu.pol=*Teucrium polium*; Tri.wil=*Tripterygium wilfordii*; Vas.cun=Vasconcellea *cundinamarcensis*; Zin.off=*Zingiber officinale*

De fato, a utilização de plantas para tratamento das feridas de pessoas diabéticas é considerada um tratamento tradicional e tem sido objeto de pesquisas nas últimas décadas (LAITIFF et al., 2010; OGUNTIBEJU, 2019). Muitos tratamentos sintéticos utilizados

atualmente são baseados nos efeitos naturais das plantas, porém, podem apresentar resultados colaterais mais severos (*e.g*. resistência a bactérias) e, por isso, medicamentos que possuem matéria-prima obtida nas plantas medicinais, são comercializados e altamente recomendados no combate desse tipo de feridas (CHAH et al., 2006).

Os tratamentos que se baseiam em plantas, assim como os outros que são utilizados em feridas de pessoas diabéticas, buscam o máximo de efetividade no processo de cicatrização e tentam auxiliar nas diferentes fases da cura (hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação) (DIEGELMANN; EVANS, 2004; OGUNTIBEJU, 2019). Durante a hemostasia ocorre uma agregação plaquetária promovendo a coagulação e a vasoconstrição, porém, algumas substâncias como óxido nítrico e a baixa produção de plaquetas, podem retardar essa fase (PASTAR et al., 2014). Dessa forma, a utilização de plantas antioxidantes e que estimulam proliferação celular, como observado, por exemplo, no uso de *Aloe Vera* e *Curcuma longa*, são indicadas para auxiliar na hemostasia. Além disso, tanto essas plantas, quanto as do grupo B, podem também reduzir a inflamação e atuar como agentes antibacterianos, dessa forma, se demonstram muito importantes durante a fase inflamatória do processo de cicatrização (PASTAR et al., 2014; OGUNTIBEJU, 2019).

A fase proliferativa é caracterizada por apresentar, dentre outras, a etapas de granulação, epitelização e vascularização (PASTAR et al., 2014; OGUNTIBEJU, 2019), logo, sugere-se o tratamento baseado em plantas como as exemplificadas no grupo A, B e C, por atuarem na proliferação celular e angiogênese. Após essa fase, são indicadas as plantas do grupo B e C, pois essas atuam como estimulantes para a produção de colágeno, o qual é essencial para a remodelação do tecido, que pode durar de três semanas até dois anos (DIEGELMANN; EVANS, 2004; OGUNTIBEJU, 2019). Diante ao exposto, verifica-se que as plantas possuem propriedades com potenciais efeitos terapêuticos que aceleram a cicatrização de feridas. Os compostos extraídos das plantas se demonstraram importantes em cada uma das fases de cicatrização, algumas delas, das quais se extraem o látex que é rico em proteases, são capazes de atuar em todas as fases do fechamento da lesão e por isso têm sido indicadas na produção de medicamentos destinados à aceleração da cura de feridas em pessoas diabéticas (TONACO et al., 2018; URS et. al., 2017; 2019).

4. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de terapias alternativas e complementares para o tratamento de feridas de pessoas diabéticas está em ascensão nos últimos 30 anos. O número de trabalhos publicados nesta área tem aumentado consideravelmente com o passar dos anos, os quais tem alcançados revistas científicas de relevante impacto sobre a comunidade científica. Além disso, observou-se que nas últimas décadas houve um grande interesse da área de dermatologia em desenvolver dispositivos capazes de promover a cicatrização de feridas difíceis de curar, nas quais as terapias mais convencionais estão falhando. A maioria das terapias avaliadas neste trabalho foram realizadas em estudos em humanos, e o maior número de eventos estava relacionado com os pés diabéticos, uma enfermidade que geralmente ocasiona amputação do membro e possui alta taxa de morbidade e mortalidade. Em menor frequência, também foram realizados ensaios com animais, com destaque para os roedores e com baixa representatividade, encontrou-se estudos com diferentes tipos celulares.

Uma ampla variedade de tecnologias para o manejo e tratamento de feridas foi observada nesse estudo, destacando-se a técnica que utiliza a NPWT, a qual demonstrou potenciais efeitos como redução da umidade e modulação da resposta inflamatória, além de estimular a proliferação de granulócitos na lesão, contribuindo assim para um tratamento bem-sucedido e de cicatrização mais rápida das feridas de pessoas diabéticas. Também foram amplamente empregadas as terapias com células e com tecidos da bioengenharia, as quais apresentaram efeitos de redução da inflamação, proliferação celular, estímulo da produção de colágeno e desenvolvimento do tecido de granulação. Desta forma, as terapias avançadas com células e tecidos se demonstraram capazes de atuar sobre todas as fases da cicatrização de feridas, acelerando esse processo ou reduzindo consideravelmente a área da ferida.

As terapias mencionadas são, em geral, mais caras do que os tratamentos padrões disponíveis no mercado para o tratamento de feridas de pessoas diabéticas. Além disso, possuem disponibilidade limitada e acabam sendo utilizados somente quando os tratamentos tradicionais mais baratos foram testados e falharam. Frente a isso, esse trabalho destaca a utilização de terapias à base de plantas como um recurso promissor para o tratamento de feridas difíceis de curar, visto que, representa um recurso acessível e de baixo custo. Dentre os trabalhos analisados, foram encontradas espécies de plantas que apresentaram efeito antioxidante, anti-inflamatório, angiogênico e hipoglicêmico, além de estimularem a produção de colágeno, a proliferação de diferentes células e a regulação da expressão de genes, favorecendo assim uma cicatrização mais rápida dessas feridas.

Diante disso, sugere-se que as lacunas demonstradas neste trabalho, representadas pelas terapias que possuem menos estudos, possam ser mais exploradas pela comunidade científica,

primeiro por apresentarem efeitos terapêuticos cruciais para o processo de cicatrização e segundo, pelo fato de as modalidades de tratamento padrão às vezes não serem suficientes para a cura de algumas úlceras e necessitarem de terapias alternativas ou complementares.

REFERÊNCIAS

ADA (American Diabetes Association). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v.37, Suppl 1, p.81-90. 2014. doi: 10.2337/dc14-S081.

APELQVIST, J.et al. EWMA document: negative pressure wound therapy. Overview, challenges and perspectives. *J Wound Care*, v.26, n.3, Suppl S1–S113. 2017.

AHANGAR, P.; WOODWARD, M.; COWIN, A. Advanced wound therapies. *Wound Practice and Research*, v.26, p.58-68. 2018.

ARMSTRONG, D.G. et al. Mind the gap: the disparity between research funding and costs of care for diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*, v.36, jul. 2013.

BAYNEST, H. W. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolism*, v.6, n.5, p.1-9. 2015. doi:10.4172/2155-6156.1000541

BEST, D. J.; ROBERTS, D. E. Algorithm AS 89: The Upper Tail Probabilities of Spearman's rho. Applied Statistics, n.24, p.377–379. 1975. doi: 10.2307/2347111.

BI, H.et al. Stromal vascular fraction promotes migration of fibroblasts and angiogenesis through regulation of extracellular matrix in the skin wound healing process. *Stem Cell Res Ther*, v.10, n.1, p.302. 2019.

BISHOP, A. Role of oxygen in wound healing. *J Wound Care*,v.17, n.9, p.399–402. 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Departamento de Atenção Básica. Diabetes Mellitus / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 64 p. il. – (Cadernos de Atenção Básica, n. 16) (Série A. Normas e Manuais Técnicos) ISBN 85-334-1183-9.

BRODSKY, J.W. The diabetic foot. In: MANN, R.A.; COUGHLIN, M.J. (Ed.) **Surgery of the Foot and Ankle.** 6th ed. St Louis, MO: Mosby,1993, p.278–283.

BROUSSARD, K. C.; POWERS, J. G. Wound Dressings: Selecting the Most Appropriate Type. *American Journal of Clinical Dermatology*, v.14, n.6), p.449–459. 2013.

CAMPBELL, P. Escape from the impact factor. *Ethics in science and environmental politics*, v.8, n.1, p.5-7. 2008.

CHAH, K.F. et al. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, v.104, n.1-2, p.164-167. 2006.

CHAUDHARY, N; TYAGI, N. Diabetes mellitus: An Overview. *Int. J. Res. Dev. Pharm. L. Sci*., v.7, n.4, p.3030-3033. 2018.

CHEN, J.S.; WONGAND, V.W.; GURTNER, G.C. Therapeuticpotential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cutaneous wound healing. *Front Immunol*., v.3, n.192., p.1-9. 2012

COBOS, R. et al. Effectiveness and efficiency of platelet rich plasma in the treatment of diabetic ulcers. *Curr Pharm Biotechnol*., v.16, n.7, p.630-4. 2015.

DA SILVA, P.N. et al. Terapia tópica no tratamento de feridas crônicas. *Enferméria Global*, n.33, p.46-58, 2014.

DE ALMEIDA, S. A. et al. Feelings of powerlessness in individuals with either venous or diabetic foot ulcers. *Journal of Tissue Viability*, v.23, n.3, p.109 114. 2014.

DEHKORDI, A.N. et al. Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Research & Therapy*, v.10, n.1. 2019.

DEL CORE, M.A.et al. The evaluation and treatment of diabetic foot ulcers and diabetic foot infections. *Foot Ankle Int*., v.3, n.1S, p.13S–23S. 2018.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front biosci*, v.9, n.1, p.283-289. 2004.

DINH, T.; ELDER, S.; VEVES, A. Delayed wound healing in diabetes: Considering future treatments. *Diabetes Manag.*, v.1, p.509–519. 2011.

DISSEMOND, J. et al. Topical oxygen wound therapies for chronic wounds: a review. *J Wound Care*, v.24, n.2, p.53–63. 2015.

EISINGER, F.; PATZELT, J.; LANGER, H. F. The Platelet Response to Tissue Injury. *Frontiers in Medicine*, v.5, n.317. 2018. doi:10.3389/fmed.2018.00317

FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological effects of low level laser therapy. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, v.5, p.58–62. 2014.

FERREIRA, R.C. Diabetic Foot. Part 1: Ulcers and Infections. *Rev. bras. ortop*., São Paulo, v.55, n.4, p.389-396, Aug. 2020.

FRYKBERG, R.G.; WILLIAMS, D.V. Negative-Pressure Wound Therapy and Diabetic Foot Amputations. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, v.97, n5, p.351–359. 2007.

FRYKBERG, R.G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, v.4, n.9, p.560–582. 2015.

GASPARYAN, A.Y. Choosing the target journal: do authors need a comprehensive approach? *Journal of Korean medical science*, v.28, n.8, p.1117. 2013.

GENTILE, P. et al. Concise Review: Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma: Basic and Clinical Implications for Tissue Engineering Therapies in Regenerative Surgery. *Stem cells Translational Medicine*, v.1, n.3, p.230–236. (2012).

GERAGHTY, T.; LAPORTA, G. Current health and economic burden of chronic diabetic osteomyelitis. *Expert Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res*., v.19, p.279–286. 2019.

GILLETTE, B. et al. Regenerative Wound Surgery: Practical Application of Regenerative Medicine in the OR. *AORN Journal*, v.109, n.3, p.298–317. 2019.

GOSAIN, A.; DIPIETRO, L.A. Aging and wound healing. *World J Surg*, n.28, p.321-326. 2004.

GOWER, J. C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, v.53, n.3-4, p;325-338. 1966.

GREENHALGH, D.G. Wound healing and diabetes mellitus. *Clin. Plast. Surg*., v.30, p.37–45. 2003.

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

HINGORANI, A. et al. The management of diabetic foot: A clinical practice guideline by the Society for Vascular Surgery in collaboration with the American Podiatric Medical Association and the Society for Vascular Medicine. *J Vasc Surg.*, v. 63, Suppl 2:3S-21S. Feb. 2016.

IDF (International Diabetes Federation). **IDF Diabetes Atlas**, 9th edn. Brussels, Belgium: 2019. Available at: https://www.diabetesatlas.org

JAFFE, L.; WU, S. C. Dressings, Topical Therapy, and Negative Pressure Wound Therapy. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, v.36, n.3, p.397-411. 2019.

LABAND, D. N.; PIETTE, M. J. Favoritism versus Search for Good Papers. *Journal of Political Economy*, v.102, n.11, p.194–203. 1994.

LANGFELDER, P.; HORVATH, S. Fast R functions for robust correlations and hierarchical clustering. *Journal of statistical software*, v.46, n.11. 2012.

LAITIFF, A.A.; TEOH, S.L.; DAS, S. Wound healing in diabetes mellitus: traditional treatment modalities. *La Clinica Terapeutica*, v.161, n.4, p.359-364. 2010.

LAVERY, L.A. et al. A comparison of diabetic foot ulcer outcomes using negative pressure wound therapy versus historical standard of care. *Int Wound J*, v.4, p.103-13. 2007.

LEWALLEN, L.P.; CRANE, P.B. Choosing a publication venue. Journal of Professional *Nursing*, v.26, n.4, p.250-254. 2010.

LI, K., ROLLINS, J.; YAN, E. Web of Science use in published research and review papers 1997–2017: a selective, dynamic, cross-domain, content-based analysis. *Scientometrics*, v.115, p1–20. 2018.

LI, M. et al. Macrophage-derived exosomes accelerate wound healing through their anti-inflammation effects in a diabetic rat model. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v.47, n.1, p.3793–3803. 2019.

LIU, Z.J.; ZHUGE, Y.; VELAZQUEZ, O.C. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*., v.106, n.6, p.984-91. 2009.

LÖNDAHL, M. Hyperbaric Oxygen Therapy as Adjunctive Treatment for Diabetic Foot Ulcers. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, v.12, n.2, p.152–157. 2013.

MANDELBAUM, S.H. et al. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte II. *An Bras Dermatol*, v.78, n.5, p.525-542, 2003.

MALONE-POVOLNY, M. J.; MALONEY, S. E.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric Oxide Therapy for Diabetic Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*, v.8, n.12. 2019. doi:10.1002/adhm.201801210.

MARTINENGO, L. et al. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Ann. Epidemiol.* v.29, p.8–15. 2019.

MINELLI, L.et al. "Diabetes mellitus and cutaneous affections." *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v,78, n.6, p. 735-747. 2003.

MONAMI, M. et al. Arandomized, open-label, controlled trial to evaluate the antimicrobial and surgical effect of CO2 laser treatment in diabetic infected foot ulcers: DULCIS (diabetic ulcer, CO2 laser, and infections) study. *J. Endocrinol. Invest*., v.40, p.985–989. 2017.

MORYKWAS, M.J. et al. Effects of varying levels of subatmospheric pressure on the rate of granulation tissue formation in experimental wounds in swine. *Ann Plast Surgery*, v.47, n.5, p.547–51. 2001.

