

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELUSCA HELENA MUNIZ

**EFEITO DE FRAÇÕES DE POLIFENÓIS DE *Annona crassiflora* Mart. E  
NANOCOMPÓSITO DE ZnO7Ag, SOBRE O FECHAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS  
E ANGIOGÊNESE.**

UBERLÂNDIA  
2019

ELUSCA HELENA MUNIZ

**EFEITO DE FRAÇÕES DE POLIFENÓIS DE *Annona crassiflora* Mart. E  
NANOCOMPÓSITO DE ZnO7Ag, SOBRE O FECHAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS  
E ANGIOGÊNESE.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência para obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Carla Tomiosso

Coorientadora: Msc. Francielle Borges R. de Moura

UBERLÂNDIA

2019

ELUSCA HELENA MUNIZ

**EFEITO DE FRAÇÕES DE POLIFENÓIS DE *Annona crassiflora* Mart. E  
NANOCOMPÓSITO DE ZnO7Ag, SOBRE O FECHAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS  
E ANGIOGÊNESE.**

Trabalho de conclusão de curso aprovado para a  
obtenção do grau de Licenciatura em Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia  
(MG) pela banca examinadora formada por:

Uberlândia – MG, 6 de dezembro de 2019

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana Carla Tomiosso - ICBIM/UFU

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Bellisa de Freitas Barbosa - ICBIM/UFU

---

Msc. Bruno Antonio Ferreira - ICBIM/UFU

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitária, mas em todos os momentos.

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana Carla Tomiosso, pela orientação, apoio, confiança, paciência, carinho e amizade. A minha coorientadora, Prof.<sup>a</sup> Msc. Francielle Borges Rosa de Moura, pelo suporte, pelo paciente trabalho de ensino na parte experimental e revisão textual.

Agradeço aos meus pais Sebastião Inácio Muniz e Tereza Franco Muniz, meus heróis, que com amor incondicional me fortaleceram e incentivaram. Meu eterno agradecimento a minha tia Cida (*in memoriam*), pois sem seu apoio ao cuidar dos meus filhos, com muito amor, esse momento não seria possível. Aos meus preciosos filhos Helamã e Rebeca, meus melhores e maiores presentes, por compreenderem os momentos em que estive ausente. Ao meu marido Héverton, que ao longo desses anos me deu força para vencer essa etapa da vida acadêmica. A meus irmãos Loredana, Stfana, Cristian e Lorrán, obrigada pela contribuição valiosa. E a meus sobrinhos pelo amor e apoio.

A meus parceiros de laboratório, José Augusto e Rinara, que com muitas risadas me ajudaram a superar os desafios que surgiram na minha caminhada, esse TCC também é de vocês. E ao Msc. Bruno Antonio Ferreira pelas boas discussões no grupo de estudos.

Aos meus amigos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, muito obrigada.

A todos os professores por me proporcionarem o conhecimento e serem bons exemplos como profissionais, em especial a Prof.<sup>a</sup> Dra. Eloísa, a Prof.<sup>a</sup> Dra. Belissa, a Prof.<sup>a</sup> Dra. Ariádine e a Prof.<sup>a</sup> Dra. Vanessa Stefani. Agradeço também a Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade de fazer o curso e a DIASE/PROAE pela assistência estudantil.

Aos professores Dr. Foued, Dr. Noélio, Dra. Anieli e Dra. Fernanda, pela contribuição com este trabalho. E aos órgãos de fomento CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro e pelas bolsas de iniciação científica.

Muito Obrigada!

## RESUMO

Entre as possíveis tecnologias recentemente pesquisadas que podem ser aplicadas no tratamento de feridas, citam-se os nanomateriais. Além disso, pesquisas utilizando compostos vegetais, devido apresentarem um conteúdo polifenóis, são promissoras. Desta forma, este estudo avaliou o efeito cicatrizante do uso tópico de frações de polifenóis da casca do fruto araticum e nanocompósito de óxido de zinco e prata (ZnO7Ag). A formulação foi incorporada ao veículo (lanolina e vaselina) e utilizadas no tratamento diário em feridas induzidas em camundongos Balb/C. Foram avaliados cinco grupos, sendo o controle sem tratamento (CO s/trat.), animais foram feridos e não tratados, o controle veículo (CO/vei.), animais foram feridos e tratados com o veículo, o tratado com frações de polifenóis da casca do araticum (ART), o tratado com o nanocompósito (ZnO7Ag) e o tratado com polifenóis associados ao nanocompósito (ART + ZnO7Ag). O fechamento das feridas foi aferido com paquímetro digital e avaliado nos tempos 3, 7, 14 e 21 dias de tratamento. A angiogênese foi avaliada pela contagem de vasos sanguíneos em fotomicrografias coradas com tricrômico de Gomori, nos tempos 3, 7, 14, 21 dias. Após 7 dias de tratamento, ZnO7Ag demonstrou melhores resultados para o fechamento de feridas, além disso, a contração da ferida continuou aumentada após 14 e 21 dias, sendo este o melhor tratamento eficaz na contração da ferida. Após 7 dias de tratamento, ART + ZnO7Ag apresentaram maior atividade angiogênica e sendo novamente aumentada após 14 dias, demonstrando ser o tratamento mais eficaz no aumento de vasos sanguíneos na lesão. Conclui-se que o tratamento com ZnO7Ag conduziu uma otimização do reparo de feridas, demonstrando melhora no tempo requerido para o fechamento. E frações enriquecidas de polifenóis de *Annona crassiflora* Mart. associadas com o nanocompósito (ART+ZnO7Ag) influenciaram no aumento da angiogênese, o que contribui para disponibilidade de nutrientes e oxigênio.

Palavras-chave: Feridas. Colágeno. Araticum. Nanopartículas

## **ABSTRACT**

*Among the possible recently researched technologies that can be applied in wound care are nanomaterials. Moreover, research using plant compounds, due to their polyphenol content, is promising. Thus, this study evaluated the healing effect of topical use of polyphenol fractions of the araticum and zinc oxide (ZnO7Ag) nanocomposite. The formulation was incorporated into the vehicle (lanolin and vaseline) and used for daily treatment in induced wounds in Balb / C mice. Five groups were evaluated: untreated control (CO s/trat.), Injured animals and not treated, vehicle control (CO / vei.), Injured animals and treated with the vehicle only, treated with fractions of araticum bark polyphenols (ART), treated with nanocomposite (ZnO7Ag) and treated with nanocomposite polyphenols (ART + ZnO7Ag). The closure of the wounds was measured with a digital caliper and evaluated at times 0, 3, 7, 14 days of treatment. Angiogenesis was evaluated by blood vessel count in Gomori-stained photomicrographs at times 3, 7, 14, 21 days. After 7 days of treatment, ZnO7Ag demonstrated the best results for wound closure, and wound contraction continued to increase after 14 and 21 days, which is the best effective wound contraction treatment. After 7 days of treatment, ART + ZnO7Ag showed higher angiogenic activity and was increased again after 14 days, proving to be the most effective treatment in increasing blood vessels in the lesion. It was concluded that treatment with ZnO7Ag led to the optimization of wound repair, demonstrating an improvement in the time required for closure. And polyphenol enriched fractions of *Annona crassiflora* Mart. associated with nanocomposite (ART + ZnO7Ag) influenced the increase of angiogenesis, which contributes to nutrient and oxygen availability.*

*Keywords: Wounds. Collagen. Araticum. Nanoparticles.*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>2</b>
2.1 Histologia da pele .....	2
2.2 Reparo de feridas .....	3
2.3 Nanopartículas .....	5
2.4 <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	6
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
3.1 Objetivo geral.....	7
3.2 Objetivos específicos.....	8
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
4.1 Nanocompósito .....	7
4.2 Coleta do material.....	8
4.3 Obtenção do extrato etanólico .....	8
4.4 Partição líquido-líquido do extrato etanólico .....	8
4.5 Animais.....	9
4.6 Obtenção da pomada, indução da ferida e tratamento.....	9
4.7 Avaliação da contração da ferida.....	10
4.8 Avaliação histológica .....	11
4.9 Análise estatística .....	11
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>12</b>
5.1 Fechamento de feridas .....	12
5.2 Angiogênese .....	13
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>18</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>25</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Diante da importância em minimizar impactos na saúde, novas abordagens terapêuticas para otimizar o reparo de feridas cutâneas são sempre bem-vindas. Uma das inovações para este tipo de tratamento está na utilização de nanomateriais (GUNALAN; SIVARAJ; RAJENDRAN; 2012). Entre os nanomateriais, as nanopartículas (NPs) possuem propriedades multifuncionais podendo ser aplicadas em diversos campos, como na medicina e nutrição (CHANDRAN et al., 2006). No processo de reparo tecidual, nanopartículas de óxido de zinco (NPsZnO) dopadas com nanopartículas de prata (NPsAg), demonstraram atividade cicatrizante (KANTIPUDI et al., 2018).

