

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Perfil fitoquímico de extrato e frações, estudo *in sílico*, atividade antimicrobiana, toxicidade e ação cicatrizante *in vivo* de cremes à base das folhas da *Platonia insignis* Mart.

JORGE MARCELO MORAES ALBUQUERQUE

ORIENTADORA: PROF. DRA. VALDILÉIA TEIXEIRA UCHÔA

COORIENTADORA: PROF. DRA. SÂMYA DANIELLE LIMA DE FREITAS

Teresina – PI

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Perfil fitoquímico de extrato e frações, estudo *in sílico*, atividade antimicrobiana, toxicidade e ação cicatrizante *in vivo* de cremes à base das folhas da *Platonia insignis* Mart.

JORGE MARCELO MORAES ALBUQUERQUE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Síntese Orgânica e Bioprospecção Fitoquímica.
Orientadora: Profa. Dra. Valdiléia Teixeira Uchôa.

Teresina – PI

A345p Albuquerque, Jorge Marcelo Moraes.

Perfil fitoquímico de extrato e frações, estudo in sílico, atividade antimicrobiana, toxicidade e ação cicatrizante in vivo de cremes à base das folhas da *Platonia insignis* Mart / Jorge Marcelo Moraes Albuquerque. - 2024.

91f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Piauí - UESPI, Programa de Pós-Graduação em Química, Campus Poeta Torquato Neto, Teresina-PI, 2024.

"Orientadora: Profa. Dra. Valdiléia Teixeira Uchôa".

"Área de Concentração: Síntese Orgânica e Bioprospecção Fitoquímica".

1. Cicatrização de Feridas. 2. Fitoterapia. 3. *Platonia insignis*. 4. Prospeção Fitoquímica. 5. Plantas Medicinais. I. UCHÔA, VALDILÉIA TEIXEIRA . II. Título.


Perfil fitoquímico de extrato e frações, estudo *in sílico*, atividade antimicrobiana, toxicidade e ação cicatrizante *in vivo* de cremes à base das folhas da *Platonia insignis* Mart.

JORGE MARCELO MORAES ALBUQUERQUE


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Aprovado em 21 de Novembro de 2024.


Membros da Banca:

Documento assinado digitalmente
 **VALDILEIA TEIXEIRA UCHOA**
Data: 24/02/2025 10:42:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof(a). Dr(a). Valdiléia Teixeira Uchôa
(Presidente da Banca – UESPI)

Documento assinado digitalmente
 **ADRIANA MARIA VIANA NUNES**
Data: 21/02/2025 13:14:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr(a). Adriana Maria Viana Nunes
(Membro Titular – UFPI)

Documento assinado digitalmente
 **LÍVIA ALVES FILGUEIRAS**
Data: 21/02/2025 17:01:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr(a). Lívia Alves Filgueiras
(Membro Titular – PÓS-DOC IOC-RJ)

Documento assinado digitalmente
 **ROSA VIRGINIA SOARES MAMEDE**
Data: 22/02/2025 09:53:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr(a). Rosa Virginia Soares Mamede
(Membro Suplente – UESPI)

Teresina – PI

2024

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais falecidos, a quem agradeço as bases que deram para me tornar a pessoa que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus e a Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, pela oportunidade, por ter iluminado e abençoado a minha vida todos os dias;
- ❖ A minha esposa Gizelle e filha Maria Eduarda, por se alegrarem com minhas conquistas, por toda ajuda, apoio, incentivo, carinho e compreensão nos momentos difíceis;
- ❖ À professora Profa. Dra. Valdiléia Teixeira Uchôa, pela maravilhosa orientação e acolhimento. Por ter me guiado no melhor caminho durante a pós-graduação e por sempre estar presente e pela amizade;
- ❖ A minha coorientadora Profa. Dra. Sâmia Danielle Lima de Freitas, pelo apoio, compreensão e ensinamentos;
- ❖ Aos meus amigos do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais pela ajuda e parceria, em especial Maria das Dores, Renata e Natasha Rocha;
- ❖ Aos parceiros dos laboratórios GERATEC, NPBio e as instituições parceiras UFPI, LPN e IFAL pelas contribuições na realização deste trabalho.
- ❖ Aos professores Dra. Girlene Soares de Figueirêdo, Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho, Dr. Gerardo M. Vieira Junior, Dr. André Luiz Pinheiro de Moura, Dr. Ticiano Gomes do Nascimento e Dra. Rosemarie B. Marques por compartilharem seus conhecimentos comigo e contribuírem de forma essencial para realização deste trabalho
- ❖ Aos meus colegas de mestrado PPGQ turma 2022-2024 pela contribuição, direta e indiretamente, deste trabalho, em especial Ana Karla, Flávia Magalhães, Milena, Wellington e Illa Fernanda;
- ❖ A aluna de IC e amiga Adna Mirella que foi meu braço direito em boa parte deste trabalho;
- ❖ A Universidade Estadual do Piauí, pela oportunidade de realização desta pesquisa.