MOUËS, C.M. et al. Bacterial load in relation to vacuum-assisted closure wound therapy: a prospective randomized trial. *Wound Repair Regen*., v.12, n.1, p.11-7. 2004.

MUSTOE, T.A.; O'SHAUGHNESSY, K.; KLOETERS, O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast Reconstr Surg*, v.117, p.35S–41S. 2006.

NYAME, T.T.; CHIANG, H.A.; ORGILL, D.P. Clinical Applications of Skin Substitutes. *Surgical Clinics of North America*, v.94, n.4, p.839–850. 2014.

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

OKSANEN, J. et al. Community ecology package. R package version, 2(0). 2013.

OLSSON, M. et al. The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review. *Wound Repair and Regeneration.*, v.27. n.1, p.114-125. 2018.

PARK, N.J.; ALLEN, L.; DRIVER, V.R. Updating on understanding and managing chronic wound. *Dermatologic Therapy*, v.26, n.3, p.236–256. (2013).

PASTAR, I. et al. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. *Advances in wound care*, v.3, n.7, p.445-464. 2014.

PATZELT, J.F.; LANGER, H. Platelets in angiogenesis. *Curr Vasc Pharmacol*., v.10, p.570–7. 2012. doi: 10.2174/157016112801784648

R development core team, 2020. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. [available on internet\http://www.Rproject.org].

SALOMÉ, G. M. et al. Self-esteem in patients with diabetes mellitus and foot ulcers. *Journal of Tissue Viability*, v.20, n.3, p.100–106. 2011.

SAMANEH, R. et al. Laser therapy for wound healing: a review of currrent techniques and mechanisms of action. *Biosci Biotechnol Res Asia*, v.12, p.217–223. 2015.

SANTOS, A.A.R. et al. Nursing students' knowledge of wound evaluation and treatment. *Rev. enferm. UERJ*, Rio de Janeiro, v.18, n.4, p.547-52, out/dez. 2010.

SANTOS, C.M.D. et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effects of Low-Level Laser Therapy in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Int J Low Extrem Wounds*. May. 2020. doi: 10.1177/1534734620914439.

SAVOJI, H. et al. Skin tissue substitutes and biomaterial risk assessment and testing. *Front Bioeng Biotechnol*., v. 26, n.6, p.86. 2018.

SAXENA, V. et al. Vacuum-assisted closure: microdeformations of wounds and cell proliferation. *Plast Reconstr Surg*, v.114, n.5, p.1086–96. 2004.

SBD - **Sociedade Brasileira de Diabetes**. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**: 2019-2020. São Paulo: Clannad; 2019

SEN, C.K. et al. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*, v.17, n.6, p.763–771. 2009.

SEPÚLVEDA, G. et al. Negative-pressure wound therapy versus standard wound dressing in the treatment of diabetic foot amputation. A randomised controlled trial. *Cir Esp.*, v.86, n.3, p.171-7. 2009

SHARMA, R. et al. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy for diabetic foot ulcer, a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Sci Rep*, v.11, n.2189. 2021.

SIBBALD, R.G.; WOO, K.Y.; QUEEN, D. Wound bed preparation and oxygen balance – a new component? *Int Wound J*, v.4, Suppl. 3, p.9–17. 2007.

SIEHER, F.E.; TRAYSTMAN, R.J. Ethical Issues Involved in the Development of Animal Models for Type I Diabetes: Models of Type I Diabetes - Part One. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, v.35, n.1, p.1-6. 1993.

SNYDER, D. et al. Skin Substitutes for Treating Chronic Wounds [Internet]. Rockville (MD): *Agency for Healthcare Research and Quality* (US); Feb. 2020. PMID: 32101391.

RADENKOVI"C, M.; STOJANOVI"C, M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological*
Methods. Belgrado, p. 1-59. 15 Nov. 2015.

ROCKVILLE (MD): *Agency for Healthcare Research and Quality* (AHRQ). Dec 18. 2012. 203 p.

SOUSA, R.G.; BATISTA, K.N.M. Laser therapy in wound healing associated with diabetes mellitus - Review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.91, n.4, p.489–493. 2016.

SPAMPINATO, S.F. et al. The Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes: Looking among Old Drugs. *Pharmaceuticals (Basel).*, v.13, n.4, p.60. Apr. 2020.

TIBBLES, P.M.; EDELSBERG, J.S. Hyperbaric-Oxygen Therapy. *New Engl J Med*, v.334, n.25, p.1642–1648. 1996.

TONACO, L. A. et al. The Proteolytic fraction from latex of Vasconcellea cundinamarcensis (P1G10) enhances wound healing of diabetic foot ulcers: a double-blind randomized pilot study. *Advances in therapy*, v.35, n.4, p.494-502. 2018.

URS, A.P. et al. Plant Latex Proteases: Natural Wound Healers. In: CHAKRABORTI, S.; DHALLA, N. (Ed.) **Proteases in Physiology and Pathology**. Springer, Singapore. 2017. p. 297-323.

URS, A. P., et al. Plant latex thrombin-like cysteine proteases alleviates bleeding by bypassing factor VIII in murine model. *Journal of cellular biochemistry*, v.120, n.8, p.12843-12858. 2019.

WARLICK, S. E.; VAUGHAN, K. T. L. Factors influencing publication choice: why faculty choose open access. *Biomedical digital libraries*, v.4, n.1, p.1-12. 2007.

WHELEN, H.T. et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg*, v.19, n.6, p.309–314. 2001.

WICKHAM, H. GGPLOT2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. 2016.

WILLIAMS, R. et al. Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v.162, n.108072. 2020. doi:10.1016/j.diabres.2020.108072

WUKICH, D.K.; HOBIZAL, K.B.; BROOKS, M.M. Severity of diabetic foot infection and rate of limb salvage. *Foot Ankle Int*, v.34, n.3, p.351–358. 2013.

WU, S.C.; MARSTON, W.; ARMSTRONG, D.G. Wound care: the role of advanced wound-healing technologies. *J Am Podiatr Med Assoc*, v.100, p.385–94. 2010.

WU, Y. et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem cells*, v.25, n.10, p.2648-2659. 2007.

YANG, Z.G.; ZHANG, C.T. A proposal for a novel impact factor as an alternative to the JCR impact factor. *Scientific reports*, v.3, n.1, p.1-5. 2013.

YOU, H.J.; HAN, S.K. Cell therapy for wound healing. Journal of Korean medical science, v.29, n.3, p.311–319. 2014.

ZIMMET, P. et al. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. *Nature Reviews Endocrinology*, v.12, n.10, p.616–622. (2016).

ZIOBROWSKI, A.; GIBLER, K. Factors academic real estate authors consider when choosing where to submit a manuscript for publication. *Journal of Real Estate Practice and Education*, v.3, n.1, p.43-54. 2000.

CAPÍTULO II

REGENERAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS TRATADOS COM A FRAÇÃO SORO DO LÁTEX DE *HANCORNIA SPECIOSA*

RESUMO

Produtos naturais extraídos das plantas podem ajudar na cicatrização de feridas crônicas, um problema que atinge 1 a 2 % da população mundial e que ainda não possui tratamento eficaz. Estudos recentes têm mostrado que o látex de *Hancornia speciosa* (mangabeira) pode apresentar atividades biológicas que auxiliem no processo de cicatrização de feridas, tais como atividade angiogênica, anti-infamatória, antioxidante e antifúngica. Na tentativa de gerar tratamento alternativo e barato para o cuidado de feridas, esse estudo desenvolveu um gel creme à base de látex de *H. speciosa* e avaliou seu potencial em estimular o processo de cicatrização de feridas cutâneas em feridas de espessura total em dorso de ratos. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento terapêutico com o gel-creme 15% e 25% é benéfico na fase inflamatória (3º DAI) do processo de cicatrização, uma vez que aumenta a angiogênese e a proliferação de infiltrados mononucleares nas feridas. No que diz respeito a contração da ferida, o tratamento com o gel creme (5% e 15%) induziu uma maior taxa de contração na fase proliferativa (7º DAI). Também foi observado que nessa fase, o gel-creme 15% foi capaz de estimular uma maior produção de colágeno nos tecidos feridos. De forma geral, a combinação dessas propriedades faz com que o látex de *H. speciosa* seja um alvo de estudo para potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos de baixo custo que auxiliem no reparo tecidual.

Palavras-chave: angiogênese, colágeno, cicatrização de feridas, mangabeira.

1. INTRODUÇÃO

A pele representa um órgão multifuncional que tem sido selecionada pela evolução a milhares de anos. Além de ser extremamente adaptável, possui função termorreguladora, imunológica, neurossensorial, metabólica (como a síntese de vitamina D), e atua na preservação da homeostase dos fluidos corporais (CHURCH et al., 2006). Este órgão está diariamente protegendo o corpo contra ameaças químicas, físicas, patológicas, dentre outras, as quais podem gerar lesões agudas em sua extensão, demandando respostas como uma cura rápida e eficiente (WILKINSON; HARDMAN, 2020).

O reparo de feridas agudas é um evento em cascata extremamente dinâmico de sinalização celular e eventos comportamentais que culminam no fechamento da lesão e recuperação da integridade estrutural da barreira cutânea (WERNER; GROSE, 2003). Entretanto, o processo de cicatrização normal dessas feridas na pele pode ser alterado por dois fatores complicadores principais: a ocorrência de fibrose e o desenvolvimento de feridas crônicas. Essas alterações afetam milhões de pessoas no mundo e geram altos gastos para o sistema de saúde e para os pacientes, representando assim um problema desafiador para a área médica (CAÑEDO-DORANTES; CAÑEDO-AYALA, 2019).

A alta incidência mundial de feridas crônicas tem impulsionado o desenvolvimento de produtos e tecnologias que visam acelerar o processo de cicatrização (GWAK; SOHN, 2017). Dentre os produtos, drogas sintéticas e substâncias químicas são comumente utilizadas para o tratamento e cicatrização de feridas cutâneas, porém estas apresentam geralmente limitações funcionais e efeitos colaterais (CORREA et al., 2017). Recentemente o uso de tecnologias mais sofisticadas tem sido empregado com maior frequência, tais como o uso de nanopartículas, fatores de crescimento, proteínas da matriz extracelular, enxertos de pele, células-tronco, oxigenoterapia e terapia com pressão negativa. Esses produtos e tecnologias possuem diversas indicações e mecanismos de ação em diferentes fases do processo cicatricial. Apesar dos benefícios, todos os métodos citados apresentam custo elevado e ainda a eficácia do tratamento é discutida no meio científico (GILLETTE et al., 2019; JAFFE; WU, 2019). Dessa forma, ainda é necessário o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para cicatrização de feridas crônicas e mais acessíveis economicamente para a população.

Recentemente muito tem sido investigado a cerca do uso de produtos naturais e de seus componentes bioativos, como fonte alternativa de medicamentos para a regeneração tecidual (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; BAHRAMSOLTANI et al., 2014; JACOB et al., 2015; CORREA et al., 2017; SHEDOEVA et al., 2019). A principal vantagem do uso dos

produtos naturais é o baixo custo quando comparados aos produtos convencionais para o tratamento de feridas. Baseados no conhecimento etnobotânico prévio, nosso grupo de pesquisa tem investigado o potencial cicatrizante do látex de *Hancornia speciosa.*

Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae) é uma planta nativa do Brasil, encontrada em paisagens variadas como os tabuleiros litorâneos, planícies do Nordeste, Cerrado do Centro-Oeste e em áreas do Norte e Sudeste (VIEIRA-NETO et al., 2002). O látex dessa planta, popularmente conhecida como mangabeira, é utilizado como fitoterápico para tratamento de dermatoses, tuberculose, úlceras gástricas, fraturas e doenças fúngicas (POTT; POTT, 1994; Neto; GUARIM-MORAIS, 2003; MACEDO; FERREIRA 2004, SAMPAIO; NOGUEIRA; 2006, SANTOS et al., 2007). Dados da literatura relatam que esse composto natural é biocompatível, não tóxico (RIBEIRO et al. 2016, COSTA, 2019) e possui marcantes propriedades angiogênicas (ALMEIDA et al. 2014; D'ABADIA et al., 2020), osteogênicas (DOS SANTOS NEVES et al., 2016), anti-inflamatórias (MARINHO et al., 2011), antioxidantes (D'ABADIA ET AL., 2020) e antifúngicas (Silva et al., 2011). Essas propriedades sugerem que o látex de *H. speciosa* possa ser explorado como fonte de novos fitomedicamentos para o tratamento de feridas.

Na tentativa de gerar tratamentos alternativos para o cuidado de feridas, esse estudo desenvolveu um gel-creme à base de látex de *H. speciosa* e avaliou seu potencial em estimular o processo de regeneração cutânea em feridas de espessura total em dorso de ratos. O gel-creme foi formulado com a fração soro do látex de *H. speciosa*, uma vez que essa fração, foi identificada previamente como a responsável pela atividade angiogênica desse látex. Além disso, a fração soro possui substâncias, tais como o ácido clorogênico, que auxiliam no processo de remodelamento da matriz extracelular (D'Abadia et al., 2020).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Extração do látex

O látex de *H. speciosa* foi coletado no período da manhã na coleção de árvores da Estação experimental da Universidade Estadual de Goiás, no município de Ipameri, Goiás, Brasil. Uma amostra da exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, Brasil, sob o número 4875. O látex foi coletado em um recipiente estéril de

acordo com a metodologia de perfuração do tronco da árvore descrita por Arruda e colaboradores (2016).

2.2 Fracionamento de látex

O látex de *H. speciosa* foi centrifugado duas vezes a -4 °C por 1 h cada a 22.000 g (centrífuga Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific). Após a primeira centrifugação, a borracha foi cuidadosamente separada e uma nova centrifugação foi realizada para remover quaisquer contaminantes da fase. Após a centrifugação do látex é possível obter duas frações distintas: 1) a zona branca do topo com as partículas de borracha; e 2) a camada de soro contendo grande variedade de proteínas e compostos luteoides.

2.3 Formulação do gel creme a base do látex de H. speciosa

O soro do látex da mangabeira foi utilizado na forma de gel-creme para realização do experimento de feridas espessura total em dorso de ratos. A base farmacêutica para incorporação do látex foi obtida na farmácia universitária da UFG (Goiânia-Goiás), a qual é descrita como um gel-creme toque seco composto por: base auto-emulsionante Focus gel 305 (Infinity Pharma®) 5%, EDTA 0,2%, Nipagim 0,2% e água destilada. O gel-creme formulado foi armazenado em geladeira entre 2 - 8 °C antes da aplicação na ferida.