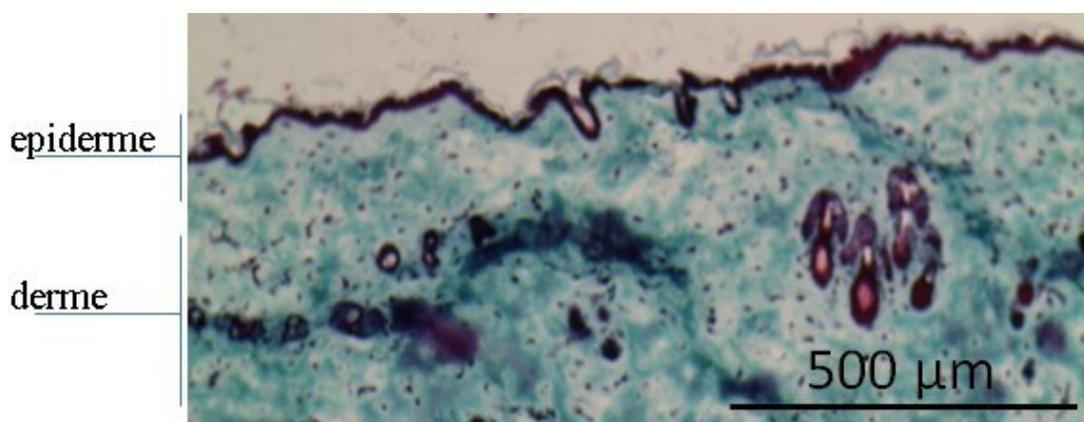
O tratamento de feridas despende de enormes gastos com cuidados de saúde, valores que atingem o custo total estimado em mais de US \$ 3 bilhões por ano (MATHIEU et al., 2006; MENKE et al., 2007). Diversas pesquisas utilizando compostos vegetais são realizadas por apresentar baixo custo, beneficemente existem poucos relatos de hipersensibilidade e efeitos colaterais. Além disso, no Brasil, encontra-se uma vasta biodiversidade da flora, assim os produtos naturais são acessíveis à população (LEACH, 2004; RAINA et al., 2008). Posto isto, agentes fitoterapêuticos têm sido amplamente utilizados em tratamentos para melhorar o processo de reparo de feridas cutâneas (PAZYAR et al., 2014).

Um estudo anterior realizado por nosso grupo de trabalho avaliou diferentes concentrações (2%, 4% e 6%) das frações de n-butanol e acetato de etila, presentes na casca de frutos de *Annona crassiflora* Mart. em que a concentração contendo 4% destas partições demonstrou maior eficiência na cicatrização. Este tratamento, foi capaz de acelerar o processo de fechamento da ferida em 4 e 7 dias de tratamento. No quarto dia de tratamento, a concentração de 4%, promoveu a redução de células associadas ao processo inflamatório. No sétimo dia, houve também aumento na síntese de colágeno total depositado sobre a matriz, assim como o aumento de colágenos dos tipos I e III no grupo tratado com 4% destas frações (MOURA et al, 2018). Sendo assim, diante da concentração previamente estabelecida, de 4% das frações, sendo 2% de n-butanol e 2% de acetato de etila, se faz necessário prosseguir em busca de novas formulações, a partir da adição de um nanocompósito de nanopartículas de óxido de zinco dopado com prata (ZnO7Ag), que poderão conduzir a um reparo de feridas ainda mais promissor.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Histologia da pele

A pele é constituída por duas camadas de tecido, sendo histologicamente dividida em epiderme e derme (figura 1) (LUCAS, 2004). A epiderme é a camada mais externa (REHDER et al., 2004; SOUTO et al., 2006), sendo avascular, e por isso é mantida pelos nutrientes provenientes dos capilares da derme (HARRIS, 2009; PEYREFITTE, 1998). Na derme encontram-se inseridos vasos sanguíneos, linfáticos, fibras proteicas, glândulas, folículos pilosos, músculos eretores do pêlo, nervos e órgãos sensoriais associados (BANKS, 1991). A principal linhagem celular na derme são os fibroblastos, que podem se diferenciar em fibrócitos ou miofibroblastos. Estes últimos são tipos celulares que atuam principalmente no processo de contração da ferida (FOSSUM, 2005). A derme, camada subsequente à epiderme, é dividida estruturalmente em duas camadas: a camada papilar e a camada reticular. A camada papilar é rica em tecido conjuntivo frouxo e fibroblastos, constituída por colágeno tipo III e vasos sanguíneos de menor espessura e calibre. Enquanto a camada reticular caracteriza-se por predomínio de feixes dérmicos constituídos por colágeno tipo I e permeados por colágeno tipo III e vasos sanguíneos calibrosos (FREEDBERG et al., 2005; SOUSA; VARGAS, 2004).



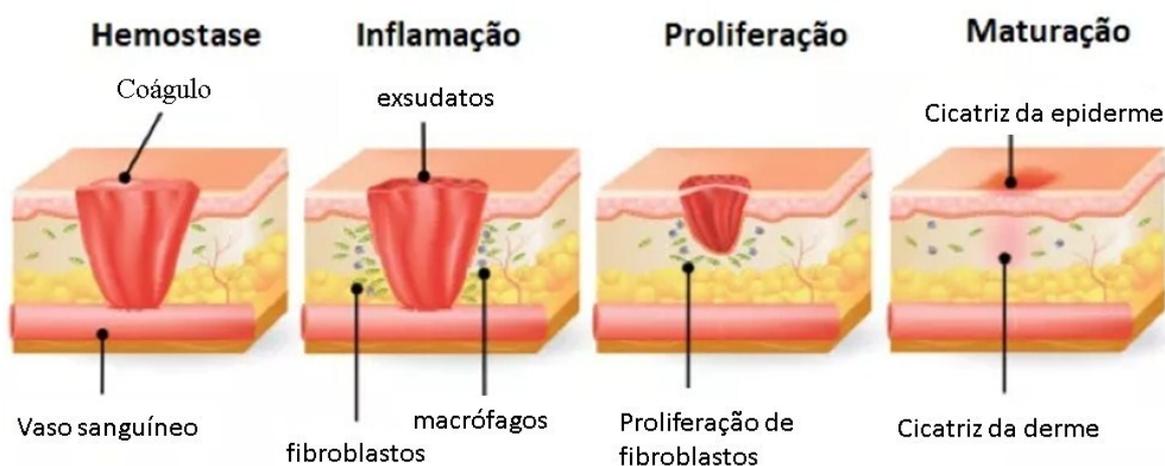
**Figura 1** - Fotomicrografia de pele saudável de camundongos Balb/c corada em Tricômico de Gomori.

**Fonte:** Autor (2019)

### 2.2 Reparo de feridas

A maior interação entre o corpo e o ambiente externo é por meio da pele, dessa maneira ela está exposta a possíveis lesões (MACLEOD; HAVRAN, 2011). As feridas cutâneas estão entre os principais problemas clínicos mundiais, entre suas consequências

estão à morbidade devido à cronicidade destas injúrias, com períodos prolongados de reparação e regeneração do tecido lesado, sangramento, risco de infecções, septicemias, queloides e cicatriz hipertrófica (ROY, 2009). O processo de cicatrização de feridas ocorre em quatro etapas em sobreposição, são elas: hemostasia, inflamatória, proliferativa, e remodelamento/maturação (**figura 2**) (GUO; DIPIETRO, 2010; ROY, 2009; SHAH et al. 2012).



**Figura 2** – Representação das etapas do processo de cicatrização, sendo hemostase, inflamação, proliferação e maturação

**Fonte:** Adaptado de Inova News Room (2017).

Assim que acontece um dano tecidual inicia-se a hemostasia, que é um processo que envolve a vasoconstrição e a adesão, agregação e ativação plaquetária (SHAH *et al.*, 2012; WU; CHEN, 2014). Sendo esta fase dependente da cascata de coagulação. Após a lesão, as alterações nas células endoteliais, a ruptura de vasos sanguíneos e o extravasamento de seus constituintes estimulam compostos vasoativos a promoverem uma vasoconstrição imediata, visando diminuir a perda sanguínea para o espaço extravascular (KUMAR et al. 2015).