Epígrafe

*“Você ganha força, coragem e confiança através de
cada experiência em que você realmente para e
encara o medo de frente.”*

(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

ALBUQUERQUE, J.M.M. Perfil fitoquímico de extrato e frações, estudo *in silico*, atividade antimicrobiana, toxicidade e ação cicatrizante *in vivo* de cremes à base das folhas da *Platonia insignis* Mart.. 2024. 91 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

A *Platonia insignis* Mart, popularmente conhecida como Bacuri, é valorizada pelo óleo extraído de suas sementes, amplamente usado no tratamento de doenças de pele e cicatrização. O objetivo deste trabalho foi investigar o perfil fitoquímico do extrato etanólico das folhas da *P. insignis* (EEPi), bem como de suas frações acetato de etila (FAPi) e metanol (FMPi). Além disso, buscou-se caracterizar parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos, avaliar os efeitos antibacteriano, antifúngico, toxicológico e de cicatrização dos cremes do EEPi, FAPi e FMPi. O perfil fitoquímico foi determinado através de prospecção preliminar e análise de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), estudos farmacocinéticos e toxicológicos desses compostos utilizando os softwares PreADMET e SwissADME. A atividade antimicrobiana dos cremes foi realizada por meio de difusão em poço e a avaliação toxicológica pelo potencial irritante na membrana córnea alantóide (HET-CAM) e ação cicatrizante *in vivo*. O perfil fitoquímico por prospecção preliminar permitiu identificar seis classes de metabólitos secundários (saponinas, taninos, triterpenoides, alcaloides, flavonóides e catequinas), por UPLC identificou os flavonóides (naringenina, pinobanksina, pinocembrina e galangina), os resultados farmacocinéticos indicaram alta absorção intestinal humana (HIA), média permeabilidade Caco-2 e alta permeabilidade à barreira hematoencefálica (BBB) e os constituintes não infringiram as Regras de Lipinski. A atividade antibacteriana dos cremes foi positiva para as espécies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e uma espécie fúngica *Candida albicans*, com melhor resultado para o creme da FMPi. Já a avaliação toxicológica dos cremes por HET-CAM, revelou que o grau de irritação na membrana foi leve ou não existiu, sugerindo que os cremes desenvolvidos podem ser aplicados com segurança por via tópica. Observou-se pela análise macroscópica e microscópica, cremes atuaram positivamente no processo de cicatrização de feridas cirurgicamente induzidas em ratos, evidenciado através de redução de áreas das feridas e na reepitelização mais acelerada, quando comparados ao Grupo Controle Negativo, principalmente, no período de 14 dias. O tratamento com o creme a base da FMPi apresentou

melhor resultado, pois mostrou uma diminuição das células polimorfonucleares e FAPi com um aumento de fibroblastos em comparação aos outros grupos no período de 14 dias. Os resultados deste estudo mostraram que o extrato etanólico das folhas de *P. insignis* e suas frações apresenta-se como uma nova opção de abordagem terapêutica no processo de cicatrização da pele.

PALAVRAS-CHAVE: Cicatrização de feridas; Fitoterápico; *Platonia insignis*; Prospecção fitoquímica.

.

ABSTRACT

Platonia insignis Mart, popularly known as Bacuri, is valued for the oil extracted from its seeds, which is widely used in the treatment of skin diseases and healing. The aim of this study was to investigate the phytochemical profile of the ethanolic extract of the leaves of *P. insignis* (EEPi), as well as its ethyl acetate (FAPi) and methanol (FMPi) fractions. In addition, we sought to characterize pharmacokinetic and toxicological parameters, evaluate the antibacterial, antifungal, toxicological and healing effects of the EEPi, FAPi and FMPi creams. The phytochemical profile was determined through preliminary prospecting and ultra-performance liquid chromatography (UPLC) analysis, pharmacokinetic and toxicological studies of these compounds using PreADMET and SwissADME software. The antimicrobial activity of the creams was carried out using well diffusion and toxicological evaluation using the irritant potential on the *chorio allantoic* membrane (HET-CAM) and *in vivo* healing action. The phytochemical profile by preliminary prospecting identified six classes of secondary metabolites (saponins, tannins, triterpenoids, alkaloids, flavonoids and catechins), UPLC identified the flavonoids (naringenin, pinobanksin, pinocembrin and galangin), the pharmacokinetic results indicated high human intestinal absorption (HIA), medium Caco-2 permeability and high blood-brain barrier (BBB) permeability and the constituents did not infringe Lipinski's Rules. The antibacterial activity of the creams was positive for the bacterial species *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and a fungal species *Candida albicans*, with the best result for the FMPi cream. The toxicological evaluation of the creams by HET-CAM revealed that the degree of irritation to the membrane was mild or non-existent, suggesting that the creams developed can be safely applied topically. Macroscopic and microscopic analysis showed that the creams acted positively on the healing process of surgically induced wounds in rats, as evidenced by a reduction in wound areas and accelerated re-epithelialization, when compared to the Negative Control Group, especially during the 14-day period. Treatment with the cream based on FMPi showed better results, as it showed a decrease in polymorphonuclear cells and FAPi with an increase in fibroblasts compared to the other groups over the 14-day period. The results of this study show that the ethanolic extract of *P. insignis* leaves and its fractions are a new therapeutic option for the skin healing process.