O gel-creme foi preparado por adição da fase aquosa (soro de látex de *H. speciosa*) à base adquirida, mediante agitação manual até homogeneização completa. Desta forma, partindo-se da formulação-base, foram preparados os géis-cremes contendo o látex na concentração de 5, 15 e 25%.

2.4 Modelo de feridas cutâneas em ratos

O protocolo de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás – CEUA/PUC e aprovado sob o nº 1630230718. Foram utilizados 96 ratos Wistar machos, com peso corporal entre 200 e 300 gramas. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: G1, animais tratados com soro fisiológico (solução salina 0,9%); G2, gel-creme à base de soro de látex da *H. speciosa* na concentração de 5%; G3, gel-

creme à base de soro de látex da *H. speciosa* na concentração de 15% e G4, gel-creme à base de soro de látex da *H. speciosa* na concentração de 25%. Cada grupo consistiu inicialmente de 6 animais, os quais foram avaliados aos 0, 3, 7, 14 e 21 dias após a indução da lesão.

2.5 Etapa experimental

A ação cicatrizante do gel-creme foi avaliada no modelo de cicatrização de feridas de espessura total em ratos, de acordo com a metodologia descrita no trabalho de Melo-Reis e colaboradores (2015) e Garros e colaboradores (2006), com algumas adaptações. Sendo assim, inicialmente, os ratos foram anestesiados por via intramuscular com ketamina (70mg/kg) e xilazina (10mg/kg) antes das incisões cirúrgicas. Após a injeção dos anestésicos, os animais foram posicionados em decúbito ventral, imobilizados em uma prancha e submetidos à tricotomia da região dorsal com lâmina específica. Foi utilizado um molde para demarcar as feridas com área equivalente a 4 cm^2 (2cm x 2cm). Em seguida, realizou-se a excisão do fragmento de pele e tecido subcutâneo da área demarcada com o auxílio de bisturi e tesoura cirúrgica. Após o procedimento, os animais ficaram em observação por 1 hora e foi iniciada a analgesia com dipirona 500 mg (30 mL/kg) administrada na água fornecida *ad libitum* por 7 dias.

Os tratamentos tópicos de cada grupo foram aplicados imediatamente após a realização das feridas excisionais, em quantidade igual e suficiente para cobrir todas as lesões uma vez ao dia, durante os 21 dias do experimento. Além disso, foram utilizados curativos oclusivos esterilizados durante no período em questão (gaze e roupa adaptada confeccionada com tecido morim), a fim de manter a ferida fechada, com umidade ideal e dificultar que os outros animais da mesma gaiola lesionassem ainda mais a ferida. Os curativos foram feitos diariamente e no mesmo horário.

2.6 Avaliação morfométrica e histopatológica

O processo de cicatrização foi avaliado através da observação macro e microscópica das lesões. Desta forma, ao final de cada período de observação, os animais de cada grupo foram anestesiados com ketamina (70mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e as lesões foram fotografadas nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 após a indução da lesão (DAI) para avaliação macroscópica. Todas as fotografias foram retiradas em mesma altura e zoom da câmera. Posteriormente, para cada DAI

(3, 7, 15, 21), 6 animais de cada grupo experimental foram eutanasiados com tiopental via intraperitoneal (90 mg/kg), para realização da biópsia do tecido que sofreu a injúria e análise dos parâmetros histopatológicos. Neste procedimento, foi retirada uma amostra que continha em torno de 50% do tecido lesionado e 50% de pele íntegra, com margem de segurança de 1 cm ao redor do centro da ferida. As amostras colhidas foram fixadas em formaldeído 10 %.

O grau de contração da ferida foi avaliado através da medida da área das feridas fotografadas em cada DAI. Essas medidas foram realizadas no software Image J 1.3.1 (NIH, EUA), sendo a taxa de contração calculada de acordo com a seguinte fórmula (AL-WATBAN; ANDRES, 2000; OLIVEIRA et al., 2000):

$$\text{Taxa de contração (\%)} = \frac{\text{Área inicial da ferida (Ao)} - \text{Área da ferida no dia da biópsia}}{\text{Área inicial da ferida (Ao)} \times 100}$$

Os fragmentos das feridas cutâneas fixadas em formaldeído 10% foram processados conforme técnica histológica de rotina, incluídas em parafina, a partir das quais, foram confeccionadas lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). A análise histopatológica foi realizada às cegas por um único observador sob um microscópio (Zeiss) de campo claro no aumento de 40x. Os seguintes parâmetros foram observados: necrose, fibrina, infiltrados polimorfonucleares (PMN), infiltrados mononucleares (MN), fibroblastos, angiogênese e hemorragia. Os escores foram determinados de acordo com a intensidade, sendo: 0 (ausente), 1 (discreto: 1-25% da área total), 2 (moderado: 26-50% da área) e 3 (acentuado: 51-100% da área). Também foram produzidas lâminas coradas com Picrossirius para a quantificação das fibras de colágeno presentes nas amostras (LÓPEZ-DE LEÓN; ROJKIND, 1985). Para isso, foram capturadas imagens das lâminas utilizando microscópio com luz polarizada (Zeiss) acoplado a uma câmera digital (SONY NEX-3). As imagens foram registradas no aumento de 40X a partir do início da borda da ferida até o final da outra borda, sendo considerados como campos válidos aqueles que abrangiam a área da epiderme, derme superficial e derme profunda. A análise das fotografias foi realizada no software IMAGE J 1.3.1 (NIH, EUA), o qual identificou as fibras de colágeno em cada campo, mediante binarização da imagem (função Threshold/Cie-Lab) e determinou a porcentagem da área ocupada por elas. A porcentagem de colágeno total de cada amostra (indivíduo) foi determinada pela média de colágeno dos campos obtidos.

2.7 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados macroscópicos foi realizada por meio do teste ANOVA one way e pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p<0,05$. Já os dados microscópicos, os quais não seguem distribuição normal, foram avaliados por meio de teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido por comparações múltiplas pelo método de Dunn's, com nível de significância de $p<0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

3. RESULTADOS

A análise morfométrica das imagens obtidas das feridas dos ratos nos dias 3, 7, 14 e 21 após indução da lesão, foi realizada com o intuito de avaliar as taxas de contração das feridas, formação de necrose e reepitelização, ao longo dos dias mencionados. Em relação à presença de necrose e taxa de reepitelização das feridas dos animais avaliados, não houve diferença estatística entre os 4 grupos de tratamento ($p>0,05$). A análise das taxas de contração das feridas estudadas, estão representadas na Tabela 1. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre as taxas de contração das feridas dos grupos 1, 2, 3 e 4 nos dias 3, 14 e 21 pós-lesão. Já no 7º DAI observou-se que houve diferença significativa entre os grupos G1 e G3, G1 e G2 e G2 e G4. Assim, no 7º DAI, os tratamentos com gel-creme à base do soro do látex de *H. speciosa* 5% e 15% geraram uma maior taxa de contração da ferida do que o grupo tratado com soro fisiológico. A Figura 1 apresenta imagens representativas da evolução das feridas de espessura total em ratos, nos grupos tratados com soro fisiológico e com os géis-creme nas concentrações de 5%, 15% e 25%.

Tabela 1: Porcentagem de contração da ferida excisional em ratos Wistar tratados com soro fisiológico e gel creme à base de látex de *H. speciosa*. Os grupos tratados estão representados por: G1= controle neutro (soro fisiológico), G2= gel creme 5%, G3= gel creme 15% e G4= gel creme 25%.

Morfometria	DAI	G1 (Média)	G2 (Média)	G3 (Média)	G4 (Média)	p	Tukey
Contração da ferida (%)	3	42,41 ± 4,2	53,07 ± 11,3	47,15 ± 7,5	44,70 ± 6,1	0,08	G3 > G1, G2 > G1, G2 > G4
	7	70,20 ± 5,5	79,60 ± 2,3	76,43 ± 5,3	70,66 ± 4,3	0,00	
	14	97,88 ± 3,0	97,31 ± 2,2	98,18 ± 2,2	99,31 ± 1,1	0,41	
	21	99,70 ± 0,5	99,43 ± 1,1	100	100	0,23	

Legenda: DAI - dias após indução da lesão. Os resultados foram submetidos ao teste ANOVA one way e pós teste de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$.

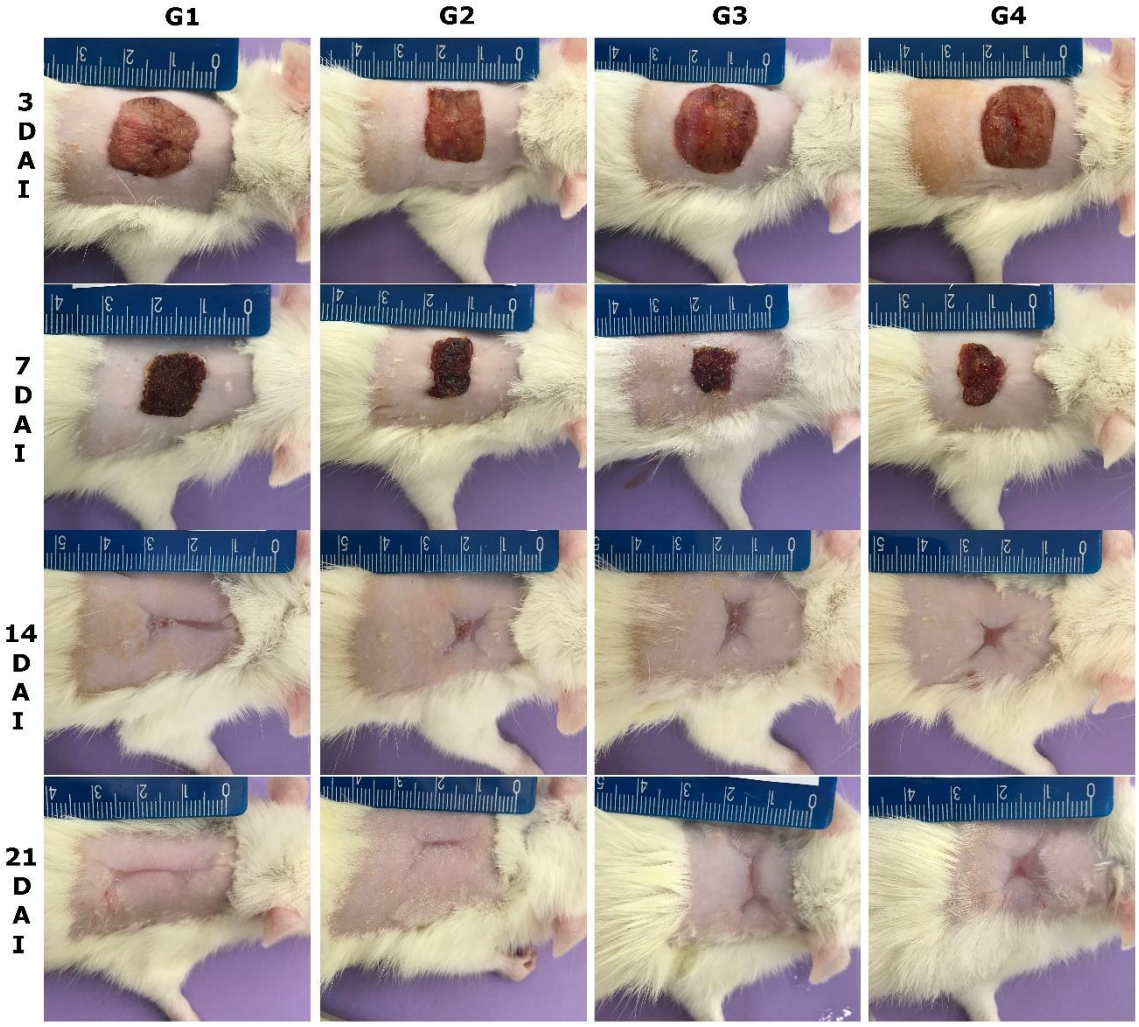


Figura 1: Evolução do processo de cicatrização de feridas no dorso dos ratos nos dias 3, 7, 14 e 21 pós-cirurgia, onde G1 corresponde ao grupo tratado com soro fisiológico e G2, G3 e G4 correspondem aos grupos tratados com o gel-creme a base do soro do látex de *H. speciosa* nas concentrações de 5% (G1), 15% (G2) e 25% (G3), respectivamente.

A análise histopatológica dos tecidos retirados das feridas realizadas em todos os grupos de tratamento, estão representados na Tabela 2. As análises estatísticas desses dados mostraram que houve diferença significativa entre os grupos no 3º DAI, o qual representa a fase inflamatória do processo de cicatrização de feridas. Nossos resultados mostram que o grupo tratado com gel-creme 15% (G3) formou mais fibrina que o grupo tratado com gel-creme 5% (G2). Apesar da diferença significativa entre G2 e G3 para formação de fibrina, esses grupos não diferiram do grupo controle (soro fisiológico). Ainda em relação ao 3º DAI, foi observado que a quantidade de infiltrados mononucleares (MN) e de novos vasos sanguíneos, nos grupos G3 e G4 (gel-creme 15% e 25%) diferirem significativamente do grupo controle ($p<0,05$). Desta forma, na fase de inflamação, os tratamentos com os géis-creme à base de soro de látex de *H. speciosa* 15% e 25% induziram um aumento significativo na angiogênese e na quantidade de infiltrados mononucleares nas feridas analisadas. Além disso, nos grupos G3 e G4 foi observada uma maior quantidade de mononucleares do que no grupo G2 (látex 5%). Na fase proliferativa (7º e 14º DAI) e na fase de remodelação (21º DAI), não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle. A Figura 2 e 3 apresentam as imagens histológicas representativas de cada grupo experimental.

Tabela 2: Análise histopatológica das feridas excisionais de ratos tratadas com soro fisiológico (G1), gel-creme a base de látex de *H. speciosa* 5% (G2), 15% (G3) e 25% (G4).