A etapa inflamatória apresenta sinais cardinais da inflamação sendo eles vermelhidão, calor, edema, e dor ao redor do local ferido (BUSTI et al. 2005). Nesta etapa acontece o aumento na permeabilidade das paredes vasculares, levando ao extravasamento de plasma para a área da lesão, além de ocorrer uma vasodilatação aumentando o fluxo sanguíneo para o local da ferida (SINNO; PRAKASH, 2013; ROBSON, 2003; KOH; DIPIETRO, 2011). Os neutrófilos e monócitos / macrófagos são células importantes nesta fase, atuando na assepsia da ferida e também como mediadores de citocinas e fatores de crescimento que são

necessários para as próximas etapas (GUO; DIPIETRO, 2010; GURTNER et al., 2008; LUCAS et al., 2010; WU; CHEN, 2014).

A etapa proliferativa é composta pela síntese de matriz extracelular (MEC), re-epitelialização e angiogênese. Células importantes desta etapa são os fibroblastos (GUO; DIPIETRO; 2010) que após migrarem para o local lesionado, sintetizam a matriz extracelular, dando origem ao chamado -tecido de granulação (NOWAK; OLEJEK, 2004). O tecido de granulação é formado por colágeno, elastina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos principalmente por fibroblastos (KO'ZMA et al., 1998; TOMASEK et al., 2002). A re-epitelização reestrutura as funções da epiderme que foram perdidas em decorrência da lesão (KIERZENBAUM, 2004). Sendo a angiogênese o processo de migração e proliferação celular endotelial de vasos sanguíneos preexistentes formando novos vasos (BECK; A DAMORE, 1997). Esta nova rede capilar proporciona a síntese do tecido de granulação favorecendo suprimento local de oxigênio, nutrientes e possibilitando a chegada de novas células (LAUREANO; RODRIGUES, 2011). A angiogênese é estimulada por fatores locais, como a baixa tensão de oxigênio, baixo pH, ou concentração elevada de ácido láctico (GURTNER al., 2008; TONNESEN; FENG; CLARK, 2000). Mediadores solúveis, tais como fatores de crescimento fibroblásticos beta (FGF- $\beta$ ), fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), angiogenina, angiotropina, secretados por células epiteliais, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos demonstram uma forte atividade pró-angiogênica (BUSTI et al., 2005). Estas citocinas ativam as células endoteliais, induzem a expressão do ativador de plasminogênio, resultando na clivagem do plasminogênio sérico e da pró-colagenase em, respectivamente, plasmina, com ação fibrinolítica, e colagenase (MMP-1), que degrada colágeno. O que ocasiona a degradação local da membrana basal circundante e inicia a proliferação do endotélio em uma estrutura tubular. Essa migração ocorre através da interação entre as integrinas supra-reguladas e os componentes da matriz extracelular, principalmente a fibronectina e a laminina (ISAAC et al., 2010). A etapa da angiogênese tem o objetivo de restabelecer a circulação sanguínea no local lesionado para impedir o desenvolvimento de necrose isquêmica estimulando também, o processo de reparação tecidual (SINNO; PRAKASH, 2013).

A principal característica da etapa de remodelamento/maturação é a deposição de colágeno na ferida (WITTE, BARBUL, 1997). Estudos evidenciam que a síntese de colágeno pelos fibroblastos é consequência ao estímulo do TGF- $\beta$ , em decorrência da diferenciação dos miofibroblastos. Os miofibroblastos são a principal fonte de colágeno tipo I (MASSENO,

2010). No início da ferida, ao contrário da pele saudável, existe a maior proporção de colágeno tipo III em relação ao tipo I. Posto isto, acontece o alinhamento e a ligação dos miofibroblastos às fibras de colágeno de maiores espessuras, sendo esse mecanismo responsável pela contração da ferida (ISAAC et al., 2010). Conseqüentemente, quanto maior o número de fibras de grande diâmetro, maior será a contração dessa ferida. O remodelamento pode durar semanas ou meses, até que o infiltrado inflamatório reduza ou termine. O tecido de granulação matura com a redução dos capilares, que são agregados em maiores vasos sanguíneos, reduz o conteúdo de glicosaminoglicanos e proteoglicanos e o conteúdo de água associada a estes elementos. O colágeno reorganizado, do tipo III que é inicialmente depositado na matriz é agora substituído gradativamente pelo colágeno do tipo I, o que leva ao aumento da resistência e tração do tecido (DIEGELMANN; EVANS, 2004; HOFFMAN et al., 2006.). Então ao término dos fenômenos inflamatórios, a partir do tecido de granulação da etapa proliferativa, os fibroblastos são ativados a se diferenciar em miofibroblastos. Sendo assim a contração da ferida pode iniciar na etapa proliferativa (MASSENO, 2010; PRISTO, 2012). Desse modo medidas do fechamento de feridas são utilizadas como parâmetros para avaliar a velocidade da cicatrização (SEGUNDO, 2017).

### 2.3 Nanopartículas

Nanopartículas são partículas que possuem um tamanho entre 1 e 100 nanômetros, sendo classificadas de acordo com o seu diâmetro (MURTHY, 2007). Uma vez que a razão entre a área de superfície e volume das partículas aumenta à medida que o diâmetro diminui, as nanopartículas podem ser mais biorreativas do que os materiais que não se encontram na escala nanométrica, o que as tornam promissoras para diversas aplicações biotecnológicas (SMIJS; PAVEL, 2011). Nanocompósitos, por sua vez, são materiais híbridos constituídos pela associação de 2 ou mais compostos, sendo um deles obrigatoriamente de dimensões nanométricas (OLIVEIRA, 2005; PASSOS, 2011; ASSIS, 2012). A inclusão de compostos de escala nanométrica em protocolos para tratamento de feridas tem crescido. Algumas NPs são usadas devido às suas propriedades terapêuticas, enquanto que outras são utilizadas como carreadores de drogas e substâncias (OYARZUN-AMPUERO et al., 2015). Entre os efeitos benéficos sobre a cicatrização, destacam-se a sua atividade antibiótica, a possibilidade de liberação controlada de drogas e a regulação de citocinas pró-inflamatórias como Interleucina 1 beta (IL 1 $\beta$ ) e TNF $\alpha$  (OYARZUN-AMPUERO et al., 2015).

As NPsZnO são amplamente utilizadas na indústria farmacêutica (OYARZUN-AMPUERO et al., 2015; SMIJS; PAVEL, 2011), além disso apresentam atividade antibacteriana, cicatrizante (ATMACA; GUL ;CICEK,1998; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008), efeito no processo de re-epitelização, efeito anti-inflamatório e potencial em reduzir o crescimento bacteriano em úlceras (AGREN; 1990), com efeito, também sobre feridas crônicas, dermatite e bolhas na pele (ATMACA; GUL; CICEK, 1998; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008; RAJASHRI et al., 2011). Devido à presença de NPsZnO em curativos com hidrogel de quitosana, foi possível aumentar a velocidade na re-epitelização e na deposição de colágeno (SUDHEESH KUMAR et al., 2012).

A prata desde a idade antiga é usada como agente antimicrobiano, assim a partir do século XVII começou a ser utilizada no tratamento de feridas. O interesse do uso da prata como cicatrizante ressurgiu nas últimas décadas (FONG, WOOD, 2006). Sendo as nanopartículas de prata conhecidas há mais de 120 anos. Em 1928, anterior à penicilina, as NPsAg eram aplicadas no tratamento de doenças e infecções. O uso da prata em escala nanométrica propiciou o aumento da eficácia no controle de vírus e bactérias. Isto devido a grande área superficial das nanopartículas, proporcionando maior contato com os microrganismos (VARNER, 2010). A eficácia dos curativos contendo NPsAg tem sido amplamente testada *in vitro* e possui um número limitado de testes *in vivo*, com tudo as pesquisas apoiam a segurança do uso de curativos baseados na nanopartícula (CHALOUPKA et al., 2010; RIGO et al., 2013; WILKINSON et al., 2011). Ainda assim, nanocompósitos de NPsZnO dopados com NPsAg otimizaram a atividade cicatrizante ao comparar com NPsAg pura (KANTIPUDI et al., 2018).