KEYWORDS: Wound healing; Phytotherapeutic; *Platonia insignis*; phytochemical inspection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Representação gráfica da organização do tecido epitelial. (A) camadas estão esquematizadas revelando os anexos da derme, como glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, nervos e vasos sanguíneos, e em (B) Disposição e estrutura das camadas que constituem a epiderme e (C), esquematização da derme e seus constituintes;

Figura 2.2: Etapas e eventos envolvidos na cicatrização de feridas;

Figura 2.3: Locais de ocorrência da *Platonia insignis* Mart;

Figura 2.4: Aspectos gerais da *Platonia insignis*. (A) Árvore; (B) folhas; (C) fruto;

Figura 3.1: Fluxograma da produção do extrato bruto e das frações;

Figura 3.2: Cremes produzidos das folhas de *P. insignis* EEPi, FAPi e FMPI;

Figura 3.3: Protocolo geral do teste HET-CAM;

Figura 3.4: Procedimento de tratamento no reparo tecidual;

Figura 3.5: Aferição dos ferimentos usando o software Image J®;

Figura 3.6: Processamento histológico;

Figura 4.1: Cromatograma do extrato etanólico das folhas de *P. insignis* (EEPi). Identificação dos flavonoides: 1 naringenina (290 nm), 2 Pinobanksina (291 nm), 3 pinocembrina (290 nm), 4 Galangina (266 nm);

Figura 4.2: Cromatogramas das amostras FAPi e FMPI 2000 µg/mL. Identificação dos flavonoides: 1 naringenina (290 nm), 2 Pinobanksina (291 nm), 4 Galangina (266 nm), respectivamente;

Figura 4.3: Teste de difusão em poços contendo os cremes (Base-1, EEPi-2, FMPI-3 e FAPi-4) contra (A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Escherichia coli*;

Figura 4.4: Teste de difusão em poços contendo os cremes (Base-1, EEPi-2, FMPI-3 e FAPi-4) contra espécie fúngica *Candida albicans*;

Figura 4.5: Imagens que ilustram os efeitos do creme do EEPi aplicadas na membrana cório-Alantóide. (**A**) estado inicial, (**B**) durante o período de 30 segundos, (**C**) durante o período de 120 segundos , (**D**) durante o período de 300 segundos. (E) controle positivo, NaOH 0,1M de 300 segundos;

Figura 4.6: Imagens que ilustram os efeitos do creme do FMPi aplicado na membrana cório-Alantóide . (A) estado inicial, (B) durante o período de 300 segundos;

Figura 4.7: Fotos comparativas dos ferimentos dos animais do grupo controle negativo e positivo com os grupos tratados com extrato e frações da *P. insignis* no 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório;

Figura 4.8: Percentual de regressão cicatricial dos grupos controles e experimentais tratados com extrato e frações de *P. insignis* por 7(A), 14 (B) e 21 dias (C). a e a,b estatisticamente significativo, $p < 0,05$.

Figura 4.9: Aspectos histológicos após sete dias de evolução. Feridas recobertas por crosta fibrinoneutrófila (setas maiores) de espessura variável. No leito das feridas, tecido de granulação jovem com matriz extracelular (MEC) frouxa contendo numerosos capilares sanguíneos neoformados (setas menores), neutrófilos, macrófagos vacuolados e fibroblastos jovens. Grupo CN (A, B); grupo CP (C, D); grupo EEPi (E, F); grupo FMPi (G, H); grupo FAPi (I, J). A, C, E, G, I: H.E., 100x. B, D, F, H, J: H.E., 400x.

Figura 4.10: Aspectos histológicos após quatorze dias de evolução. No grupo CN (A e B), a reepitelização ainda não alcança a área central das feridas. A derme mostra MEC densa, contendo fibroblastos maduros, raros capilares sanguíneos e macrófagos. Nos grupos CP (C, D), EEPi (E, F), FMPi (G, H) e FAPi (I, J) a epiderme neoformada (setas maiores) recobre parcial ou totalmente as lesões; capilares sanguíneos (setas menores), neutrófilos e macrófagos vacuolados estão presentes em número considerável. A, C, E, G e I: H.E., 100x. B, D, F, H e J: H.E., 400x.

Figura 4.11: Aspectos histológicos após vinte e um dias de evolução. Todos os grupos exibem epiderme neoformada (setas maiores) recobrindo totalmente a ferida. No grupo CN (A, B), a MEC contém fibroblastos maduros e raros capilares sanguíneos. Os grupos CP (C, D), EEPi (E, F), FMPi (G, H) e FAPi (I, J) mostram numerosos capilares sanguíneos

(setas menores) e infiltrados focais de macrófagos na MEC. A, C, E, G e I: H.E., 100x. B, D, F, H e J: H.E., 400x.

Figura 4.12: (A) Células mononucleares no órgão lesionado. Animais tratados por 14 dias. Os valores mostram que há uma diferença significativa entre os grupos 1 e 3, e entre os grupos 1 e 4, com uma redução dessas células nos grupos tratados. (B) Células polimorfonucleares no órgão lesionado. Animais tratados por 14 dias. Não há diferença significativa entre os grupos estudados. (C) Número de fibroblastos no órgão lesionado. Animais tratados por 14 dias. Não há diferença significativa entre os grupos estudados. Os valores apresentados representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados ($n = 6$).*, estatisticamente significativo, $p < 0,05$. ANOVA seguida de Tukey.

Figura 4.13: Porcentagem de células inflamatórias no órgão lesionado. Animais tratados por 14 dias.