Processos patológicos	DAI	G1 Mediana	G2 Mediana	G3 Mediana	G4 Mediana	P	Dunn's
Necrose	3	2	2	2,5	3	0,11	
	7	3	3	1,5	3	0,09	
	14	0	0	0	0	0,67	
	21	0	0	0	0	1,00	
Fibrina	3	2,5	1,0	3	2	0,02	G3>G2
	7	0	0	0,5	1	0,19	
	14	0	0	0	0	0,59	
	21	0	0	0	0	1,00	
PMN	3	2	2	2,5	3	0,11	
	7	3	3	1,5	3	0,09	
	14	0	0	0	0,5	0,72	
	21	0	0	0	0	0,52	
MN	3	1	1	2	2	0,00	G3>G1, G3>G2, G4>G1, G4>G2
	7	3	3	3	3	1,00	
	14	2	2	2	2	0,97	
	21	1	1	1	1	0,47	
Fibroblasto	3	1	1	2	2	0,01	
	7	3	3	3	3	1,00	
	14	3	3	3	3	1,00	
	21	2	2	2	2	0,39	
Angiogênese	3	1	2	2	2	0,03	G4>G1, G3>G1
	7	3	3	3	3	1,00	
	14	2	3	2	2,5	0,06	
	21	2	2	2	2	0,81	
Hemorragia	3	1	1	1	1	0,41	
	7	1	0	1	1	0,25	
	14	0	0	0	0	0,29	
	21	0	0	0	0	0,62	

Legenda: DAI - dias após indução da lesão; PMN: infiltrados polimorfonucleares, MN: infiltrados mononucleares. Os parâmetros histopatológicos foram avaliados segundo os seguintes critérios: 0 – ausente; 1 – discreto; 2 – moderado; 3 – acentuado. Os resultados foram submetidos ao teste Krukal-Wallis e pós teste de Dunn's, com nível de significância de $p < 0,05$.

Figura 2: Fotomicrografia da pele de ratos aos 3 e 7 dias após indução da ferida excisional. Legenda: DAI - dias após indução da lesão; G1: soro fisiológico, G2: gel creme à base de látex 5%; G3: gel creme à base de látex 15% e G4: gel creme à base de látex 25%. Coloração HE. Escala de 50 micrometros.

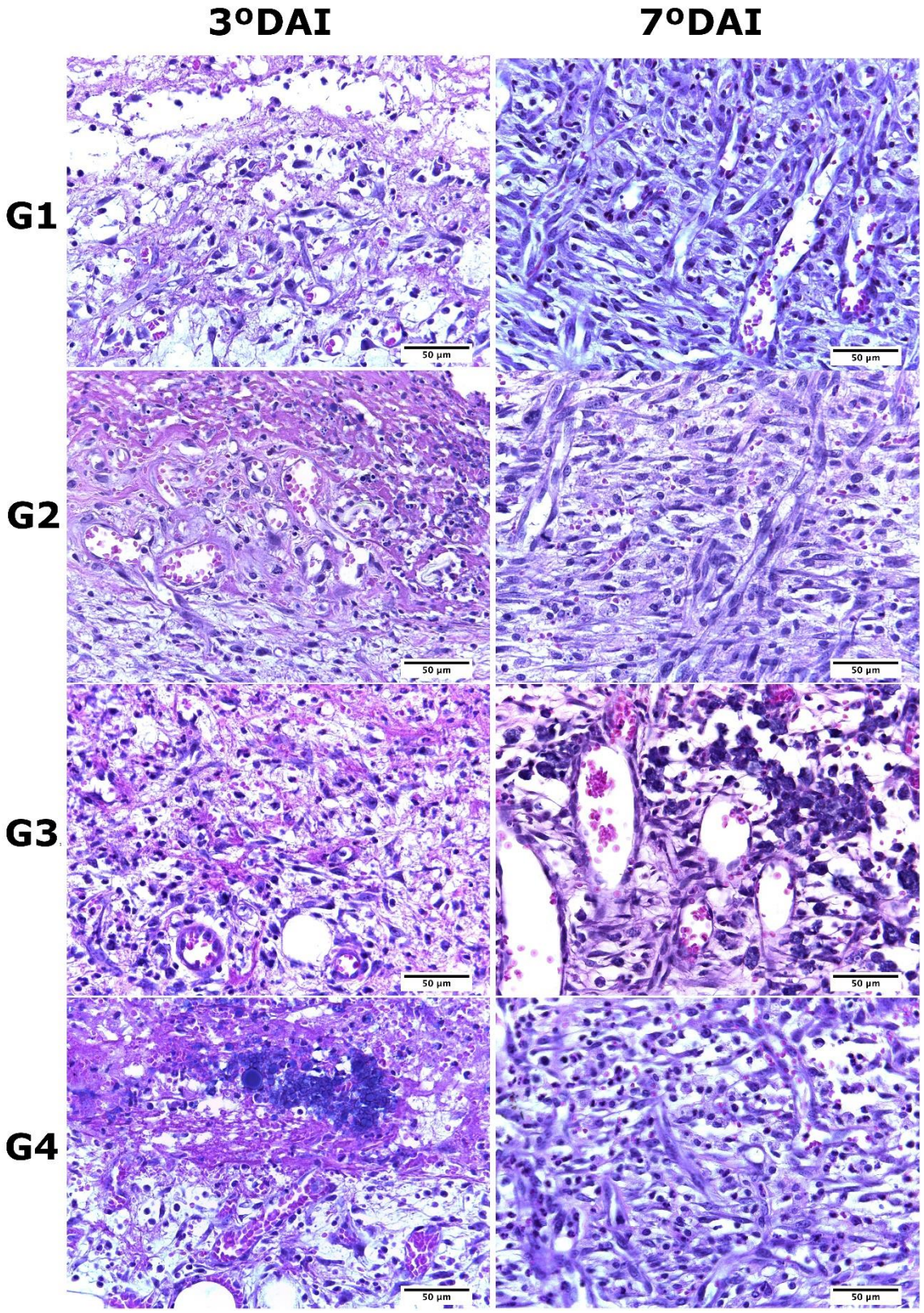
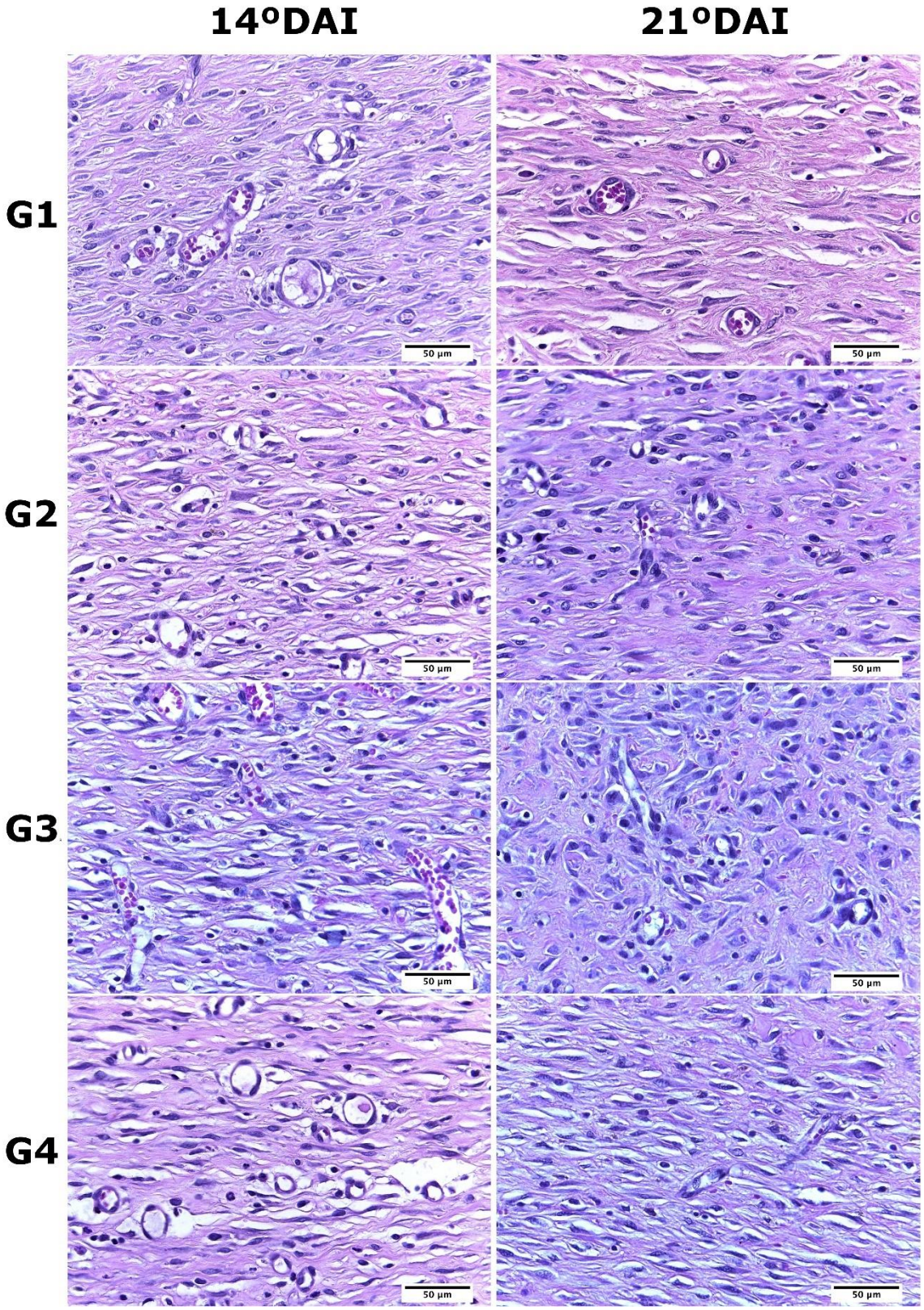


Figura 3: Fotomicrografia da pele de ratos aos 14 e 21 dias após indução da ferida excisional . Legenda: DAI - dias após indução da lesão; G1: soro fisiológico, G2: gel creme à base de látex 5%; G3: gel creme à base de látex 15% e G4: gel creme à base de látex 25%. Coloração HE. Escala = 50 micrometros.



A concentração de colágeno observada nos tecidos biopsiados das feridas realizadas em todos os grupos de tratamento, estão representados na Tabela 3. A análise desses dados demonstra que no 7º DAI houve maior produção de colágeno em todos os grupos tratados com gel-creme quando comparados ao grupo controle (G1). Além disso, os resultados obtidos mostram que o grupo G3 (látex 15%) teve uma maior produção de colágeno no tecido lesionado, durante a fase proliferativa do processo de cicatrização de feridas. Já na análise do 14º DAI, observou-se uma diminuição na síntese de colágeno no grupo G2 (látex 5%), quando comparado ao controle. Contudo, a taxa de colágeno no grupo G2 diferiu significativamente de G3, o que demonstra que os animais tratados com gel-creme 15%, produziram mais colágeno que os animais que receberam o gel-creme 5%. Por fim, em 21º DAI, tem-se que o grupo G3 (látex 25%) sintetizou mais colágeno que o grupo G2 durante a fase de remodelamento, porém como não diferiram do grupo controle, esses dados não são significativos.

Tabela 3: Quantificação do colágeno nas feridas excisionais de ratos tratadas com soro fisiológico (G1), gel-creme a base de látex de *H. speciosa* 5% (G2), 15% (G3) e 25% (G4).

Parâmetro histológico	DAI	G1 Mediana	G2 Mediana	G3 Mediana	G4 Mediana	P	Dunn's
Colágeno (%)	7	0.138	0.438	0.556	0.468	<0,0001	G2>G1; G3>G1; G4>G1; G3>G2
	14	2.103	1.057	2.055	1.664	0.0013	G1>G2; G3>G2
	21	6.53	4.305	10.48	6.141	0.0071	G3>G2

Legenda: DAI - dias após indução da lesão. Os parâmetros histopatológicos foram avaliados segundo os seguintes critérios: 0 – ausente; 1 – discreto; 2 – moderado; 3 – acentuado. Os resultados foram submetidos ao teste Krukal-Wallis e pós teste de Dunn's, com nível de significância de $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Compostos derivados de plantas desempenham um papel importante no desenvolvimento de medicamentos. Atualmente, aproximadamente 50% de todos os medicamentos em ensaios clínicos são derivados de plantas (SHAKYA, 2016). Dentre esses medicamentos estão o Biocure® e Regederm®, os quais são fármacos comerciais a base de látex de seringueira que aceleram o processo de cicatrização de feridas (Pelenova Biotechnology SA, http://www.pelenova.com.br). Apesar da comprovada bioatividade desses medicamentos, alguns trabalhos científicos têm demonstrado que produtos a base desse látex de seringueira podem causar alergias (KELLY; SUSSMAN, 2017). Pensando nisso, nosso

grupo de pesquisa iniciou estudos com outra lactífera, a *H. speciosa.* Dados da literatura indicam que o látex dessa espécie pode ter bioatividade semelhante ao látex de seringueira, porém sem potencial alergênico (COSTA, 2019). Assim, nesse trabalho foi avaliado o potencial do gel creme a base de soro de látex de *H. speciosa* como estimulador do processo de cicatrização de feridas excisionais usando como modelo experimental os ratos.

Os resultados obtidos nessa pesquisa mostraram que o tratamento terapêutico com o gel-creme 15% e 25% é benéfico na fase inflamatória (3º DAI) do processo de cicatrização. Isso porque foi observado que nessa fase houve um aumento da angiogênese e da proliferação de infiltrados mononucleares nas feridas (Figura 2 e 3, Tabela 2). A proliferação de macrófagos (MN) na ferida é crucial para sua cicatrização, pois estas células secretam vários fatores angiogênicos como VEGFA, TGF-ß, TGF-1, PDGF, aFGF, dentre outros, que são responsáveis por estimular o início da intensa atividade angiogênica no tecido (CORLISS et al., 2016). Assim, em um quadro de cicatrização normal, é esperado que nas primeiras 72 horas haja um aumento expressivo dos macrófagos no local da ferida, com vascularização máxima em torno do 5º dia (HOSGOOD, 2006). Contudo, com a progressão do processo de cicatrização, o estágio de inflamação inicial diminui e isso permite o avanço da fase de remodelamento (HOSGOOD, 2006). Esse aumento das células pró-inflamatórias durante um período inicial e o seu ordenado controle, contribui significativamente com a angiogênese, a formação de fibras de colágeno, e consequentemente, com o processo de cicatrização de feridas (PEGORIN et al., 2020).

No que diz respeito a contração da ferida, o tratamento com o gel creme (5% e 15%) induziu uma maior taxa de contração na fase proliferativa (7º DAI). Também foi observado que nessa fase, o gel-creme 15% foi capaz de estimular uma maior produção de colágeno nos tecidos feridos. De acordo com Campos e colaboradores (2007), a característica mais importante na fase de remodelamento é a deposição de colágeno de maneira organizada. O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano e é o principal componente da matriz extracelular dos tecidos. Durante o processo de cicatrização, o colágeno produzido inicialmente é mais fino do que o colágeno presente na pele normal, e tem orientação paralela à pele (REINKE; SORG, 2012). Com o passar do tempo, o colágeno inicial é reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão (CAMPOS et al., 2007). Essas mudanças nas fibras de colágeno aumentarão a força tênsil da ferida e ajudarão na contração da ferida. Esse padrão foi observado neste trabalho, pois o gel-creme 15% estimulou a proliferação de MN e a formação de novos vasos sanguíneos na ferida no 3º dia pós-cirurgia e no 7º dia aumentou a síntese de colágeno no leito da ferida, gerando desta forma, uma maior taxa de contração da ferida.