#### 2.4 *Annona crassiflora* Mart.

A espécie arbórea *Annona crassiflora* Mart., é popularmente conhecida como araticum, marolo, pinha-do-cerrado, coração-de-boi e bruto. É um fruto do Cerrado brasileiro da família Annonaceae (AVIDOS, 2000; SOARES, 2009). No qual apresenta alto teor de polifenóis com a capacidade antioxidante, atividade importante para o controle do reparo tecidual. As cascas de frutos que são usualmente descartadas possuem uma riqueza de polifenóis que excedem os valores encontrados para outras partes, como nas polpas e sementes de frutos (BENITES et al., 2015; GUO et al., 2003; ROESLER et al., 2007a). Entre as funções farmacológicas descritas para estes compostos, sabe-se que a catequina apresenta efeito na cicatrização (FITZMAURICE; SIVAMANI; ISSEROFF, 2011) enquanto a rutina é

amplamente difundida por sua atividade anti-inflamatória (GUARDIA et al., 2001). Frações n-butanol e acetato de etila obtidas a partir da casca do fruto do araticum apresentaram uma quantidade elevada de compostos fenólicos (JUSTINO, 2016). Desse modo, a casca de *A. crassiflora* demonstrou potencial anti-inflamatório e pró-fibrogênico no tratamento de feridas cutâneas no grupo tratado com a concentração 4% de n-butanol e acetato de etila, sendo 2% de cada fração. Este tratamento acelerou o fechamento da ferida e promoveu a redução de células associadas ao processo inflamatório (MOURA et al, 2018). Sendo assim, esse estudo busca de novas formulações contendo estes polifenóis e um nanocompósito de nanopartículas de óxido de zinco dopado com prata (ZnO7Ag), que poderão conduzir a um fechamento de feridas e angiogênese promissores.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de frações enriquecidas de polifenóis da casca do fruto de *A. crassiflora* Mart. e de um nanocompósito de nanopartículas de óxido de zinco dopada com prata (ZnO7Ag) sobre fechamento de feridas cutâneas e angiogênese em camundongos da linhagem BALB/C.

#### 3.2 Objetivos específicos

-Avaliar o processo de fechamento da ferida após 3,7,14 e 21 dias de tratamento com frações enriquecidas em polifenóis, n-butanol e acetado de etila, de *Annona crassiflora* Mart. e ZnO7Ag;

-Analisar o papel dos tratamentos na quantificação de vasos sanguíneos (angiogênese).

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 Nanocompósito

O nanocompósito (ZnO7Ag) foi sintetizado e caracterizado no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores do Instituto de Física- UFU Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil.

## 4.2 Coleta do material

As cascas do fruto *Annona crassiflora* Mart. foram coletadas nos recursos naturais do Bioma Cerrado na região norte do estado de Minas Gerais, por um comerciante de polpas de frutos nativos do Cerrado, localizado no município de Presidente Olegário, Minas Gerais. A autorização para a obtenção deste material foi cedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, nº 010743/2015-4. Os frutos foram identificados por André Vito Scatigna do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia – MG. Após a identificação, uma amostra da espécie foi depositada no Herbarium Uberlandense sob número de registro (HUFU68467).

## 4.3 Obtenção do extrato etanólico

As cascas dos frutos de *Annona crassiflora* Mart. foram conduzidas ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, local no qual foram armazenadas congeladas e realizada a produção do extrato. Para a obtenção do extrato etanólico da casca do fruto do araticum, 1,0 Kg de cascas do fruto foram secas em estufa a 50° C por 24 horas. Posteriormente, foram homogeneizadas na proporção de 1,0 kg de cascas e 5,0 L de etanol 98%. As cascas e o solvente foram triturados em um liquidificador industrial e mantidos, por maceração durante 6 dias. Após esse período, a solução foi filtrada e o solvente removido em um evaporador rotativo (Bunchi Rotavapor R- 210, Switzerland) sob pressão reduzida a 40° C. O extrato retirado do evaporador rotativo posteriormente foi liofilizado para a remoção total dos resíduos de água. O resíduo sólido obtido após a filtração novamente foi submetido à extração com álcool 98% até a exaustão da extração. Em seguida, o extrato etanólico ficou armazenado a -20° C.

## 4.4 Partição líquido-líquido do extrato etanólico

A partir da produção do extrato etanólico, foram obtidas as partições através de um procedimento de fases líquido-líquido. Cerca de 20 g do extrato etanólico da casca do

araticum foi solubilizado em 200,0 mL de solução metanol: água (9:1). Um funil de separação foi utilizado para a separação líquido-líquido a partir de solventes de polaridade crescente: acetato de etila e n-butanol. Este processo foi realizado quatro vezes. Após a obtenção das frações líquidas, os solventes foram removidos por rotaevaporação sob pressão reduzida a 40° C; as frações foram congeladas e em seguida, armazenadas a -20° C.

#### 4.5 Animais

Após a aprovação do Comitê de Ética Animal sob o número CEUA/UFU-44/2017 (anexo), 160 camundongos, machos, de 9 semanas, da linhagem Balb/C foram obtidos para a realização do experimento. Foram mantidos na Rede de Biotérios – UFU (REBIR-UFU) a uma temperatura constante (25° C) sob um ciclo de 12 horas claro/escuro com livre acesso a ração e água.

#### 4.6 Obtenção da pomada, indução da ferida e tratamento.

A partir do extrato etanólico da casca do araticum foram obtidas frações de acetato de etila e n-butanol, denominadas de frações enriquecidas de polifenóis. A concentração previamente estabelecida foi de 2% de cada fração, totalizando 4% das frações enriquecidas de polifenóis. No qual foram pulverizadas em pistilo até a obtenção de um pó. A quantidade de veículo, ou seja, pasta base de lanovaselina foi preparada com 30% de vaselina e 70% de lanolina. As frações e o nanocompósito de ZnO7Ag, previamente pulverizadas, foram incorporadas a pasta base com o auxílio de propileno. A concentração no nanocompósito foi de 1%. Os animais que foram feridos e tratados receberam por uso tópico, diariamente, 100mg da pomada.

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal de cetamina (90 mg / kg) e xilazina (10 mg / kg) e posteriormente foi tricotomizada a região dorsal dos animais. Em seguida, a assepsia no local a ser induzidas as feridas foi realizada com álcool 70%. O total de 4 incisões circulares foi feitas com o auxílio de um punch de 5 mm de diâmetro, retirando a pele até o aprofundamento da fáscia muscular (aproximadamente 0,2 mm). Em conseguinte, os animais ficaram separados randomicamente em 5 diferentes grupos conforme a tabela 1.

**Tabela 1** - Separação de grupos com as formas e os períodos de tratamento.

GRUPOS	TRATAMENTO	SUBGRUPOS (períodos de tratamento)
Grupo controle (CO S/ trat.) n:32	Animais feridos e não tratados	N:8: animais avaliados por 3 dias; N:8 animais avaliados por 7 dias; N:8 animais avaliados por 14 dias; N:8 animais avaliados por 21 dias.
Grupo controle com veículo (CO vei) n:32	Animais feridos e tratados com veículo (lanolina/vaselina)	N:8: animais tratados por 3 dias; N:8 animais tratados por 7 dias; N:8 animais tratados por 14 dias; N:8 animais tratados por 21 dias.
Grupo tratado com Araticum (ART) n: 32	Animais feridos e tratados com frações de polifenóis da casca do araticum e veículo	N:8: animais tratados por 3 dias; N:8 animais tratados por 7 dias; N:8 animais tratados por 14 dias; N:8 animais tratados por 21 dias.
Grupo tratado com nanocompósito (ZnO7Ag) n:32	Animais feridos e tratados com nanocompósito e veículo	N:8: animais tratados por 3 dias; N:8 animais tratados por 7 dias; N:8 animais tratados por 14 dias; N:8 animais tratados por 21 dias.
Grupo tratado com Araticum associado ao nanocompósito (ART + ZnO7Ag) n:32	Animais feridos e tratados com frações de polifenóis da casca do araticum associado ao nanocompósito e veículo	N:8: animais tratados por 3 dias; N:8 animais tratados por 7 dias; N:8 animais tratados por 14 dias; N:8 animais tratados por 21 dias.

#### 4.7 Avaliação da contração da ferida

O fechamento das feridas foi avaliado a partir da medida nos tempos 0, 3, 7, 14 e 21 dias com um paquímetro digital (**figura 5 D**). Após a obtenção da área da ferida, a porcentagem de fechamento da ferida foi obtida a partir da seguinte equação:

$$\text{Fechamento} = \frac{(\text{Tamanho inicial da ferida} - \text{tamanho da ferida dia específico}) \times 100}{\text{tamanho da ferida inicial}}$$

#### 4.8 Avaliação histológica

Após os tratamentos, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com 100mg/kg de Tiopental por via intraperitoneal. Subsequente, amostras de feridas submetidas ao tratamento foram retiradas com auxílio de um punch de 5 mm. Estas amostras foram imediatamente fixadas em Metacarn (metanol, ácido acético e clorofórmio) por no mínimo 3 horas em resfriamento. Após este período as amostras passaram pelos procedimentos de inclusão de rotina do Departamento de Histologia da UFU. Posteriormente foram obtidos cortes longitudinais com 5 $\mu$ m de espessura, em micrótomo rotativo (MICROM/HM-315). Para visualização de vasos no tecido os cortes foram corados com Tricômico de Gomori e quinze campos foram fotografados com a objetiva de 40X e quantificados posteriormente no programa Image J.