Figura 4.14: Mosaico de imagens da pele dos animais tratados por 14 dias. A – Representa o grupo 1, tratado somente com o creme(CN); B – Representa o grupo 2, tratado com o medicamento colagenase (CP); C – Representa o grupo 3, tratado com o creme EEPi; D – Representa o grupo 4, tratado com o creme da FMPi e E – Representa o grupo 5, tratado com creme da FMPi. Seta preta indica fibroblasto; Seta azul aponta célula inflamatória; Seta branca remete a fibra colágeno; Seta verde aponta vaso sanguíneo. Todas a imagens obtidas com o aumento de 10 x 40.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1:** Atividades biológicas e uso etnofarmacológico da *Platonia insignis* Mart.;
- Tabela 3.1:** Parâmetros usados para a predição farmacocinética e toxicológica usando os softwares PreADMET e SwissADME;
- Tabela 3.2:** Esquema de pontuação para testes de irritação com o método de teste;
- Tabela 3.3:** Categoria de irritação de acordo com a faixa de pontuação do HET- CAM;
- Tabela 4.1:** Predição das propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição e metabolismo) dos flavonoides galangina, naringenina, pinobanksina e pinocembrina identificados na fração metanólica (FMPI) de *Platonia insignis*;
- Tabela 4.2:** Predição das propriedades toxicológicas, permeação cutânea e Regra de Lipinski dos flavonoides galangina, naringenina, pinobanksina e pinocembrina identificados na fração metanólica (FMPI) de *Platonia insignis*;
- Tabela 4.3:** Valores de halos de inibição (mm) dos cremes do extrato e frações da *P. insignis* contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;
- Tabela 4.4:** Valores de halos de inibição (mm) dos cremes do extrato e frações da *P. insignis* contra a levedura *Candida albicans*;
- Tabela 4.5:** Escore de irritação e classificação de irritação no teste da membrana corioalantóica do ovo de galinha (HET-CAM) para o creme da FAPI;
- Tabela 4.6:** Escore de irritação e classificação de irritação no teste da membrana corio alantóica do ovo de galinha (HET-CAM) para o creme da EEPi;
- Tabela 4.7:** Escore de irritação e classificação de irritação no teste da membrana corioalantóica do ovo de galinha (HET-CAM) para o creme da FMPI.

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1: Divisão dos animais em grupos experimentais;

Quadro 4.1: Triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Platonia insignis*;

Quadro 4.2: Compostos identificados por UPLC-DAD-UV no extrato etanólico e frações das folhas de *P. insignis* com suas respectivas atividades biológicas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas;
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência;
EEPi	Extrato Etanólico da <i>Platonia insignis</i> ;
FMPI	Fração Metanólica da <i>Platonia insignis</i> ;
FAPI	Fração Acetanólica da <i>Platonia insignis</i> ;
ACOEt	Acetato de Etila;
MeOH	Metanol;
MEC	Matriz Extracelular;
DPPH	2,2 difenil-1- Picrilhidrazil;
ABTS	Antidepressivos Tricíclicos;
UFPI	Universidade Federal do Piauí;
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais;
UESPI	Universidade Estadual do Piauí;
NPBio	Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade;
IFAL	Instituto Federal de Alagoas;
TR	Tempo de Retenção;
HE	Hematoxilina / Eosina;
HET-CAM	Teste do Ovo de Galinha – Membrana Corioalantóica;
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade;
BBB	Permeabilidade à barreira hematoencefálica;
Caco-2	Permeabilidade em células de adenocarcinoma humano;
LC-EM	Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massa;
CYP	Isoforma de P450;
HIA	Absorção intestinal humana;
hERG	Risco cardíaco;
MDCK	Permeabilidade em células caninas;
MM	Massa molecular;
nALH	Número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio;
nDLH	Número de grupos doadores de ligação de hidrogênio;

PreADMET	Programa computacional para análises farmacocinéticas e toxicológicas <i>in silico</i> ;
PPB	Ligação às proteínas plasmáticas;
Pubchem	Banco de dados químicos do Instituto Nacional de Saúde;
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado;
SwissADME	Programa computacional para análises <i>in silico</i> ;

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	13
1.1 <u>Objetivos</u>	16
1.4.1 <i>Gerais</i>	16
1.4.2 <i>Específicos</i>	16
CAPÍTULO 2 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 <i>Pele, ferimentos e o processo de cicatrização</i>	17
2.2 <i>Plantas medicinais</i>	21
2.3. <i>Platonia insignis</i> Mart. – Bacuri.....	22
2.4 2.4 <i>Toxicidade de substâncias candidatas a fármacos e Estudo in sílico</i>	26
CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	28
3.1 <i>Coleta do material vegetal</i>	28
3.2 <i>Preparação do extrato e frações</i>	28
3.3 <i>Triagem fitoquímica por prospecção preliminar do extrato etanólico das folhas de P. insignis</i>	29
3.4 <i>Análise por UPLC-DAD-UV do extrato etanólico e das frações das folhas de P. insignis</i>	30
3.5 <i>Predição ADMET</i>	31
3.6 <i>Preparo das formulações (cremes) contendo extrato e frações (FAPi e FMPi) das folhas da P. insignis</i>	32
3.7 <i>Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do creme base (veículo) e dos cremes do EEPi, FAPi e FMPi pelo método de difusão em poço</i>	33
3.7.1 <i>Cepas microbianas utilizadas e preparo do inóculo</i>	33
3.7.2 <i>Teste de suscetibilidade por meio de difusão em poço</i>	34
3.8 <i>Avaliação da toxicidade dos cremes do EEPi, FAPi e da FMPi pelo teste HET-CAM</i>	34
3.9 <i>Animais</i>	36
3.10 <i>Protocolo experimental</i>	37
3.10.1 <i>Preparo dos animais e procedimento de tratamento no reparo tecidual</i>	37
3.10.2 <i>Avaliação macroscópica - área de regressão dos ferimentos</i>	38