Previamente foram publicados dois artigos utilizando a biomembrana de látex de *H. speciosa* em modelos de cicatrização de feridas em ratos (PEGORIN et al. 2020; BONETE et al., 2020). Os dados obtidos em ambos os trabalhos corroboram os dados obtidos nesta pesquisa, porém vale ressaltar que os autores usaram o látex bruto polimerizado, e nesta pesquisa foram utilizadas diferentes concentrações da fração aquosa dispersa no gel-creme. Pegorin e colaboradores (2020) mostraram que a biomembrana de *H. speciosa* é segura e biocompatível as células humanas. Também mostraram que a biomembrana estimulou a proliferação de células inflamatórias e a formação de novos vasos nos tecidos lesionados, durante as fases iniciais do processo de cicatrização, e que aumentaram significativamente a síntese de colágeno a partir do 14º dia de tratamento, podendo ser auxiliar no tratamento de feridas cutâneas. Já Bonete e colaboradores (2020) relataram que nos primeiros dias de tratamento, a administração de biomembranas de látex de *H. speciosa* impregnadas com nanopartículas de prata em feridas de ratos estimula a proliferação de infiltrado inflamatório agudo (polimorfonucleares) e crônico (células mononucleares), proliferação de fibroblastos e deposição de fibras de colágeno. Os autores destacam que grupos tratados com biomembranas sem as nanopartículas também apresentaram esses efeitos.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nessa pesquisa mostram que o gel creme formulado com 15% e 25% da fração soro do látex de *H. speciosa* possui a capacidade de estimular as células inflamatórias e à angiogênese inicial. Além disso, esse gel creme a 15% aumentou significativamente a produção de colágeno, o que interfere na força tênsil no local da ferida e ajuda na contração do tecido. Esses achados demonstraram que ação deste biomaterial na concentração de 15% aumenta a angiogênese e deposição de colágeno, auxiliando o fechamento da ferida.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L.M. et al. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v.25, p.2153-62, 2014.

AL-WATBAN, F.A.H.; ANDRES, B.L. Effect of He-Ne laser (632,8 nm) and Polygen TM on CHO cells. *J Clin Laser Med Surg*, v.18, n.3, 1p.45-150, 2000.
ARRUDA, A.S. et al. Mangabeira latex production evaluation in Cerrado region of Goiás. *Ciência Florestal*, v.26, n.3, p.939-948, 2016.

BAHRAMSOLTANI, R. et al. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. Arch. Dermatol. Res., v.306, n.7, p.601–617, 2014.

BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing-A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.104, n.11, p.3653–3680, 2015.

BOATENG, J.S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci*, v.97, n.8, p.2892-2923, 2008.

BONETE, J. M. et al. Tissue reaction and anti-biofilm action of new biomaterial composed of latex from *Hancornia speciosa* Gomes and silver nanoparticles. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, Rio de Janeiro, v.92, n. 4, e20191584, 2020.

CAMPOS, A.C.L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. *ABCD, arq. bras. cir. dig*., São Paulo, v.20, n.1, p.51-58, Mar. 2007.

CAÑEDO-DORANTES, L.; CAÑEDO-AYALA, M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. Int J Inflam., v.2019, n.3706315. 2019. doi:10.1155/2019/3706315

CHEN, H. et al. Covalently antibacterial alginate-chitosan hydrogel dressing integrated gelatin microspheres containing tetracycline hydrochloride for wound healing, *Mat. Sci. Eng. C-Mater*., v.70, p.287–295, 2017. https:// doi.org/10.1016/j.msec.2016.08.086.

CHURCH, D. et al. Burn wound infections. *Clin microbiol rev.*, v.19, n.2, p.403-34, Apr. 2006.

CORLISS, B.A. et al.Macrophages: An inflammatory link between angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Microcirculation*., v.23, n.2, p.95-121, Feb. 2016. doi: 10.1111/micc.12259.

CORREA, F.R.S. et al. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFkB. *Biomed. Pharmacother*., v.86, p.162–171, 2017.

COSTA, A.F. Potencial irritante e alergênico ao látex de *Hancornia speciosa*. 2020. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Cerrado), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis/Goiás.

D'ABADIA, P. L. et al. *Hancornia speciosa* serum fraction latex stimulates the angiogenesis and extracellular matrix remodeling processes. *An. Acad. Bras. Ciênc*., Rio de Janeiro, v.92, n.2, e20190107, 2020.

GARROS, I.D.C. et al. Extract from *Passiflora edulis* on the healing of open wounds in rats: morphometric and histological study. *Acta Cirurgica Brasileira.*, v.21, n.3, p.55–65, 2006.

GILLETTE, B. et al. Regenerative wound surgery: Practical application of regenerative medicine in the OR. *AORN Journal*, v.109, n.3, p.298–317. 2019.

GWAK, J. H.; SOHN, S. Y. Identifying the trends in wound-healing patents for successful investment strategies. *PLOS ONE*, v.12, n.3, e0174203, 2017.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*., v.36, n.4, p.667-85, 2006.

JACOB, A. et al. The effects of Malaysian propolis and brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. BMC Complementary and Alternative Medicine, v.15, p.294, 2015.

JAFFE, L.; WU, S. C. Dressings, topical therapy, and negative pressure wound therapy. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, v.36, n.3, p.397-411. 2019.

KELLY, K.J.; SUSSMAN, G. Latex allergy: where are we now and how did we get there? *The Journal of Allergy Clinical Immunology: In Practice.* v. 5, p.1212-1216, 2017. doi: 10.1016/j.jaip.2017.05.029.

LI, J. et al. Pathophisiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*., v.25, p.9-18, 2007.

LOPEZ-DE LEON, A.; ROJKIND, M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*., v.33, n.8, p.737–743, 1985.

MACEDO, M.; FERREIRA, A.R. Plantas medicinais usadas no tratamento dermatológico da Bacia do alto Paraguai, Mato Grosso. *Rev Bras Farmacog*, v.14, p.40-44, 2004.

MANDELBAUM, S.H. et al. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte II. *An Bras Dermatol*, v.78, n.5, p.525-542, 2003.

MARINHO, D.G. et al. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol*, v.35, p.530-537, 2011.

MELO-REIS, P.R. et al. Potencial de cicatrização do látex de *Synadenium umbellatum* em feridas dorsais de ratos. *Estudos*, Goiânia, v.42, n.4, p.481-491, out/dez. 2015.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol.*, v.84, n.3, p.257-62, 2009.

NETO, G.; GUARIM-MORAIS, R.G. Medicinal plants resources in the Cerrado of Mato Grosso State, Brazil: a review. *Acta Bot Bras*, v.17, p.561-584, 2003.

NEVES, J.S.et al. Evaluation of the osteogenic potential of *Hancornia speciosa* latex in rat calvaria and its phytochemical profile. *J Ethnopharmacol*., v.183, p.151-158. 2016.

OLIVEIRA, S.T. et al. Formulações de confrei (*Symphytum officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. *Rev Fac de Zootec Vet Agro*, v.7, p.61-65, 2000.

PEGORIN, G. S. et al. Physico-chemical characterization and tissue healing changes by *Hancornia speciosa* Gomes latex biomembrane. *J Biomed Mater Res*., p.1–11. 2020. doi:10.1002/jbm.b.34758,

PELENOVA. Regedem® e Biocure, Pele Nova Tecnologia S.A. Disponível na internet: Http://www.pelenova.com.br/site. Acesso em 01 de maio de 2021.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do pantanal.** EMBRAPA, Planaltina, 320 p. 1994.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. [available on internet\http://www.Rproject.org].

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, v.49, n.1, p.35–43, 2012.

RIBEIRO, T.P. et al. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Hancornia speciosa* latex in *Allium cepa* root model. *Braz J Biol*, v.76, n1, p.245-249, 2016.

SAMPAIO, T.S.; NOGUEIRA, P.C.L. Volatile componentes of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. *Food Chem*, v.95, p.606-610, 2006.

SANTOS, P.O. et al. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Rev Bras Pl Med*, v.9, p.108-111, 2007.

SHAKYA, A.K. "Medicinal plants: future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine*, v. 4, n. 4, p. 59–64, 2016.

SHAW, T.J.; MARTIN, P. Wound repair at a glance. *Journal of Cell Science*, v.122, n.18, p.3209–3213, 2009.

SHEDOEVA, A. et al. Wound healing and the use of medicinal plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2019, 2019.

SILVA, T.F.et al. Bacterial community associated with the trunk latex of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) grown in the northeast of Brazil. *Anton Leeuw Int J G*., v.99, n.3, p.523-532. 2011.

TOTTOLI, E. M. et al. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics*, v.12, n.8, p. 735, 2020.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, v.37, n.5, p.1528–1542. 2009.

VIEIRA-NETO, R.D. Mangaba. In: VIEIRA-NETO, R.D. (Org**.). Potential fruit trees for coastal and offshore trawls**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros/Emdagro. pp. 115-140. 2002.

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

WILKINSON, H.N.; HARDMAN, M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. Open Biol., v.10, n.200223, 2020. http://doi.org/10.1098/rsob.200223

CAPÍTULO III

O PAPEL DAS ENZIMAS NA ATIVIDADE ANGIOGÊNICA DO LÁTEX DE *HANCORNIA SPECIOSA*

RESUMO

Dados da literatura têm mostrado a atividade angiogênica, antiinflamatória e antioxidante do látex de *Hancornia speciosa*. Estas propriedades são desejáveis para medicamentos usados para auxiliar no processo de cicatrização de feridas. De particular interesse nesse estudo, a angiogênese, é a etapa inicial e crucial do processo de cicatrização do tecido. O objetivo desse trabalho foi compreender o papel das proteínas no processo de angiogênese previamente observado em tecidos expostos ao látex de *H. speciosa*. Para isso, as proteínas presentes na fração soro do látex foram inativadas usando a proteinase K. Após a inativação proteica, a atividade angiogênica foi avaliada com o uso do ensaio da membrana corioalantóide de embrião de galinha (MCA). Os ensaios da MCA estão entre os modelos *in vivo* mais comumente empregados para estudar diferentes aspectos da angiogênese. Após os experimentos da MCA, análises bioquímicas foram realizadas para quantificar a proteínas totais e a atividade das enzimas presentes na fração soro do látex de *H. speciosa*. Como resultados, foi observado que as proteínas presentes na fração soro possuem atividade angiogênica e podem ser benéficas no desenvolvimento de materiais terapêuticos para cicatrização de feridas e regeneração de tecidos. Em relação à quantidade total de proteínas, é importante mencionar que diferente de outras espécies de lactíferas, o látex de *H. speciosa* apresentou baixa concentração de proteínas. Isso poderia ser uma vantagem no uso dessa espécie para o desenvolvimento de novos medicamentos com resposta hipoalergênica. Apesar do baixo conteúdo de proteínas, foi possível identificar atividade enzimática significativa de pelo menos 3 enzimas na fração soro do látex, são elas: β-1,3 glucanase, β glucosidase e proteases. De maneira geral, essas enzimas parecem influenciar o processo de cicatrização, auxiliando no desbridamento, auxiliando na remodelação da matriz extracelular e na deposição de colágeno, diminuindo as chances de contaminação por microrganismos. Em conclusão, o processo de cicatrização de feridas depende não apenas de células e fatores de crescimento disponíveis no tecido, mas também de enzimas do microambiente da matriz extracelular.

Palavras-chave: cicatrização de feridas; enzimas; membrana corioalantóide de ovo de galinha; proteinase K.

1. INTRODUÇÃO

A angiogênese é o processo de crescimento de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (ADAIR; MONTANI, 2010). Este é um processo vital no crescimento e desenvolvimento humano, bem como na cicatrização de feridas e na formação do tecido de granulação (FOLKMAN, 2003). Há décadas, pesquisadores buscam produtos ou estratégias para estimular a angiogênese e, consequentemente, acelerar o processo de cicatrização de feridas (SINGER; CLARK, 1999, SCHENEIDER et al., 2019). Sabe-se, que as plantas produzem uma variedade de compostos angiogênicos que podem ser importantes para o desenvolvimento de medicamentos para a cicatrização de feridas (WITTENAUER et al., 2015, DANCIU et al., 2015, KARIM et al. 2014). Entre os exsudatos vegetais, o látex demonstrou ter alto potencial angiogênico (de ALMEIDA et al., 2015). O látex é um fluido orgânico leitoso que escorre de algumas plantas após uma lesão no tecido. As funções gerais desse exsudato nas plantas estão associadas à excreção de metabólitos residuais, cobertura do tecido danificado e defesa contra patógenos (KONNO, 2011). Dentre os látex com atividade angiogênica, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com a bioprospecção do látex de *Hancornia speciosa* Gomes.

H. speciosa, popularmente chamada de mangabeira, é uma espécie nativa do Brasil que pertence à família Apocynaceae. É tipicamente encontrada nas vegetações da Floresta Amazônica, Caatinga e Cerrado. Estudos etnobotânicos têm mostrado o uso do látex de *H. speciosa* na medicina tradicional para o tratamento de acne, doenças fúngicas, tuberculose, úlceras gástricas e fraturas ósseas (POTT; POTT, 1994; NETO; GUARIM-MORAIS, 2003; MACEDO; FERREIRA, 2004; SAMPAIO; NOGUEIRA, 2006; SANTOS et al., 2007). Além do uso na medicina tradicional, dados da literatura mostram o alto potencial angiogênico (D'ABADIA et al., 2020; ALMEIDA et al., 2014), osteogênico (FLORIANO et al., 2016; Dos SANTOS NEVES et al., 2016), antioxidante (D'ABADIA et al., 2020) e anti-inflamatório (MARINHO et al., 2011) do látex de *H. speciosa*. Em relação ao potencial tóxico, foi observado que o látex de *H. speciosa* não apresenta efeitos de citogenotóxicos contra células humanas (COSTA, 2019), animais (ALMEIDA et al., 2014) e vegetais (RIBEIRO et al., 2016).