#### 4.9 Análise estatística

A estatística foi realizada através da média e desvio padrão, seguido pelo teste estatístico ANOVA pós-teste BONFERRONI, considerando  $p < 0,05$ . A avaliação estatística e os gráficos foram realizados no programa GraphPadPrism 6.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Fechamento de feridas

Todas as avaliações de contração da ferida foram comparadas com o grupo CO s/ trat. do respectivo tempo dos grupos tratados. O grupo ART. + ZnO7Ag apresentou uma porcentagem menor de fechamento após 3 dias e melhor fechamento após 14 dias de tratamento. Embora o grupo ZnO7Ag não tenha apresentado maior porcentagem de fechamento da ferida após 3 dias de tratamento, este foi melhor nos períodos posteriores, ao avaliar o fechamento após 7, 14 e 21 dias de tratamento. O grupo ART demonstrou melhora no fechamento de feridas em dois períodos, após 7 e 21 dias de tratamento. O grupo CO vei apresentou melhora no fechamento da ferida somente após 21 dias (**figura 6 e 7**).

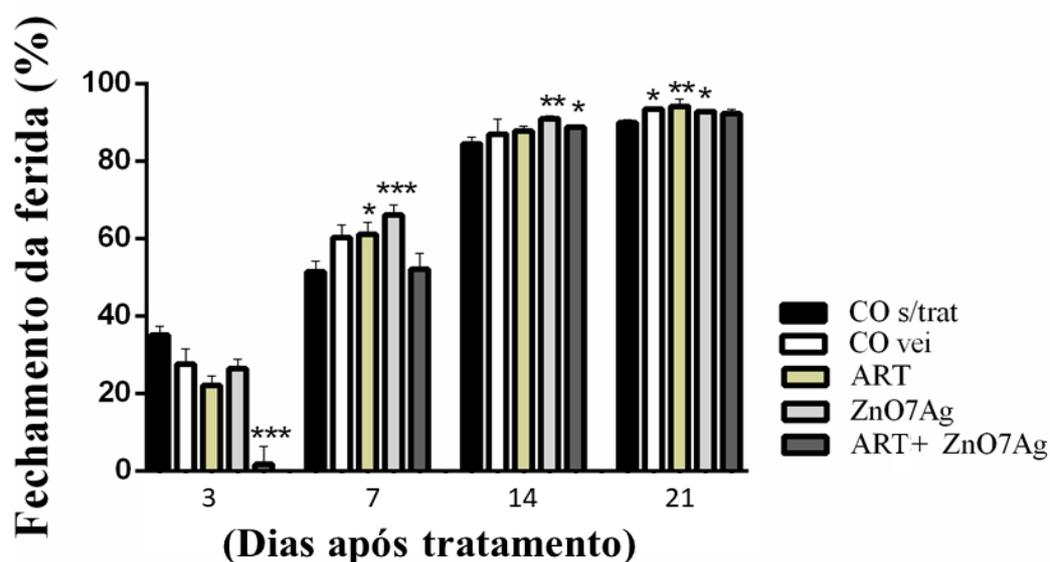
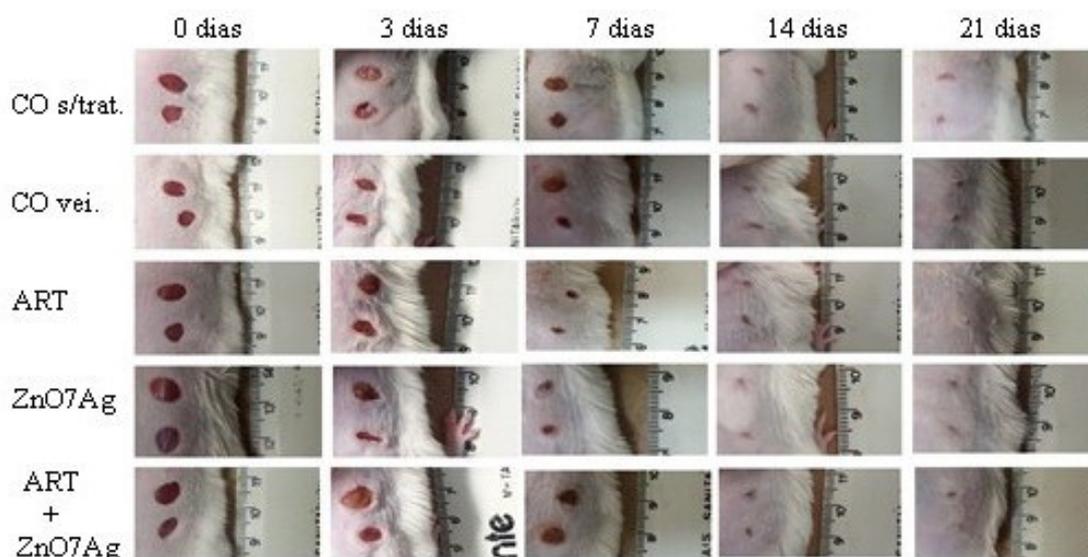


Figura 6 - Fechamento de feridas (%) após os tempos 3, 7, 14 e 21 dias de tratamento. \* indicam diferença estatística em relação ao grupo CO s/ trat. considerando  $p \leq 0,05$ .

Fonte: O autor (2019).

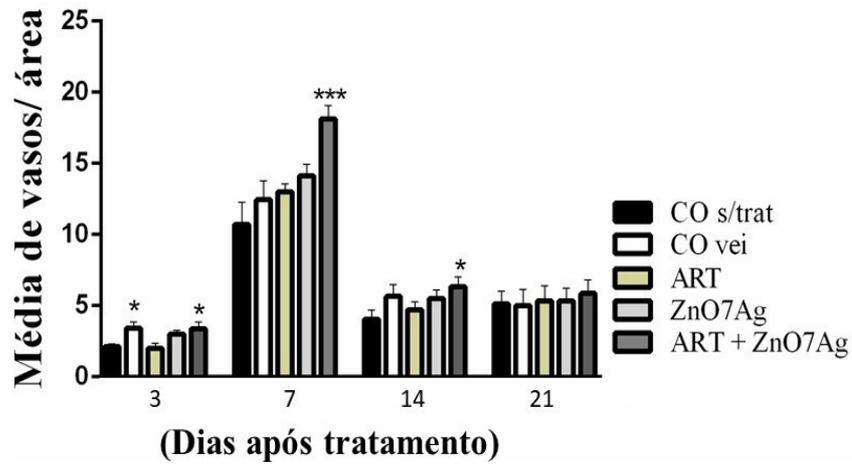


**Figura 7** - Imagens do fechamento das feridas em cada grupo: CO s/trat., CO vei., ART, ZnO7Ag e ART + ZnO7Ag no dia da indução da ferida e após 0, 3, 7, 14 e 21 dias de tratamento.