3.10.3 Avaliação microscópica - análise histológica qualitativa e quantitativa	39
Capítulo 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 T 4.1 Triagem fitoquímica por prospecção preliminar do extrato etanólico das folhas de <i>P. insignis</i>	41
4.2 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência - UPLC do extrato etanólico e frações das folhas de <i>P. insignis</i>	42
4.3 Predição ADMET	48
4.4 Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do creme base(veículo) e dos cremes do EEPi, FAPi e FMPi pelo método de difusão em poço	53
4.5 A Avaliação da toxicidade dos cremes do EEPi, FAPi e da FMPi pelo teste HET-CAM	57
4.6 Avaliação macroscópica - Regressão cicatricial	61
4.7 Avaliação microscópica - análise histológica qualitativa e quantitativa	64
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A pele recobre todo o corpo e atua como uma barreira física entre o organismo e o ambiente exterior, sendo um dos maiores órgãos do corpo humano e representando cerca de 16% do peso corporal. É constituída por uma porção epitelial mais externa, chamada de epiderme e uma porção conjuntiva, abaixo da epiderme, chamada de derme. Além da hipoderme, camada mais internada da pele, formada por tecido conjuntivo frouxo responsável por permitir que a pele se deslize sobre os tecidos ou órgãos sobre os quais ela se encontra. A principal característica desta camada é a presença de tecido adiposo, que pode variar em densidade conforme o local do corpo.¹

A pele tem várias funções: de proteção (função mecânica); como uma barreira impermeável; de regulação da temperatura corporal (conservação e dissipação do calor); de defesa não-específica (barreira contra microrganismos); de excreção de sais; de síntese de vitamina D; como um órgão sensorial e de sinalização sexual.²

Essas funções podem ser comprometidas se a pele sofrer danos a sua integridade, que chamamos de feridas, as quais são causados por incisões, queimaduras, escaldões e lesões humanas (pé diabético, úlceras venosas, úlceras de pressão, etc.) e quando maltratadas pode resultar em muitos problemas, por exemplo, sangramento, infecção, inflamação, cicatrizes, dificuldade de angiogênese e regeneração. O tratamento eficaz de feridas é um grande desafio para a saúde humana. A falha na cicatrização, processo que consiste em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que ocorra a reconstituição tecidual, e um tempo de cura prolongado aumentam os custos econômicos e sociais para as instituições, profissionais de saúde, pacientes e suas famílias.^{3,4}

Se uma porção da pele é danificada ou destruída, ela deve ser rapidamente reparada através de um mecanismo sequencial chamado de cicatrização. Este mecanismo ocorre em quatro etapas: hemostasia (formação de um coágulo de fibrina e plaquetas); inflamação (recrutamento de leucócitos); proliferação (neovascularização e proliferação celular) e remodelação tecidual.²

Produtos naturais de plantas medicinais têm sido usados para tratar doenças humanas em muitos países e sociedades. Eles são a espinha dorsal da medicina popular e têm atraído atenção devido ao seu potente potencial terapêutico.⁵ Além das potencialidades terapêuticas do tratamento natural ou à base de ervas, elas são baratas, disponíveis e seguras, com efeitos colaterais mínimos em comparação aos medicamentos químicos.⁶ O potencial curativo das plantas medicinais se deve principalmente a uma ampla gama de metabólitos secundários, como glicosídeos, alcaloides, flavonoides, terpenos e taninos.^{5,6}

Os metabólitos secundários das plantas desempenham papéis importantes na fisiologia vegetal e possuem muitas potencialidades terapêuticas, como antivirais, antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e anticâncer.⁷ Os fitoquímicos antimicrobianos, antioxidantes e cicatrizantes estimulam a coagulação do sangue, combatem infecções e aceleram a cicatrização de feridas. Plantas medicinais ricas em polifenóis são relatadas como possuidoras de notável atividade cicatrizante de feridas.^{8,9,10}

Os fenólicos promovem a cicatrização de feridas principalmente devido às suas propriedades adstringentes, antimicrobianas e eliminadores de radicais livres.^{11,12} Componentes polifenólicos como os flavonoides podem promover excelente cicatrização de feridas, provavelmente por meio de propriedades antimicrobianas e antioxidantes, inibindo a peroxidação lipídica, o que leva à prevenção de danos celulares e ao aumento da viabilidade das fibrilas de colágeno.^{13,14} Muitas pessoas nas partes menos desenvolvidas do mundo ainda usam a medicina tradicional, especialmente para tratar feridas.

Dentre as inúmeras espécies vegetais de interesse cicatricial está o bacurizeiro, que pertence à família *Clusiaceae* e ao gênero *Platonia*. A família botânica *Clusiaceae* engloba aproximadamente mil espécies subordinadas a 47 gêneros, dispersos em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Em nove

desses gêneros, cerca de 90 espécies são plantas cujos frutos são comestíveis.¹⁵ No Brasil, o bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma planta nativa da região amazônica e do nordeste do país, de uso popular por sua ação cicatrizante, antimicrobiana, antitumoral, citotóxica e antioxidante.¹⁶ O interesse crescente pelo uso de *P. insignis* está relacionado com as diversas propriedades farmacológicas, desde a sua forma como extrato até o composto isolado de diversas partes da planta.