Para continuar o trabalho de bioprospecção, é importante identificar quais substâncias presentes no látex possuem atividade angiogênica. Estudo anterior determinou que os compostos responsáveis pela atividade angiogênica estão presentes na fração do soro do látex de *H. speciosa*. Essa fração contém grande variedade de proteínas, metabólitos secundários e compostos luteoides. Dentre os diferentes componentes presentes na fração soro do látex, o

presente estudo tem como objetivo avaliar a influência de proteínas na atividade angiogênica. Para testar a hipótese de que as proteínas presentes no soro do látex são as principais responsáveis pela atividade angiogênica, este trabalho inativou as proteínas presentes no soro utilizando a enzima proteinase K. Após a inativação proteica, a atividade angiogênica foi avaliada por meio do ensaio com membrana corioalantóide de embrião de galinha (MCA). Este é um dos métodos mais empregados para estudar a angiogênese e tem como principais vantagens ser rápido, ter baixo custo, ser simples, ter boa reprodutibilidade, ser de fácil observação e sem grandes preocupações éticas envolvidas (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2014; ALEKSANDROWICZ; HERR, 2015; PRADO et al., 2019). Após os experimentos da CAM confirmarem o papel das proteínas na angiogênese, análises bioquímicas foram realizadas para quantificar a o total de proteínas e as principais classes enzimáticas presentes na fração soro do látex de *H. speciosa*. O perfil enzimático deste biomaterial pode nos fornecer uma pista da atividade biológica da fração soro na angiogênese e consequente cicatrização de feridas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do látex

O látex de *H. speciosa* foi obtido de árvores da coleção pertencente à Universidade Estadual de Goiás, na cidade de Ipameri, estado de Goiás, Brasil (17°43’19’’S, 48°9’35’’W, 773 m). Após a identificação botânica, um espécime foi depositado no Herbário da Universidade Estadual de Goiás (Anápolis, Goiás, Brasil) sob o número 4875. O látex foi extraído, no período da manhã, em tubo estéril pelo método de perfuração do tronco da árvore, segundo a metodologia de Arruda et al. (2016). Para a coleta do látex, foi utilizada uma faca para fazer um corte de aproximadamente 5 cm de comprimento e 0,5 cm de profundidade na casca. O látex foi centrifugado por 5min a 2.000g para retirada dos detritos oriundos do processo de coleta.

2.2 Fracionamento do látex

O látex de *H. speciosa* foi centrifugado a 4 °C por 1h a 22.000g (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific). Após a centrifugação inicial, a borracha foi cuidadosamente separada

e uma segunda centrifugação foi realizada. Duas frações diferentes foram obtidas após as centrifugações, uma zona branca superior com as partículas de borracha, e uma fração aquosa chamada de fração soro. O mesmo método de fracionamento foi empregado no látex de *Hevea brasilensis* para obtenção do controle da amostra para análise de quantificação de proteína total e atividade enzimática.

2.3 Inativação das proteínas usando Proteinase K

A Proteinase K, também conhecida como protease K ou endopeptidase K, é comumente usada em biologia molecular para digerir proteínas. A fração soro do látex de *H. speciosa* foi tratado com proteinase K de acordo com as instruções do fabricante.

2.4 Potencial angiogênico/ensaio MCA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais da Universidade Estadual de Goiás, Brasil (Protocolo nº 007/2018). O ensaio MCA foi realizado, com poucas modificações, de acordo com a metodologia descrita por Almeida et al (2014). Quatro grupos de 12 ovos fertilizados de galinha (*Gallus domesticus*) foram incubados a 37 °C em ambiente umidificado (cerca de 70% de umidade). Após cinco dias de incubação, a MCA foi acessada através de um orifício realizado na casca do ovo, e os ovos foram devolvidos à incubadora. No 13º dia de incubação, a MCA foi exposta aos diferentes tratamentos. Para isso foram utilizados discos de papel de filtro embebidos com 3µl das seguintes soluções/tratamentos: (1) fração soro (SE); (2) fração soro com proteínas inativadas (IPSE); (3) água (WA, controle negativo); (4) dexametasona (DE, controle inibidor da angiogênese). Após a exposição da MCA aos diferentes tratamentos, os ovos foram devolvidos à incubadora por 72h. Em seguida, as MCAs foram fixadas com formaldeído (3,7%) por 5 min. Uma tesoura foi usada para remover a MCA do ovo, as quais foram mantidas em placas de Petri com solução de formaldeído. A rede vascular neoformada foi analisada e quantificada por meio de imagens capturadas usando dois softwares diferentes. O *Gimp* (versão 2.0.5) foi usado para normalizar a saturação, luz e contraste das imagens capturadas; e o *Image J* (NIH, versão 1.28) foi usado para quantificar o número de pixels da área vascularizada em cada imagem. A atividade angiogênica da fração soro do látex de *H. speciosa* foi avaliada comparando os grupos tratados e de controle através de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste a posteriori de

Tukey, para comparar as médias dos tratamentos. Um valor de $p < 0,05$ foi usado para indicar significância estatística. Após a análise das imagens, as MCAs foram incluídas em parafina para análise histológica, corados com hematoxilina-eosina e examinados em microscopia óptica. Os parâmetros avaliados foram: inflamação, fibroblastos e neovascularização. Os resultados foram classificados com base na intensidade observada e os dados foram transformados em variáveis quantitativas atribuindo-se os seguintes escores: 0 para ausência de parâmetro (0%), 1 para discreto (1-25% de ocorrência), 2 para moderado (26-50% de ocorrência) e 3 para acentuado (acima de 51% de ocorrência). Os resultados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de $p < 0,05$, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn's para comparação das médias dos tratamentos.

2.5 Quantificação de proteína total

A quantidade total de proteínas presente na fração soro foram determinadas usando o método de Bradford (Bradford, 1976). Para este teste, a curva padrão foi inicialmente preparada com a albumina (1 mg/mL BSA) e suas diluições seriadas em H_2O (0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL). O látex da fração soro foi preparado usando 2,37mL de água, 30µL do látex da fração soro e 600 µL de Bradford. A mistura foi incubada durante 5 min no escuro e medida a 595 nm (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices). O mesmo protocolo foi usado para medir a quantidade total de proteínas na fração soro do látex de *H. brasiliensis*.

2.6 Quantificação da atividade enzimática

2.6.1 Atividade de protease

A atividade de protease foi determinada utilizando caseína como substrato, de acordo com a metodologia Sarath et al (2001), com modificações. A reação foi feita em tampão acetato de sódio (50 mM pH 5,0), contendo 1% de caseína e a amostra devidamente diluída incubados em banho-maria a 35°C. O tempo de reação foi contabilizado e a atividade proteolítica mensurada em 1 unidade de atividade em função do tempo de reação. Após a reação, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 10% para interromper a reação. Os eppendorfs de reação foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante foi quantificado em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 280 nm. A atividade enzimática foi

expressa em U/mL, definida como a quantidade de enzima necessária para promover a liberação de 1 µmol de Tyr/min nas condições de ensaio.

2.6.2 Atividade de β-1,3-glucanase (L9634 Sigma)

A atividade de β-1,3-glucanase foi determinada utilizando laminarina como substrato a uma concentração de 0,75% p/v em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0). Utilizou-se uma mistura contendo 10 µL de solução enzimática e 90 µL de solução de laminarina. A mistura foi incubada a 35° C por 10 minutos e em seguida foram adicionados 100 µl de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e a reação incubada a 100°C durante 5 minutos. A quantidade de açúcar redutor foi determinada em 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de açúcar redutor por minuto.

2.6.3 NAGase, N -acetil- β -D-glicosaminidase (Lot 24H5022 Sigma)

Para determinação da atividade de N-acetil-glicosaminidase, 120Ml de tampão acetato de sódio 50 Mm Ph 5.0 foram incubados com 10 Ml de Pnp-Nacetil-β-D-diacetylglicosaminide 2,5 Mm, 50 Ml de água e 10 Ml de amostra a 35 °C por 10 minutos em banho Maria. A reação foi parada com a adição de 60 Ml de Tetraborato de sódio saturado. Foram transferidos 100 Ml para uma placa de ELISA e a absorbância obtida a 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade (U) de N-acetil-β-D-glicosaminidase foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar um µmol de p-nitrofenol por minuto.

2.6.4 Atividade da enzima fosfatase ácida (N3129 Sigma)

Foi determinada usando substrato derivado de p-nitrophenyl-phosphate (p-NPP) (2,5 mM). A mistura de ensaio continha 120µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5.0, 10 µL de (p-NPP), 50 µL de água e 10 µL de amostra a 40 °C por 10 minutos em banho Maria. A reação foi parada com a adição de 60 µL de Tetraborato de sódio saturado. Foram transferidos 100 µL para uma placa de ELISA e a absorbância obtida a 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade de fosfatase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 µMol de ρ-nitrofenol por minuto.

2.6.5 Atividade de beta-glucosidase (N7006- Sigma)

A atividade de beta-glucosidase foi determinada usando substrato derivado de p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (p-NPglu) (2,5 mM). A mistura de ensaio continha 120µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5.0, 10 µL de (p-NPGlu), 50 µL de água e 10 µL de amostra a 40 °C por 10 minutos em banho Maria. A reação foi parada com a adição de 60 µL de Tetraborato de sódio saturado. Foram transferidos 100 µL para uma placa de ELISA e a absorbância obtida a 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade enzimática de N-acetil-β-D-glucosidade foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 µMol de ρ-nitrofenol por minuto.

2.6.6 Atividade de quitinase (090M5001V Sigma)

A atividade de quitianse foi determinada usando substrato derivado de pnp: p-nitrophenyl-N-N-diacetylchitobiose (p-NPNNDC) (2,5 mM). A mistura de ensaio continha 120µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5.0, 10 µL de p-NPNNDC, 50 µL de água e 10 µL de amostra a 40 °C por 10 minutos em banho Maria. A reação foi parada com a adição de 60 µL de Tetraborato de sódio saturado. Foram transferidos 100 µL para uma placa de ELISA e a absorbância obtida a 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade enzimática quitinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 µMol de ρ-nitrofenol por minuto.

2.6.7 Atividade de Lipase (N2752 Sigma)

A atividade de lipase foi realizada utilizando-se o substrato sintético p-nitrofenilpalmitato (pNPP), acompanhando a liberação do íon p-nitrofenilpalmitato (410nm). O meio reacional para a determinação da atividade lipolítica foi constituída de: Solução I: Goma arábica (0,05g); Tampão acetato de sódio pH 5.0 50mM 90 mL; Triton X-100 (250 µL); Solução II: p-nitrofenilpalmitato 0,030 g; Isopropanol 10 mL. A solução I foi homogeneizada por 25 minutos e estocada a 4ºC. A solução II foi homogeneizada por 5 minutos e estocada a -20ºC. As duas soluções serão misturadas minutos antes de sua utilização e homogeneizadas por 10 minutos. A solução resultante não pode ser estocada. A reação foi iniciada pela adição de 50µL do extrato bruto e 450µL de meio reacional, incubadas inicialmente a 50°C. A reação foi interrompida com adição de 500µL de solução saturada de tetraborato de sódio ($Na_2B_4O_7$) em

diferentes intervalos de tempo. Controles com a adição da enzima desnaturada (brancos) foram incluídos em cada experimento, determinando-se assim a hidrólise espontânea dos substratos nas condições do ensaio. A unidade (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar um micromol do substrato em um minuto (µmols/min), nas condições de ensaio.

3. RESULTADOS

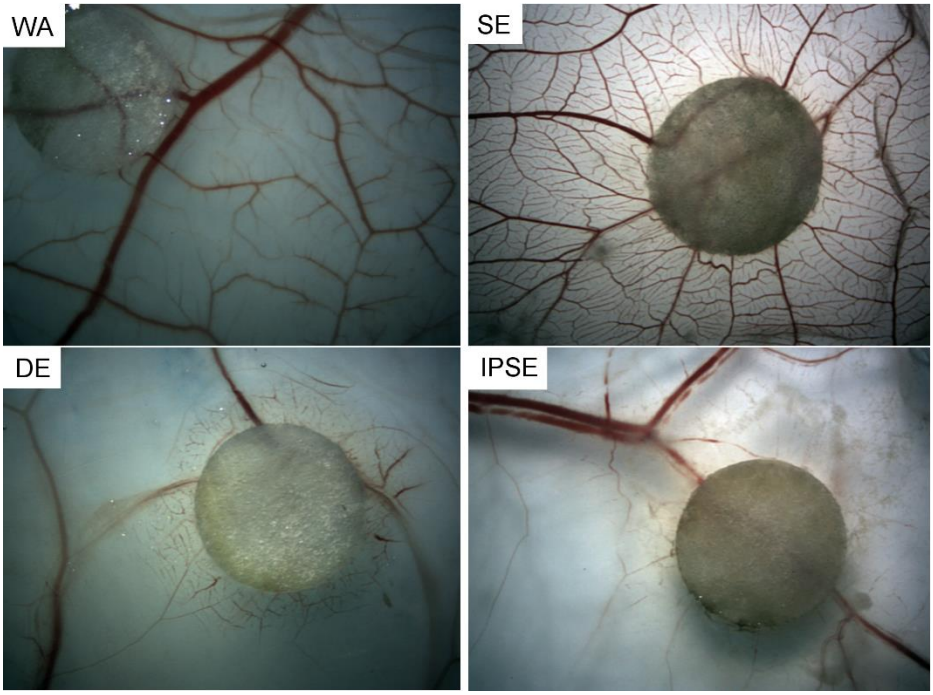
Para avaliar o papel das proteínas na atividade angiogênica da fração soro do látex de *H. speciosa* foram quantificadas a porcentagem da vascularização da MCAs expostas aos diferentes tratamentos. Imagens representativas das redes vasculares de cada condição são apresentadas na Figura 1. A fração soro, como era esperado, apresentou aumento na porcentagem de vascularização em relação à água (controle negativo), o que confirma a atividade angiogênica da fração soro de *H. speciosa* (Tabela 1). Porém, a fração soro tratada com proteinase K e sem proteínas ativas não apresenta atividade angiogênica. A vascularização no grupo IPSE não apresentou diferenças significativas na porcentagem de vascularização com controle inibidor (dexametasona).

Tabela 1. Taxa de vascularização das membranas corioalantóides tratadas com as soluções controle (WA: água e DE: dexametasona) e frações soro de H. speciosa (SE: fração soro do látex; IPSE: fração soro do látex com a inativação de proteínas utilizando Proteinase K).

Tratamentos	**Vascularização (%)**	**Tukey**
WA	14.03 ± 1.4	A
DE	9.30 ± 1.3	B
SE	26.55 ± 1.5	C
IPSE	11.7 ± 2.4	B
	P=0,005	

* Os dados foram submetidos à análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis. As mesmas letras não representam diferenças significativas pelo teste de Tukey.

Figura 1. Potencial angiogênico do látex de *Hancornia speciosa* em modelo de membrana corioalantóide (MCA). Imagens representativas dos diferentes tratamentos: WA (água, controle neutro); DE (dexametasona, inibidor da angiogênese); SE (fração soro do látex de *H. speciosa*); IPSE (fração soro do látex de *H. speciosa* com a inativação de proteínas utilizando Proteinase K).