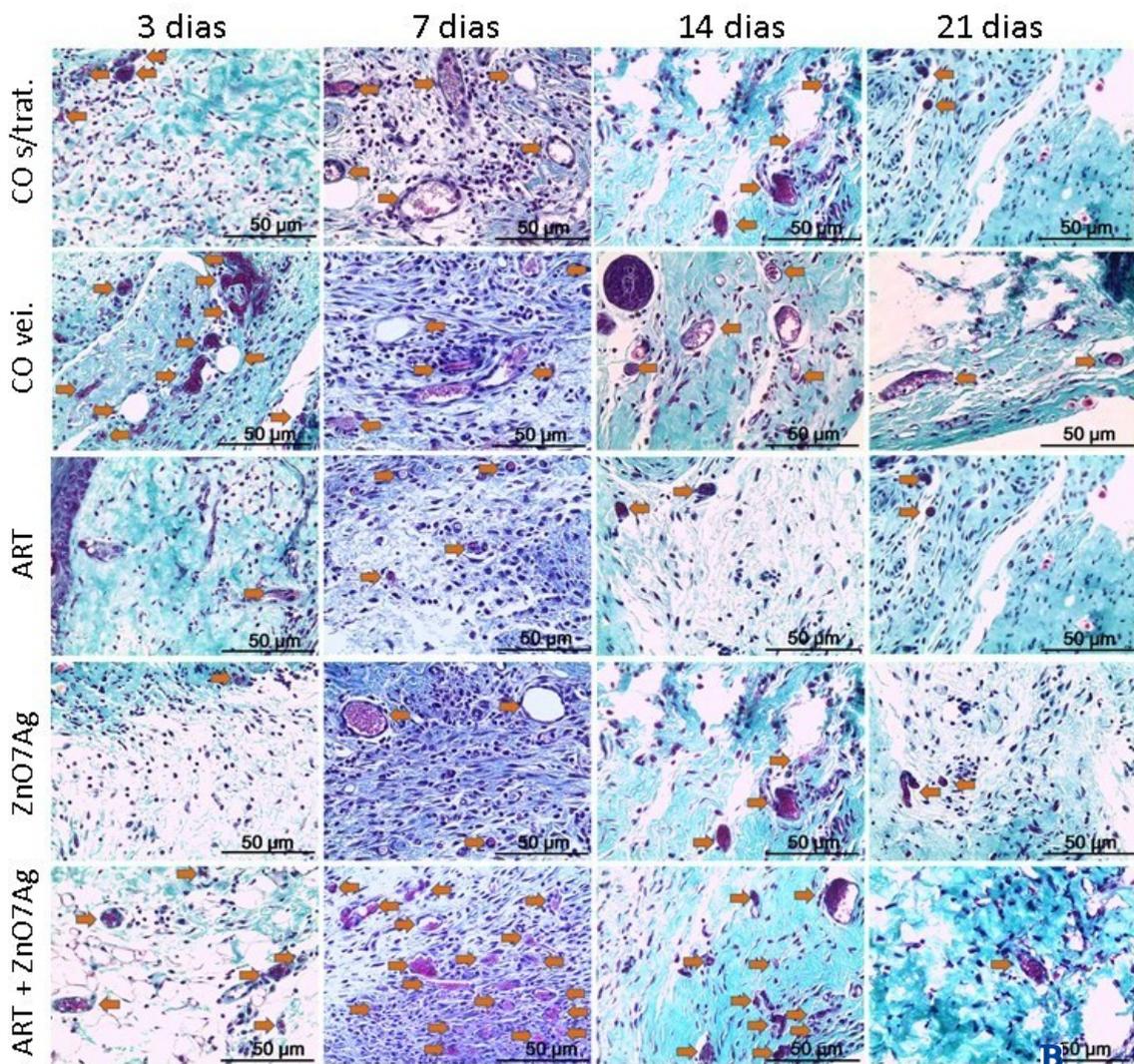
**Fonte:** O autor (2019).

## 4.2 Angiogênese

A angiogênese foi avaliada pela quantificação de vasos sanguíneos na área da ferida em lâminas coradas com Tricômico de Gomori (**figura 9**). Após 3 dias de tratamento, os grupos CO vei. e ZnO7Ag apresentaram maior número de vasos na área da ferida. E após 7 e 14 dias de tratamento, a quantidade de vasos sanguíneos foi aumentada no grupo ART. + ZnO7Ag (**figura 8**).



**A**



**B**

**Figura 8** – **A** Gráfico representando a média de vasos sanguíneos por área em lâminas coradas com Tricômico de Gomori. \* indicam diferença estatística em relação ao grupo CO s/ trat. considerando  $p \leq 0,05$ . **B** Fotomicrografias representando a quantificação de vaso sanguíneos em lâminas coradas com Tricômico de Gomori. As setas em alaranjado apontam para os vasos sanguíneos

Fonte: O autor (2019).

## 5. DISCUSSÃO

Após uma lesão cutânea o restabelecimento da integridade do tecido é reestabelecida pelo processo de cicatrização (GUO; DIPIETRO, 2010) que é a integração das fases de hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento/maturação (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). No presente estudo, foram utilizados modelos de incisão cutânea *in vivo* para avaliar a o fechamento de feridas e atividade angiogênica sob o efeito da pasta base veículo de lanolina e vaselina comercial, de polifenóis das cascas de frutos de *Annona crassiflora* Mart., do nanocompósito de ZnO7Ag e da associação entre os polifenóis e o nanocompósito.

Após a etapa proliferativa, no qual ocorre à formação do tecido de granulação, inicia-se a contração das paredes marginais da lesão. Esta ação é realizada pela ativação de fibroblastos, os quais se diferenciam em miofibroblastos (PRISTO, 2012). Estas células se alinham ao redor de depósitos da nova matriz extracelular, constituindo junções entre células e gerando força de tensão (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Assim, o grupo tratado com nanocompósito de ZnO7Ag demonstrou o melhor fechamento de feridas comparado aos demais grupos de tratamento e ao controle sem tratar. Isto pode ser explicado devido ação antimicrobiana de NPsAg e de NPsZnO e do potencial anti-inflamatório, existindo a prevenção de infecções na lesão e redução da inflamação contribuindo para a re-epitelização (KANTIPUDI et al., 2018). Além disso, NPsZnO possui a propriedade de estimular a síntese de colágeno, o que contribui para o fechamento da ferida. (KANTIPUDI et al., 2018). O nanocompósito de NPsZnO modula a ativação de citocinas pró-inflamatórias, Interleucina 1 beta (IL 1 $\beta$ ) e TNF $\alpha$ . O nanocompósito de NPsAg também desempenha papel na modulação de citocinas diminuindo a inflamação (KANTIPUDI et al., 2018). O que corrobora para o estudo de nanocompósitos de NPsZnO e NPsAg que demonstraram melhor desempenho na atividade cicatrizante de feridas quando comparado ao controle, separadas como NPs e a outras NPs estudadas (KANTIPUDI et al., 2018).

Ao passo que o tecido de granulação apresenta uma intensa atividade de vascularização no tecido (GARROS et al., 2006). Esta nova rede capilar proporciona a síntese do tecido de granulação, para o suprimento local de oxigênio, nutrientes e recrutamento de células (LAUREANO; RODRIGUES, 2011). Sendo o processo de angiogênese a migração e proliferação de células do endotélio de vasos sanguíneos preexistentes formando novos vasos (BECK; A DAMORE, 1997; CORAZZA, 2005). Desse

modo, a formação de novos vasos é importante em múltiplas funções fisiológicas, dentre elas atuando no reparo tecidual (NEEMAN et al., 1997). O grupo que demonstrou maior angiogênese foi o tratado com o extrato de araticum associado ao nanocompósito (ART+ ZnO7Ag). Fato que pode ser justificado pela ação antagônica dos dois tratamentos, uma vez que NPsZnO presente no nanocompósito apresenta atuação na angiogênese via radicais livres, enquanto o araticum apresenta ação antioxidante, que tende a eliminar estes radicais. NPsZnO ao aumentar a produção de radicais livres, em especial peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), induz a síntese de fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que resultam no aumento sobre a formação de vasos sanguíneos (AUGUSTINE et al., 2014). No entanto, como os radicais livres podem promover, em excesso, danos teciduais, concentrações elevadas desta nanopartícula pode afetar negativamente a angiogênese e resultar em efeitos contraditórios a sua ação (AUGUSTINE et al., 2014), desta forma, ao associá-la com os antioxidantes presentes no araticum, a atividade pró-angiogênica foi observada de forma adequada. Assim como em nosso estudo anterior, as frações obtidas a partir do araticum não apresentaram ação pró-angiogênica na concentração de 4% aqui avaliada (MOURA et al, 2018). A atividade antioxidante presente nos polifenóis na casca de *A. crassiflora* está relacionada com o processo cicatricial, modulado por citocinas, como o TNF- $\alpha$ , a estimulação da produção de novos vasos sanguíneos, a influência de células inflamatórias e o aumento da produção de radicais livres. Na indústria farmacêutica o extrato da casca do araticum pode ser incorporado em pomadas, medicamentos cicatrizantes (PRADO, 2018).