Essas propriedades farmacológicas estão relacionadas à presença de metabólitos secundários, que desempenham um papel importante na evolução dos vegetais e também são responsáveis pela ação terapêutica das plantas. Nesse sentido, existe na literatura registros de estudos fitoquímicos da *P. insignis* nas cascas das sementes, nos frutos e no caule, na polpa, na semente, nas flores e folhas que mostram a presença de metabólitos secundários como as classes de terpenos, xantonas e fenólicos como constituintes majoritários. A presença desses constituintes mostra várias ações farmacológicas, como atividade antioxidante, citotóxica, anticolinesterásica, antimicrobiana, anticonvulsivante, cicatrizante, antileishmania e gastroprotetora.¹⁷

Portanto, o presente trabalho investigou a presença de metabólitos secundários através da triagem fitoquímica por prospecção preliminar e análises por UPLC; caracterizou parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos dos compostos identificados no UPLC através da ADMET; avaliou os efeitos antibacteriano, antifúngico, toxicológico e o potencial de cicatrização, em feridas cutâneas induzidas em *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, de cremes à base do EEPi e das frações FAPI e FMPI, comparando o efeito desses cremes com uma pomada comercial com utilização no tratamento de feridas cutâneas, descrevendo as observações macroscópicas e microscópicas no processo cicatricial.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar o perfil fitoquímico do extrato etanólico das folhas da *P. insignis* e frações, acetato de etila e metanol, caracterizar parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos, avaliar os efeitos antibacteriano, antifúngico, toxicológico e o processo de cicatrização *in vivo* dos cremes do extrato e frações.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Preparar o extrato etanólico e as frações, acetato de etila e metanol, das folhas da *P. insignis*;
- Realizar a triagem fitoquímica por prospecção preliminar do extrato etanólico das folhas de *P. insignis*;
- Investigar o perfil fitoquímico do extrato e frações das folhas de *P. insignis* por Cromatografia Líquida de ultra Eficiência (UPLC);
- Predizer os parâmetros ADMET dos compostos bioativos identificados no UPLC no extrato e nas frações;
- Desenvolver cremes hidratantes a 5% do extrato e das frações;
- Avaliar os efeitos antibacteriano, antifúngico, toxicológico dos cremes do extrato e frações da *P. insignis*;
- Desenvolver um modelo experimental *in vivo* de lesões, feridas, em ratos e trata-los com os cremes do extrato e frações;
- Calcular o percentual de regressão cicatricial da área das lesões cutâneas tratadas com o extrato e frações;
- Avaliar as diferenças histológicas qualitativas e quantitativas das células inflamatórias e fibroblastos no processo de reparo das lesões cutâneas tratadas com os cremes do extrato e frações.

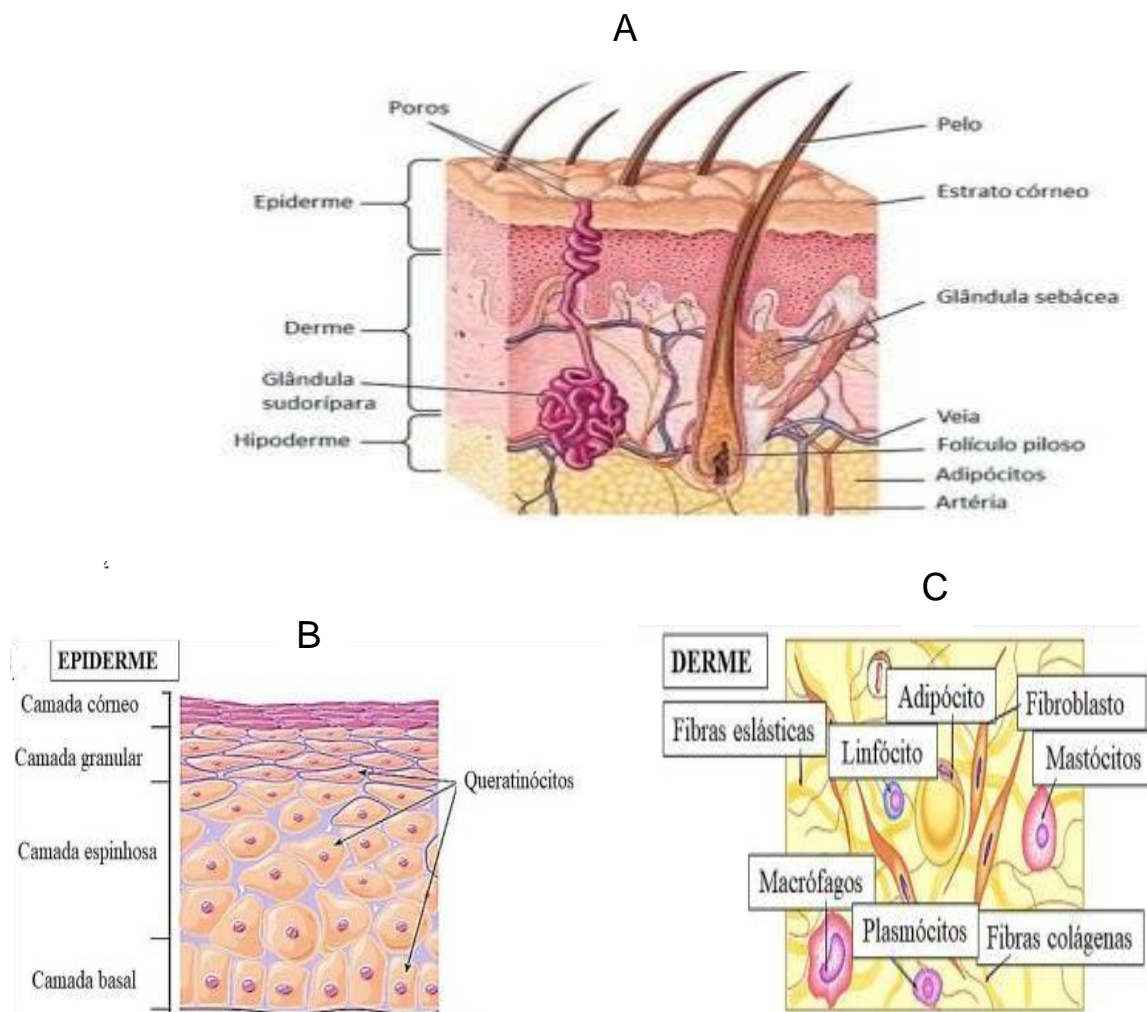
Capítulo 2

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pele, ferimentos e o processo de cicatrização