Após a análise da morfologia da MCA, as análises histológicas foram realizadas (Figura 2). Três parâmetros foram observados, sendo que, para inflamação, o grupo da fração soro é significativamente diferente da dexametasona (Tabela 2). Os fibroblastos do grupo tratado com a fração soro também são significativamente diferentes de dexametasona e água. Além disso, o grupo tratado com a fração soro apresentou aumento significativo no parâmetro de angiogênese apresentando diferença significativa com todos os outros grupos (WA, DE, IPSE). Os resultados histológicos obtidos estão de acordo com os dados morfológicos da MCA obtidos neste trabalho, indicando que a fração soro de *H. speciosa* apresentou atividade angiogênica, porém, esta propriedade é perdida após o tratamento enzimático desta fração. Esses resultados sugerem que as proteínas são responsáveis pela atividade angiogênica do látex de *H. speciosa*.

Figura 2. Fotomicrografia das membranas corioalantóides tratadas com frações soro de *Hancornia speciosa*. Grupos analisados: WA (água, controle neutro); DE (dexametasona, inibidor da angiogênese); SE (fração de soro de *H. speciosa*); IPSE (fração soro do látex de *H. speciosa* com a inativação de proteínas utilizando proteinase K). Coloração HE. Escala = 20 micrometros.

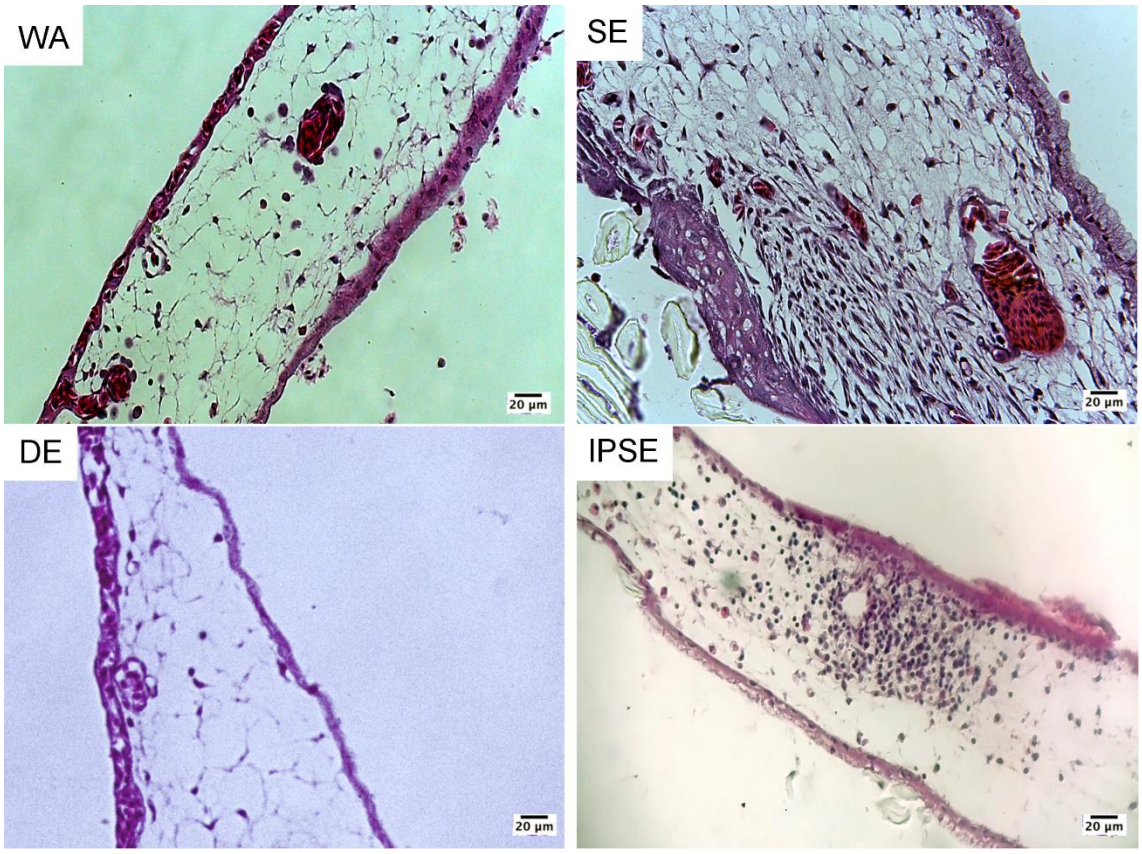


Tabela 2. Parâmetros histológicos das membranas corioalantóides tratadas com as soluções controle (W: água e DE: dexametasona) e frações soro de *H. speciosa* (SE: fração soro do látex; IPSE: fração soro do látex com a inativação de proteínas utilizando Proteinase K). Parâmetros: 0 para ausência; 1 para discreto; 2 para moderado; e 3 para acentuado.

Tratamentos	**Inflamação**		**Fibroblastos**		**Angiogênese**	
	Mediana	Dunn's	Mediana	Dunn's	Mediana	Dunn's
W	1	A	0	A	0	A
DE	0	AB	0	AC	0	A
SE	2	AC	3	BD	2,5	B
IPSE	1	A	1	A	0	A
	P=0,005		*P=0,003*		*P=0,003*	

* Os dados foram submetidos à análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis.
As mesmas letras não representam diferenças significativas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's.

Para a avaliação do teor de proteína na fração soro do látex de *H. speciosa* foi utilizado o ensaio de Bradford e os resultados obtidos foram comparados com os valores observados no látex de *H. brasiliensis*, lactífera com potencial alergênico bem estudada na literatura. A fração

soro do látex *H. speciosa* apresentou 0,17 mg/mL de proteína, enquanto o teor encontrado na fração soro de *H. brasiliensis* foi bem maior, 1,1 mg/mL. Além disso, a Tabela 3 mostra as atividades enzimáticas da fração soro do látex de ambas as espécies. Como resultado, nenhuma atividade enzimática foi observada para NAGase, Fosfatase, Quitinase, sendo encontrada uma atividade muito pequena para Lipase. Por outro lado, uma atividade notável de β-1,3-glucanase foi detectada na fração soro do *H. speciosa.*

Tabela 3. Atividade enzimática da fração soro do látex de *Hancornia speciosa* e *H. brasiliensis*. A atividade enzimática foi expressa em U/mL.

Amostras	Protease	β-1,3 glucanase	NAGase	Phosphatase	β-glucosidase	Quitinase	Lipase
Fração soro do látex de *H. speciosa*	1.95	92.05	0	0	2.45	0	0.2
Fração soro do látex de *H. brasiliensis*	8.37	5.35	5.92	8.54	7.02	4.73	2.52

4. DISCUSSÃO

O processo de reparo é extremamente complexo e tem início imediatamente após a lesão. Caracteriza-se primeiramente, por eventos vasculares e celulares, tais como: aumento da permeabilidade vascular e angiogênese. Na verdade, a cicatrização de feridas não pode ocorrer sem a formação de novos vasos sanguíneos. Então, neste trabalho buscou-se compreender o papel das proteínas no processo de angiogênese previamente detectado em tecidos tratados com látex de *H. speciosa* (ALMEIDA et al., 2014; D'ABADIA et al., 2020; BONETE et al., 2020; PEGORIN et al. 2020). Os resultados obtidos podem representar uma pista para estudos que visam identificar os agentes que controlam a angiogênese e que podem ser utilizados para o desenvolvimento de terapias para cicatrização de feridas e regeneração de tecidos.

Os resultados obtidos com o ensaio MCA confirmam a atividade angiogênica da fração soro do látex de *H. speciosa*. Além disso, a ausência de angiogênese no grupo IPSE, onde não há proteínas, indicou que a estimulação do processo de angiogênese em MCA está associada a proteínas presentes na fração soro. Então, se as proteínas têm papel importante na angiogênese, foi determinado quanto de proteína está presente na fração soro do látex de *H. speciosa*, bem como quais atividades enzimáticas elas exercem.

Em relação à quantidade total de proteínas, é importante mencionar que diferente de outras espécies de lactíferas, o látex de *H. speciosa* apresentou baixa concentração de proteínas. Isso poderia ser uma vantagem no uso dessa espécie para o desenvolvimento de novos medicamentos com resposta hipoalergênica. Isso porque, sabe-se que os principais responsáveis pela sensibilização da pele ao látex são as proteínas (Kelly e Sussman, 2017). De acordo com o *International Allergen Nomenclature Committee of the IUIS* (*International Union of Immunological Societies*) foram identificadas e caracterizadas 15 proteínas alergênicas no látex de *H. brasilienses*, que são denominadas de *Hev 1* a *Hev 15* e cada proteína possui um peso molecular que permite diferenciá-las (http://www.allergen.org). Os resultados encontrados neste trabalho, estão de acordo com Malmonge et al. (2009), que também identificou uma baixa concentração de proteínas no látex bruto de *H. speciosa* (1,900 ± 32 μg/g dw) e também sugeriu seu potencial hipoalergênico.

Apesar de baixa concentração de proteínas quando comparada a outras lactíferas, foi possível detectar atividade enzimática significativa na fração soro de *H. speciosa*. Três enzimas apresentaram atividade considerável: 1,3-β-glucanase, β glucosidase e proteases (Tabela 3). Frente a isso, é importante compreender como essas enzimas poderião ajudar no processo de cicatrização de feridas. As 1,3-β-glucanases são enzimas fibrolíticas, que desempenham papel na hidrólise de carboidratos para produção de energia em fungos e bactérias (USOLTSEVA et al., 2020). Por causa da atividade fibrolítica, essa enzima poderia auxiliar no desbridamento e remodelação durante o processo fisiológico de cicatrização. Durante o processo de cicatrização, o fibroblasto produz a substância amorfa fundamental (mucopolissacarídeos) envolvida na produção, tamanho e orientação das fibras de colágeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1993). Além de auxiliar na orientação das fibras de colágeno, foi sugerido que 1,3-β-glucanases poderiam promover a proliferação celular (JOSE et al., 2014). Além disso, nenhum efeito citotóxico foi observado quando células animais foram expostas a 1,3-β-glucanases, mesmo em altas concentrações (USOLTSEVA et al., 2020). Outro possível efeito das 1,3-β-glucanases na ferida é a sua atividade antifúngica (USOLTSEVA et al., 2020; HONG; MENG., 2003), o que poderia reduzir a chance de contaminação da ferida.

No que diz respeito à β-glucosidase, alguns relatos mostraram que as glico-hidrolases desempenham um papel importante na destruição da matriz do tecido conjuntivo durante o processo inflamatório (CHITHRA et al., 1998). Essas enzimas trazem benefícios para o organismo como redução de dano oxidativo, perfil protrombótico e inflamação sistêmica (ROMERO-SEGURA et al., 2012). Um extrato vegetal que apresenta atividade de cicatrização de feridas e contém β-glucosidase o extrato de *Aloe vera* (CHITHRA et al., 1998).

Com relação à atividade de proteases, alguns estudos têm demonstrado que essas enzimas podem apresentar propriedades indutoras e hidrolisantes de coágulos (URS et al., 2017). A formação de coágulos é vital para a hemostasia, a fase inicial da cicatrização de feridas, onde as proteases apresentam atividades pró-coagulantes e semelhantes à trombina. A hidrólise do coágulo é um pré-requisito para os eventos da fase regenerativa, na qual as atividades das proteases podem ajudar no desbridamento da ferida, tais como a atividade fibrinolítica, gelatinolítica e colagenolítica (URS et al., 2017). No geral, as proteases oferecem excelentes condições para a cura fisiológica da ferida, uma vez que elas atuam: complementando as proteases endógenas na hemostasia; atenuando a atividade microbiana; desbridando feridas; e estimulando a angiogênese e proliferação celular (URS et al., 2017). Alguns exemplos de proteases usadas no processo de cicatrização de feridas são papaína (UDOD; STOROZHUK, 1979), bromelina (MAURER, 2001), curcain (NATH; DUTTA, 1991) e ficina (DEVARAJ et al., 2008; SHIKSHARTHI; MITTAL, 2011).

5. CONCLUSÃO

As proteínas presentes na fração soro do látex de *H. speciosa* possuem atividade angiogênica e podem ser benéficas para o desenvolvimento de materiais terapêuticos para cicatrização de feridas e regeneração de tecidos. O conteúdo de proteína da fração soro é baixo; no entanto, 3 enzimas mostram atividade neste material: β-1,3-glucanase, β glucosidase e proteases. De maneira geral, essas enzimas parecem influenciar o processo de cicatrização, auxiliando no desbridamento, na remodelação da matriz extracelular e na deposição de colágeno, diminuindo as chances de contaminação por microrganismos. Dessa forma, a cura depende não apenas das células e fatores de crescimento disponíveis, mas também das enzimas do microambiente da matriz extracelular.

REFERÊNCIAS

ADAIR, T.H.; MONTANI, J.P. **Angiogenesis.** San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Chapter 1, Overview of Angiogenesis. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53238

ALEKSANDROWICZ, E.; HERR, I. Ethiccal eutanasia and short-term anestesia of chick embryo. *ALTEX*. v.32, n.2, p.143-7, 2015.

ALMEIDA, L.M. et al. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. *J Mat Sci: Mat Med.*, v.25, n.9, p.2153-2162. 2014. https://doi.org/10.1007/ s10856-014-5255-8

ARRUDA, A.S. et al. Mangabeira latex production evaluation in Cerrado region of Goiás. *Ciência Florestal*, v.26, n.3, p.939-948, 2016. https://doi.org/10.5902/1980509824222

BONETE, J.M. et al. Tissue reaction and anti-biofilm action of new biomaterial composed of latex from *Hancornia speciosa* Gomes and silver nanoparticles. *An Acad Bras Ciênc*, v.16, n.92, e20191584, 2020. doi: 10.1590/0001-3765202020191584.

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-Dye Binding. *Anal Biochem*., v.72, p.248-254, 1976.

CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G.B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.59, n.3, p.179-186, 1998.

COSTA, A.F. Potencial irritante e alergênico ao látex de Hancornia speciosa. 2020. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Cerrado), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis/Goiás.

D'ABADIA, P.L. et al. *Hancornia speciosa* serum fraction latex stimulates the angiogenesis and extracellular matrix remodeling processes. *An Acad Bras Cienc*, v.92, n.2, pp. e20190107, 2020. doi:10.1590/0001-3765202020190107.

DANCIU, C. et al. Evaluation of phenolic profile, antioxidant and anticancer potential of two main representants of *Zingiberaceae* family against B164A5 murine melanoma cells. *Biol Res*, v.48, p.1-9, 2015.