É frequente o uso da lanolina em medicamentos para o tratamento de feridas, o qual em ratos machos da linhagem Wistar apontaram a diminuição no tamanho das feridas cutâneas após 14 dias de tratamento, declinando progressivamente até o fechamento completo da lesão (MARTINS; PEREIRA, 2005). Além disso, também sendo eficiente no tratamento de lesões mamilares em puérperas (COCA; DE VILHENA ABRÃO, 2008). Nesse estudo avaliamos o efeito da pasta base lanovaselina a fim de analisar seu potencial. Desse modo, foi observado, maior contração da ferida, após 21 dias de tratamento, no grupo tratado com o controle veículo (CO vei.) em relação ao controle sem tratamento (CO s/trat.). A vaselina é indicada para o tratamento de lesões cutâneas, possuindo atividade cicatrizante, promovendo um ambiente úmido que otimiza o reparo tecidual minimizando a desidratação, necrose e dor, e acelerando a re-epitelização (RAHAL et al., 2003; CANO MANHEZI et al., 2008; FERNANDES, 2011; VALENTE, 2014). Essa junção da vaselina com a lanolina em pomadas dermatológicas tem o objetivo de combinar a capacidade absorvente da lanolina com a de

evitar a desidratação da pele da vaselina (ÁVILA, 2009). Entretanto o controle veículo não manteve o aumento de vasos em tempos subsequentes do tratamento deste estudo. Ainda assim, a pomada de lanovaselina comercial aplicada como veículo para estudos de novas formulações no tratamento de feridas é comumente utilizada na literatura (DE OLIVEIRA, 2000; ROCHA; DOS REIS, 2010; RIZZI, 2016; CORRÊA, 2017).

## **6. CONCLUSÃO**

Em conformidade com a metodologia empregada e com os resultados obtidos, é lícito concluir que o grupo de animais tratados com o nanocompósito de ZnO7Ag conduziu na otimização do reparo de feridas, devido melhora no tempo requerido para o fechamento de feridas. E frações enriquecidas de polifenóis de *Annona crassiflora* Mart. associadas com nanocompósito de óxido de zinco dopado com prata (ART+ZnO7Ag) influenciaram no aumento da angiogênese de feridas cutâneas, devido sua atividade pro-angiogênica, o que pode contribuir para uma maior disponibilidade de nutrientes e oxigênio, essenciais para atividade das células envolvidas na cicatrização. A pomada de lanovaselina utilizada como veículo auxilia positivamente no reparo tecidual.

## REFERÊNCIAS

- AGREN, M. S. Studies on zinc in wound healing. **Acta dermato-venereologica**. Supplementum, v. 154, p. 1-36, 1990.
- ANNABI, N. *et al.* 25th Anniversary Article: Rational design and applications of hydrogels in medicine regenerative. **Advanced Materials**, v. 26, n. 3, p. 85-124, 2014.
- ASSIS, L. M. de *et al.* Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Braz. J. Food Technol**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.
- ATMACA, S.; KADRI, G. Ü. L.; CICEK, R. The effect of zinc on microbial growth. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 28, n. 6, p. 595-598, 1998.
- ÁVILA, E. Aprovechamiento de la *Scoparia dulcis* scrophulariaceae, *Oenocarpus batagua* Arecaceae, y *Solanum brugmancia* Solanaceae, en la producción de una pomada antiinflamatoria. 2009. **Trabalho de Conclusão de Curso**.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.27-51, 2005.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**, 2.ed. São Paulo: Manole Ltda., 655p., 1991.
- BECK, L.; A D'AMORE, P. Vascular development: cellular and molecular regulation. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.365-373, 1997.
- BENITES, R. S. R. *et al.* Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 3, p. 685-691, 2015.
- BROUGHTON G.; JANIS J. E.; ATTINGER C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg** 2006; 117(7 Suppl):12S-34S.
- BUSTI A.J. *et al.* -Effects of perioperative antiinflammatory and immunomodulating therapy on surgical wound healing. **Pharmacotherapy**, vol. 25, no. 11 I, pp. 1566–1591, 2005.
- CANO MANHEZI, A. *et al.* Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. **Revista Brasileira de enfermagem**, v. 61, n. 5, 2008.
- CHAINANI-WU N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of turmeric (*Curcuma longa*). **J Altern Complement Med**, 9, p.161–168, 2003.
- CHALOUPKA, K. *et al.* Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 28, n. 11, p.580-588, 2010.
- CHANDRAN, S. P. *et al.* Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. **Biotechnology progress**, v. 22, n. 2, p. 577-583, 2006.

COCA, K.; DE VILHENA ABRÃO, A. C. F. Avaliação do efeito da lanolina na cicatrização dos traumas mamilares. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 21, n. 1, p. 11-16, 2008.

CORAZZA, A. V. Fotobiomodulação comparativa entre o laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos. 2005. **Dissertação (Mestrado em Bioengenharia)** - Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

CORRÊA, A. C. L. Estudo de bioprodutos do cerrado no processo de reparação tecidual em feridas cutâneas de ratos diabéticos. 2017.

DE OLIVEIRA, S. T. et al. Formulações de confrei (*Symphytum officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista da FZVA**, v. 7, n. 1, 2000.

DIEGELMAN R.F; EVANS M. C. Wound healing: na overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, vol. 9, pp. 283–289, 2004.

FARAHANI R.M; KLOTH, L. C. -The hypothesis of -biophysical matrix contraction: wound contraction revisited, **International Wound Journal**, vol. 5, no. 3, pp. 477–482, 2008.

FERNANDES, S. et al. Cicatrização por segunda intenção—a propósito de um caso clínico. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**, v. 69, n. 4, p. 617, 2011.

FITZMAURICE, S. D.; SIVAMANI, R. K., ISSEROFF, R. R. -Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products, **Skin Pharmacology and Physiology**, vol. 24, no. 3, pp. 113–126, 2011.

FONG, J.; WOOD, F.; Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. **Int J Nanomedicine**, vol. 1, no. 4, pp. 441-9, 2006.

FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 1335p, 2002.

FREEDBERGI. M. *et al.* **Tratado de Dermatologia**. 5 ed. Rio de Janeiro : Ed, Revinter, p. 88-259, 2005.

GARROS, I. C. et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirurgica Brasileira**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.55-65, 2006.

GUARDIA, T. *et al.* Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Farmaco**, [s.l.], v. 56, n. 9, p.683-687, ago. 2001.

GUNALAN, S.; SIVARAJ, R. ; RAJENDRAN, V. Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 22, n. 6, p. 693-700, 2012.

GUO, C. *et al.* Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, v. 23, n. 12, p. 1719-1726, 2003.

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

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-321, 2008.

HENDI, A. Silver nanoparticles mediate differential responses in some of liver and kidney functions during skin wound healing. **Journal Of King Saud University - Science**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.47-52, jan. 2011.

ISAAC, C. *et al.* Physiological wound healing. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 89, n. 3-4, p.125-131, 19 dez. 2010.

JAGETIA, G. C.; RAJANIKANT, G.K. Role of curcumin, a naturally occurring phenolic compound of turmeric in accelerating the repair of excision wound, in mice whole-body exposed to various doses of  $\gamma$ -radiation. **Journal of Surgical Research**, v. 120, n. 1, p. 127-138, 2004.

JUSTINO, A. B. *et al.* Casca do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) como fonte de compostos antioxidantes com atividade de inibição de  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e glicação não enzimática. 2016.

KANTIPUDI, S. et al. Enhanced wound healing activity of Ag-ZnO composite NPs in Wistar Albino rats. **Iet Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.473-478, 1 2018.

KAPOOR, M. *et al.* Effects of epicatechingallate on wound healing and scar formation in a full-thickness incisional wound healing model in rats. **Am J Pathol**, 165, p. 299–307, 2004.

KIERZENBAUM, A.L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier; p.319-39, 2004.

KNIGHTON, D. R.; SILVER, I.; HUNT, T. K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery**, v.90, p. 262- 270, 1981.

KO'ZMA E.M *et al.* -Wound repair,| Advances inHygiene and Experimental Medicine. vol. 52, p. 173–185, 1998.

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 13, p. e23, 2011.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran Patologia-bases patológicas das doenças**. Elsevier Brasil, 2015.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Wound Healing. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, [S.l.], v. 69, n. 3, p. 355, 2011.

LEACH, M. J. A critical review of natural therapies in wound management. **Ostomy/wound management**, p.50, 36-40, 2004.