A pele é um órgão dinâmico e em constante mudança, composto por três camadas principais: epiderme, derme e tecido subcutâneo, a hipoderme. Cada camada é composta por várias subcamadas. Apêndices da pele, como folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas, que desempenham um papel na função geral da pele. A epiderme é a camada externa que você pode ver e tocar e protege contra toxinas, bactérias e perda de fluidos. Consiste em 5 subcamadas de células chamadas queratinócitos. A derme é a camada intermediária da pele que é espessa e elástica, mas firme e está acima da área subcutânea, a hipoderme, que é uma camada ondulada abaixo da epiderme. Assim, o tecido subcutâneo mais interno armazena energia e atua como uma almofada e isolante para o corpo. Além disso, contém adipócitos, fibras de colágeno e vasos sanguíneos.¹⁸ A organização da pele e suas camadas são representados na Figura 2.1.^{19,20}

Figura 2.1. Representação gráfica da organização do tecido epitelial. (A) camadas estão esquematizadas revelando os anexos da derme, como glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, nervos e vasos sanguíneos, e em (B) Disposição e estrutura das camadas que constituem a epiderme e (C), esquematização da derme e seus constituintes.



A estrutura deste órgão pode muitas vezes sofrer alterações, ou discontinuidades, em suas camadas internas ou externas, popularmente chamadas de feridas, cuja origem pode ser oriunda de fatores físicos, químicos e/ou biológicos, tais como: cirurgias, traumas, abrasões ou queimaduras, situação que torna o organismo mais vulnerável e suscetível a ação de micro-organismos patógenos.^{21,22}

Feridas são definidas, genericamente, como injúria que interrompe a continuidade tissular, sendo capaz de atingir desde as camadas superficiais como a derme e a epiderme, ou alcançar estruturas mais profundas como músculos, tendões e ossos. Tais afecções podem ser classificadas tendo por parâmetro uma multiplicidade de variáveis, sendo notória pelo uso clínico o tempo de permanência e a etiologia.²³

Quanto ao tempo de permanência, são classificadas em agudas e crônicas. Sendo as agudas lesões com tratamento e cicatrização breve que respondem rapidamente à terapêutica aplicada. Já as de ordem crônica, conhecidas como

feridas de difícil cicatrização, tendem a seguir um período de mais de seis semanas para ocorrer o reparo tecidual, estando associadas a complicações e comorbidades, além das recidivas.²⁴ Quanto à etiologia, quase sempre estão relacionadas a comorbidades, sendo as mais comuns lesões por pressão, lesões em diabéticos, lesões de origem venosa e/ou arterial.²⁵

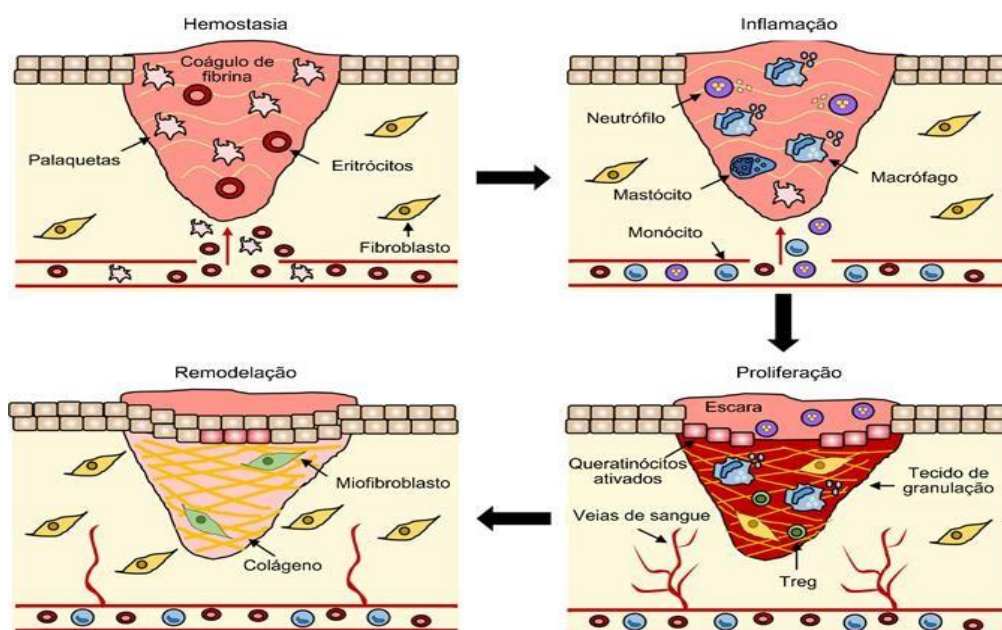
Essas agressões, feridas, que são áreas de comprometimento da integridade da pele, quando ocorre, o organismo inicia uma série de processos complexos para reparar o tecido danificado e restaurar a barreira cutânea, denominado cicatrização. A cicatrização da pele é um processo coordenado e interligado subdividido em quatro etapas básicas de hemostasia, inflamação, proliferação e regeneração ou remodelagem, assim como ilustrado pela figura 2.2.²⁶ Na hemostasia observamos a primeira tentativa de defesa do organismo à lesão, há vasoconstrição e coagulação via ativação de plaquetas, formação de matriz de fibrinas e degranulação plaquetária. Esta etapa é muito importante pois é responsável pela fagocitose de fungos e bactérias que podem chegar até o local.^{27,28,29}