DEVARAJ, K.B.; GOWDA, L.R.; PRAKASH, V. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry*, v.69, n.3, p.647–655, 2008. doi:10.1016/J. Phytochem.2007.09.003

DE ALMEIDA, L.M. et al. The state-of-art in angiogenic properties of latex from different plant species. *Current Angiogenesis*, v.4, n.1, p.10-23. 2015. https://doi.org/10.2 174/2211552804011605171645 31

DOS SANTOS NEVES, J. et al. Evaluation of osteogenic potential of *Hancornia speciosa* latex in rat calvaria and its phytochemical profile. *J Ethnopharmacol*, v.13, n.183, p. 151-158, 2016.

FLORIANO, J.F. et al. Comparative study of bone tissue accelerated regeneration by latex membranes from *Hevea brasiliensis* and *Hancornia speciosa*. *Biomedical Physics& Engeering Express*, v.2, n.5, p.045007. 2016.

FOLKMAN J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*, v.3, n.7, p.643-651. https://doi. org/10.2174/1566524033479465

HONG, T.Y.; MENG, M. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3-beta-glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v.61, n.5–6, p.472–478, 2003..https://doi.org/10.1007/s00253- 003-1249-z.

JOSE, D. et al. Potential application of beta-1, 3 glucanase from an environmental isolate of *Pseudomonas aeruginosa* MCCB 123 in fungal DNA extraction. *Indian J Exp Biol*., v.52, n.1, p.89-96, 2014.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. - Tecidos conjuntivos. In JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 7 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1993. p 65-87.

KARIM, A.A. et al. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. *BMC Complement Altern Med*, v.14, p.381, 2014.

KELLY, K.J.; SUSSMAN, G. Latex allergy: where are we now and how did we get there? *The Journal of Allergy Clinical Immunology: In Practice*, v.5, p.1212-1216, 2017. doi: 10.1016/j.jaip.2017.05.029.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*, v.72, n.13, p.1510-1530, 2011.

MACEDO, M.; FERREIRA, A.R. Plantas medicinais usadas no tratamento dermatológico da Bacia do alto Paraguai, Mato Grosso. *Rev Bras Farmacog*, v.14, p.40-44, 2004.

MALMONGE, J.A. et al. Comparative study on technological properties of latex and natural rubber from *Harconia speciosa* gomes and *Hevea brasiliensis*. *J Appl Polym Sci*. v.111, p.2986–2991, 2009.

MARINHO, D.G. et al. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol*, v.35, p.530-537, 2011.

MAURER, H. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v.58, n.9, p.1234–1245, 2001.

MONTEIRO, V.N. et al. *Trichoderma reesei* - Mycoparasitism against *Pythium ultimum* is coordinated by G-alpha Protein GNA1 Signaling. *Journal Microb Biochemistry Technology*, v.7, p.1. 2015.

NATH, L.K.; DUTTA, S.K. Extraction and purification of curcain, a protease from the latex of *Jatropha Curcas* Linn. *J Pharm Pharmacol*, v.43, n.2, p.111–114, 1991.

NETO, G.; GUARIM-MORAIS, R.G. Medicinal plants resources in the Cerrado of Mato Grosso State, Brazil: a review. *Acta Bot Bras*, v.17, p.561-584, 2003.

NORONHA, E.F.; ULHOA, C.J. Characterization of a 29-KDa ß-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Lett*., v.183, p.119-123, 2000.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; SEGURA, T.; IRUELA-ARISPE, M. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, v.17, p.779-804, 2003.

PEGORIN, G.S. et al. Physico-chemical characterization and tissue healing changes by *Hancornia speciosa* Gomes latex biomembrane. *J Biomed Mater Res*., p. 1– 11, 2020.

POTT, A.; POTT, V.J. 1994. **Plantas do pantanal**. EMBRAPA, Planaltina, 320 p.

PRADO, A.D.L. The chick embryo chorioallantoic membrane assay as a model for the study of angiogenesis. *Biosci. J*., Uberlândia, v.35, n.4, p.1262-1275, July/Aug. 2019.

QUALHATO, T.F. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: valuation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol Lett*, v.35, p.1461–1468. 2013.

RIBEIRO, T.P. et al. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Hancornia speciosa* latex in *Allium cepa* root model. *Braz J Biol*, v.76, n.1, p.245-249, 2016.

ROMERO-SEGURA, C. et al. The role of olive β-glucosidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International*, v.4, p.191–196, 2012.

SAMPAIO, T.S.; NOGUEIRA, P.C.L. Volatile componentes of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. *Food Chem*, v.95, p.606-610, 2006.

SANTOS, P.O. et al. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Rev Bras Pl Med*, v.9, p.108-111, 2007.

SARATH, G.; ZEECE, M.G.; PENHEITER, A.R. **Protease assay methods**. In: BEYNON, R.; BOND, J.S. (Ed.), Proteolytic enzymes: a practical approach, Oxford University Press, New York, NY. 2001. pp. 45-76.

SCHNEIDER, H.P.; LANDSMAN, A. Preclinical and clinical studies of hyaluronic acid in wound care: A case series and literature review. Wounds, v.31, n.2, p.41-48, 2019.

SHIKSHARTHI, A.R.; MITTAL, S. *Ficus racemosa*: Phytochemistry, traditional uses and pharmacological properties: a review. *Int J Recent Adv Pharm Res*, v.4, p.6–15, 2011.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*., v.341, n.10, p. 738-746, 1999. doi: 10.1056/NEJM199909023411006.

UDOD, V.; STOROZHUK, V. Treatment of suppurative diseases of soft tissues with proteolytic enzyme, papain. *Klin Khir*, v.1, p.37–38, 1979.

ULHOA, C.J.; PEBERDY, J.F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enz Microbial Technol*, v.14, n.3, p.236-240, 1992.

URS, A. P. et al. Plant Latex Proteases: Natural Wound Healers. *In Proteases in Physiology and Pathology*, pp. 297-323, 2017.

USOLTSEVA, R.V. et al. Laminarans and 1,3-β-D-glucanases. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.15, n.163, p.1010-1025, 2020. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.034.

WITTENAUER, J. et al. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*, v.101, p.179-187, 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese avaliamos uma opção de tratamento alternativo para a cicatrização de feridas: a fração soro do látex de *Hancornia speciosa*, a qual demonstrou ter potencial regenerativo em feridas de rato. Além disso, descrevemos a atividade de algumas enzimas e seus possíveis efeitos sobre o processo cicatricial.

No capítulo I, mostramos que existe uma ampla variedade de tecnologias que têm sido utilizadas para o manejo e tratamento de feridas, dentre as quais, se destacam a terapia de feridas por pressão negativa (NPWT), a qual é capaz de modular a resposta inflamatória, reduzir a umidade e estimular a proliferação celular na lesão. Também foram amplamente empregadas as terapias com células e com tecidos da bioengenharia, as quais apresentaram efeitos anti-inflamatórios, estímulo da proliferação celular, produção de colágeno e do tecido de granulação. Frente a esses efeitos, essas tecnologias se demonstraram capazes de atuar sobre todas as fases da cicatrização de feridas, acelerando esse processo ou reduzindo consideravelmente a área da ferida. Entretanto, o alto custo e baixa disponibilidade desses tipos de terapias avançadas, torna o seu uso limitado e faz com que recursos naturais, como as plantas, sejam alvos de pesquisas atualmente. Neste estudo, foram encontradas espécies de plantas que apresentaram efeito antioxidante, anti-inflamatório, angiogênico e hipoglicêmico, além de estimularem a produção de colágeno, a proliferação de diferentes células e a regulação da expressão de genes, favorecendo assim uma cicatrização mais rápida de feridas difíceis de curar.

No capítulo II, exploramos o grande potencial das plantas como recurso para a área de tratamentos de feridas. Desta forma, utilizados o soro do látex de *H. speciosa* incorporado em um gel-creme para cicatrizar feridas excisionais no dorso de ratos. Diferentes concentrações de látex foram avaliadas, entretanto, demonstramos que na concentração de 15% o soro possui a capacidade de estimular as células inflamatórias e à angiogênese na fase inicial do processo de cicatrização (inflamatória), além de aumentar a produção de colágeno no tecido nesta etapa, o que interfere na força tênsil no local da ferida e ajuda na contração da ferida. Esses achados, configura o látex como um biomaterial promissor para a área de regeneração de feridas cutâneas.

Por fim, no capítulo III, apresentamos uma relação entre a atividade angiogênica do soro do látex de *H. speciosa* e as proteínas presentes nesse látex. Desta forma, ao inativarmos as proteínas do soro do látex, mostramos que o esse material perde seu potencial angiogênico sobre

as membranas corioalantóides de ovo embrionado de galinha. Além disso, em nossos ensaios referentes ao conteúdo proteico desse látex, mostramos que ele possui um baixo teor de proteínas totais, sendo menor que várias outras espécies de lactíferas, o que pode indicar que este é um promissor material hipoalergênico. Também relatamos a atividade enzimática do soro, onde 3 enzimas mostraram atividade: β-1,3-glucanase, β glucosidase e proteases. Essas enzimas parecem influenciar o processo de cicatrização, auxiliando no desbridamento, na remodelação da matriz extracelular e na deposição de colágeno, diminuindo as chances de contaminação por microrganismos. Esse conjunto de dados, revela que as proteínas presentes na fração soro do látex de H. speciosa possuem atividade angiogênica e podem ser benéficas para o desenvolvimento de materiais terapêuticos para cicatrização de feridas e regeneração de tecidos.

Muitas vezes as modalidades de tratamento padrão não são suficientes para a cura de feridas difíceis de cicatrizar e necessitam de terapias complementares. É importante que essas terapias sejam acessíveis e de baixo custo. Por isso, o uso de recursos naturais como as plantas representa uma alternativa promissora para a cicatrização de feridas. Este trabalho, apresentou uma planta que possui potencial terapêutico para ser investigada e possivelmente utilizada futuramente como indutora de regeneração tecidual. O látex de *H. speciosa* tem se demonstrado capaz de interferir no processo de cicatrização e de auxiliar nas fases da cura, contribuindo assim com a regeneração de tecidos lesionados.

ANEXO I: **PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PUC/GO**

PUC GOIÁS

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do processo cicatricial utilizando gel-creme à base de látex de Hancornia speciosa de feridas de espessura total em ratos ", protocolada sob o CEUA nº 1630230718, sob a responsabilidade de **Luciane Madureira de Almeida** *e equipe; Patrícia Lima D'Abadia; Paulo Roberto de Melo Reis; Ruy de Souza Lino Junior; Sandra Pereira Duarte* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CEUA/PUC GOIAS) na reunião de 28/09/2018.

We certify that the proposal "Assessment of wound healing process using gel cream composed by Hancornia speciosa latex in total in rats", utilizing 96 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 1630230718, under the responsibility of **Luciane Madureira de Almeida** *and team; Patrícia Lima D'Abadia; Paulo Roberto de Melo Reis; Ruy de Souza Lino Junior; Sandra Pereira Duarte* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Pontifical Catholic University of Goiás (CEUA/PUC GOIAS) in the meeting of 09/28/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 09/2018 a 12/2019 Área: Ciências Ambientais E Saúde

Origem:	Biotério central						
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	2 a 3 meses	N:	96
Linhagem:	Rattus novergicus albinus			Peso:	200 a 300 g		

Resumo: A cicatrização de tecidos é um evento sistêmico e dinâmico, que ocorre em todo tipo de ferida e se inicia imediatamente após a ocorrência da lesão. O desenvolvimento de fármacos para tratamento de feridas na pele é de grande interesse na comunidade científica, principalmente pelo fato da pele representar um órgão vital do ser humano, que além de ser o maior órgão do corpo, em termos de área e superfície, a pele mantém contato direto com o meio externo. Uma vez lesada a pele exigirá um complexo mecanismo de funções celulares que agem em sincronia para a reparação da lesão visando o restabelecimento da pele. Neste sentido, tem-se realizados pesquisas a cerca do desenvolvimento de novas tecnologias capazes de acelerar o processo cicatricial e de reduzir possíveis complicações. A mangabeira (Hancornia speciosa), planta nativa do Cerrado e pouco explorada comercialmente, pode ser uma alternativa para extração de látex para utilização na área de regeneração tecidual. Dentre as vantagens do uso da mangabeira, destaca-se a biocompatibilidade e não toxicidade do seu látex, além de seu comprovado potencial angiogênico e possibilidade de esta planta produzir um látex hipoalergênico. Assim sendo, o presente estudo tem como objetivo descrever e comparar o processo cicatricial de feridas de espessura total de ratos submetidos aos tratamentos com gel-creme à base de látex de H. speciosa e Regederm®. Identificar os aspectos morfométricos, anatomopatológicos e comparação do processo de cicatrização de feridas induzidos no dorso de ratos.

Local do experimento: Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos - LEB - Área V - PUCGoiás. Rua 232, Nº 128 Setor Universitário Área V 3º andar, sala 5 (Próximo a Praça Botafogo) CEP 74605-140, Goiânia GO.

Goiânia, 17 de janeiro de 2019

Marta Regina Magalhães

Profa. Dra. Marta Regina Magalhães
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Profa. Dra. Graziela Torres Blanch
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Avenida Universitária, 1.069 - Setor Universitário, Goiânia/Goiás, CEP 74605-010 - tel: 55 (62) 3946-1070 / fax: 55 (62) 3946-1070
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8h às 12h e das 13h ás 17h : e-mail: ceua.go@pucgoias.edu.br
CEUA N 1630230718

ANEXO II: **PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UEG**

PRP Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação — Universidade Estadual de Goiás — ESTADO DE GOIÁS

Anápolis, 08 de outubro de 2018.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO Nº. 005/2018

I - Identificação:
1. Título do projeto: Avaliação do potencial angiogênico das proteínas presentes na fração soro do látex de *Hancornia speciosa*
2. Pesquisador Responsável: Luciane Madureira de Almeida
3. Unidade/Órgão do pesquisador: Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique
4. Pesquisadores Participantes: Patrícia Lima D'Abadia Myllena Tolentino Firmino
5. Unidade onde será realizado o projeto: Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique
6. Data de apresentação a CEUA: **02/10/2018**
7. Data de Atendimento das Pendências: 08/10/2018
II - Parecer da CEUA:
Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Estadual de Goiás, após análise das adequações solicitadas, considerou **APROVADO,** o projeto acima referido, o qual foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes, smj dessa Comissão. O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UEG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) após sua conclusão. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PrP-UEG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para **conclusão em 01/12/2019.**
VI - Data da reunião:
Reunião realizada no dia: 08/10/2018
Prof. Dr. Walter Dias Júnior Coordenador da CEUA/UEG