- LUCAS T. et al., —Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair,| **Journal of Immunology**, vol. 184, no. 7, pp. 3964–3977, 2010.
- LUCAS, R. Semiologia da Pele. In: FEITOSA, F.L.F. **Semiologia Veterinária – a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, cap.12, p.641-676,2004.
- MACLEOD, A. S.; HAVRAN, W. L. Functions of skin-resident  $\gamma\delta$  T cells. **Cellular and molecular life sciences**, v. 68, p. 2399–408, 2011.
- MARTINS, E. F., PEREIRA, L. M. Influência da lanolina na cicatrização. **Saúde em Revista: piracicaba**, 7(16): 19-25, 2005
- MATHIEU D, L. J-C.; WATTEL F. Non-healing wounds. In: Handbook on hyperbaric medicine, Mathieu DE. **Netherlands: Springer**, pp. 401-427, 2006.
- MEDEIROS, A. C.; DANTAS-FILHO, A. M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal Of Surgical And Clinical Research**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.87-102, 2017.
- MENKE, N. B. et al. Impaired wound healing. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 1, p. 19-25, 2007.
- MOURA, Francielle de *et al.* Pro-Fibrogenic and Anti-Inflammatory Potential of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* in Skin Repair. **Planta Medica**, [s.l.], v. 85, n. 07, p.570-577, 2018
- NEEMAN, M. et al. Regulation of angiogenesis by hypoxic stress: from solid tumours to the ovarian follicle. **International Journal Of Experimental Pathology**, [s.l.], v. 78, n. 2, p.57-70, abr. 1997.
- NOWAK, G.; OLEJEK, A. -Biological and molecular aspects of wound healing,| **Practical Gynecology**, vol. 12, pp. 2–30, 2004.
- OLIVEIRA, M. M. Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades. 2005.
- OYARZUN-AMPUERO, F. *et al.*, Nanoparticles for the treatment of wounds, *Curr. Pharm. Des.* 21 (29) (2015) 4329e4341
- PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 9, n. 3, p. 035004, 2008.
- PANCHATCHARAM, M. *et al.* Curcumin improves wound healingby modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. **Mol CellBiochem**, 290, p.87–96, 2006.
- PASSOS, A. A. *et al.* Obtenção de nanocompósito de EVA/sílica e caracterização por ressonância magnética nuclear no estado sólido. **Polímeros**, v. 21, n. 2, p. 98-102, 2011.

PAZYAR, N. *et al.* Skin wound healing and phytomedicine: a review. **Skin Pharmacol and Physiol** 2014;27:303–10.

PEYREFITTLE, G. Biologia da pele. In: Peyrefitte, G.; Martini, M.C.; Chivot, M. Estética-cosmética: cosmetologia, biologia geral, biologia da pele. **In: Estética-cosmética: cosmetologia, biologia geral, biologia da pele.** 1998.

PRADO, L. G. *et al.* Avaliação das atividades antioxidante, cicatrizante e anticâncer de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) *in vitro*. 2018.

PRISTO, Ilanna. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.

RAHAL, S. C. *et al.* Use of própolis or honey in the treatment of clean wounds induced in rats. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, 2003.

RAINA *et al.* Medicinal plants and their role in wound healing. **Online Veterinary J**, v. 3 p. 21, 2008.

RAJASHRI, S.K. *et al.*, Bactericidal action of N doped ZnO in sunlight. **Biointerface. Res Appl Chem**, 1: 57, 2011.

REHDER, J. *et al.* Model of human epidermis reconstructed *in vitro* with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 122, n. 1, p. 22-25, 2004.

RIGO, C. *et al.* Active Silver Nanoparticles for Wound Healing. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.4817-4840, 1 mar. 2013.

RIZZI, E.C. *et al.* Potencial cicatrizante da pomada de *Sebastiania hispida* (Mart.) Pax (Euphorbiaceae) comparado ao laser de baixa potência. **Braz. J. Biol.**, v.77, n.3, p. 480-489, Setembro de 2016.

ROBSON, M. C. Cytokine manipulation of the wound. **Clinics in plastic surgery**, v. 30, n. 1, p. 57-65, 2003.

ROCHA, C. B. J., DOS REIS, N. S. Estudo comparativo do efeito de glicosaminoglicanas ácidas sulfatada (hirudóid®) e não-sulfatada (ácido hialurônico) e da própolis sobre a cicatrização da pele de ratos albinos. **Investigação**, v. 5, n. 1-6, 2010.

ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048-1054, 2007b.

ROESLER, R. *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007 a.

ROY S *et al.* Dermal wound healing is subject to redoxcontrol. **Mol Ther**. 13, p. 211–220, 2006.

SABA, N.; TAHIR, P.M.; JAWAID, M. A review on potentiality of nano filler/natural fiber filled polymer hybrid composites. **Polymer**, v. 6, n. 8, p. 2247-2273, 2014.

SANKAR, R. *et al.* Wound healing activity of Origanum vulgare engineered titanium dioxide nanoparticles in Wistar Albino rats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 7, p. 1701-1708, 2014.

SARRAZY V. *et al.* -Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments, **Wound Repair and Regeneration**, vol. 19, supplement 1, pp. S10-S15, 2011.

SEGUNDO, Alex Semenoff *et al.* Influência do Aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. **Rev Periodontia**, v. 17, n. 1, p. 23-8, 2007.

SEN, C. K; GORDILLO, G. M., ROY S., *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.

SHAH, J. M. Y. *et al.* Cellular events and biomarkers of wound healing. **Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India**, v. 45, n. 2, p. 220, 2012.

SHALUMON, K. T. *et al.* Sodium alginate/poly (vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings. **International journal of biological macromolecules**, v. 49, n. 3, p. 247-254, 2011.

SILVA, M. M. P. *et al.* Utilização de nanopartículas no tratamento de feridas: revisão sistemática. **Revista da Escola de Enfermagem da Usp**, [s.l.], v. 51, p.1-10, 2018.

SINNO, H.; PRAKASH, S. Complements and the wound healing cascade: an updated review. **Plasticsurgeryinternational**, v. 2013, 2013.

SMIJS, T. G., PAVEL, S. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. **Nanotechnology, science and applications**, v. 4, p. 95, 2011.

SOUSA, M. A. J.; VARGAS, T. J. S. Anatomia, fisiologia e histologia da pele. In: kede, M. P. V.; sabatovich, O. **Dermatologia estética**. São Paulo: Atheneu, cap. 1, 2004.

SOUTO, L. R. M. *et al.* Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 124, n. 2, p. 71-76, 2006.

SUDHEESH KUMAR, P. T. *et al.* Flexible and microporous chitosan hydrogel/nano ZnO composite bandages for wound dressing: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **ACS applied materials & interfaces**, v. 4, n. 5, p. 2618-2629, 2012

TOMASEK J.J. *et al.* -Myofibroblastsandmechano: regulation of connective tissue remodelling, **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 3, no. 5, pp. 349-363, 2002.

TONNESEN, M.G.; FENG, X.; CLARK, R. A. F. –Angiogenesis in wound healing, **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, vol. 5, no. 1, pp. 40–46, 2000.

VALENTE, F. S. Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar. 2014.

VARNER, K.; MANAGER, T. O. State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More. **United States Environmental Protection Agency**. 2010.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **Journal of International Medical Research**.37(5), 1528-1542, 2018.

WILKINSON, L. *et al.* Silver and nanoparticles of silver in wound dressings: a review of efficacy and safety. **Journal Of Wound Care**, [s.l.], v. 20, n. 11, p.543-549, nov. 2011. Mark Allen Group. <http://dx.doi.org/10.12968/jowc.2011.20.11.543>.

WITTE, M. B., BARBUL, A. GENERAL PRINCIPLES OF WOUND HEALING. **Surgical Clinics of North America**, 77(3), 509–528. 1997.

WU. Y.; S. CHEN, Apoptotic cell: linkage of inflammation and wound healing. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 5, article 1, 2014

YI, B.; CHEN, X.; GUO, K.; XU, L.; CHEN, C.; YAN, H. CHEN, J. Highperformance carbon nanotube-implanted mesoporous carbon spheres for supercapacitors with low series resistance. **Materials Research Letters**, v. 46, p. 2168-2172, 2011.

## ANEXO A — APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA ANIMAL



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do uso tópico de uma pomada contendo frações enriquecidas de polifenóis da casca do fruto de *Annona crassiflora* Mart.e dióxido de titânio (NPsTiO<sub>2</sub>) e óxido de zinco (NPsZnO) na cicatrização de feridas cutâneas", protocolo nº 044/17, sob a responsabilidade de **Tatiana Carla Tomiosso** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **14 de julho de 2017**.

(We certify that the project entitled "Avaliação do uso tópico de uma pomada contendo frações enriquecidas de polifenóis da casca do fruto de *Annona crassiflora* Mart.e dióxido de titânio (NPsTiO<sub>2</sub>) e óxido de zinco (NPsZnO) na cicatrização de feridas cutâneas", protocol 044/17, under the responsibility of Tatiana Carla Tomiosso - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of July 14th, 2017).

Vigência do Projeto	Início: 22/07/2017 Término: 01/12/2018
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongos Balb/ C
Número de animais	120
Peso / Idade	27 g / 9 semanas
Sexo	Machos
Origem / Local	Biotério CBEA - UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 19 de julho de 2017.

**Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão**  
Coordenador da CEUA/UFU