Na inflamação ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, que estimulam a migração celular e promovem a remoção de detritos e microrganismos presentes na ferida. Neutrófilos polimorfonucleares permanecem no leito do ferimento por até dois dias e ficam responsáveis pela fagocitose de patógenos e liberação de radicais livres do processo respiratório, resultando na decomposição de tecidos danificados via proteases. Esta etapa se encerra com a conversão de monócitos em macrófagos e liberação de fatores de crescimento e citocinas que induzem a angiogênese e reepitelização.³⁰

A terceira fase, denominada proliferativa, é marcada pela intensa atividade celular. Durante esta fase, células especializadas chamadas fibroblastos migram para o local da ferida e começam a produzir colágeno, uma proteína fundamental na formação do tecido de granulação, que serve como uma matriz para a regeneração da pele. Além disso, ocorre angiogênese, ou seja, formação de novos vasos sanguíneos, que são essenciais para fornecer nutrientes e oxigênio às células em crescimento. A reepitelização, processo pelo qual células da borda da ferida se proliferam e migram para cobrir a superfície exposta, também ocorre nesta fase. Por fim, a fase de remodelação é responsável pela

organização e maturação do tecido de granulação. Durante esta fase, os fibroblastos continuam a depositar colágeno, que é gradualmente remodelado e reorganizado para formar uma matriz mais resistente e similar ao tecido original. O objetivo final deste processo é restaurar a integridade da pele, conferindo-lhe resistência e função adequadas.^{31,32}

Figura 2.2. Etapas e eventos envolvidos na cicatrização de feridas.



Para que o processo de cicatrização seja eficiente, é necessário que o paciente esteja em boas condições clínicas e que o leito da ferida esteja otimizado. Dessa forma, agentes tópicos e curativos capazes de combater infecções, promover um ambiente úmido, quente, livre de detritos e de reduzir a inflamação, fazem parte do arsenal terapêutico para o tratamento de feridas. Os curativos e agentes tópicos convencionalmente utilizados, em geral, costumam contemplar apenas um desses objetivos, sendo necessária a combinação de tratamentos. Por outro lado, as plantas medicinais podem apresentar mais de uma ação terapêutica, como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e estimulante da migração e proliferação celular, podendo assim, ser bons agentes terapêuticos na cicatrização de feridas.³³

2.2 Plantas medicinais

As plantas medicinais e seus derivados constituem recursos terapêuticos alternativos, em contínuo crescimento de uso, baseado na medicina tradicional ou em programas específicos de estímulo à prática da fitoterapia. Entre os preparados derivados das plantas medicinais, destacam-se as drogas vegetais, que são plantas secas e desidratadas, além dos produtos industrializados obtidos exclusivamente de matérias primas ativas vegetais. Na categoria de industrializados existem os Medicamentos Fitoterápicos, cuja segurança e eficácia são baseadas em evidências clínicas, e os Produtos Tradicionais Fitoterápicos, baseados na tradicionalidade do uso.³⁴

Estima-se que 80% da população mundial utiliza plantas medicinais e seus derivados para as necessidades primárias de atenção à saúde.³⁵ Por serem recursos acessíveis, inclusive por comunidades vulneráveis, a Organização Mundial da Saúde (OMS), incentiva o uso das plantas medicinais e dos produtos fitoterápicos no âmbito da Atenção Primária à Saúde (APS), desde 1978. Neste contexto, a OMS criou o Programa de Medicina Tradicional, objetivando a formulação de políticas públicas de valorização das plantas medicinais e de outras terapias.³⁶

No Brasil, o uso de plantas medicinais integra a prática assistencial dos serviços de saúde, conhecida como medicina popular, que constitui uma rica diversidade étnica e cultural nos saberes familiares. O olhar sensível para essa diversidade motivou a elaboração da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS. Essa prática é justificada pela imensa biodiversidade que o país apresenta no contexto mundial em plantas, favorecendo a fitoterapia como recurso terapêutico.³⁷

As terapias naturais em uma abordagem integrativa, podem auxiliar no alívio dos principais sintomas, além de possuir rol de comprovação fundamentada cientificamente quanto ao potencial para o aumento da imunidade, dando suporte imunológico, auxiliando na prevenção de infecções, na resposta anti-inflamatória e redução da mortalidade.³⁸

Dados de segurança de muitos fitoterápicos ainda são insuficientes, especialmente para gestantes, lactantes e crianças, sendo o uso contraindicado, exceto sob supervisão médica. Desta forma, assim como ocorre para os medicamentos sintéticos convencionais, os profissionais de

saúde devem priorizar o uso racional dos fitoterápicos, considerando a necessidade de prescrição adequada, acompanhamento terapêutico e notificação de reações adversas.³⁹ Contudo, para ter conhecimento dos malefícios ou benefícios que as plantas podem causar aos seus usuários é necessário que haja identificação dos seus constituintes. Esse procedimento é denominado Fitoquímica, desenvolvida pela química dos produtos naturais, com o intuito de analisar a estrutura química e as propriedades biológicas das plantas.⁴⁰

2.3 *Platonia insignis* Mart. – Bacuri

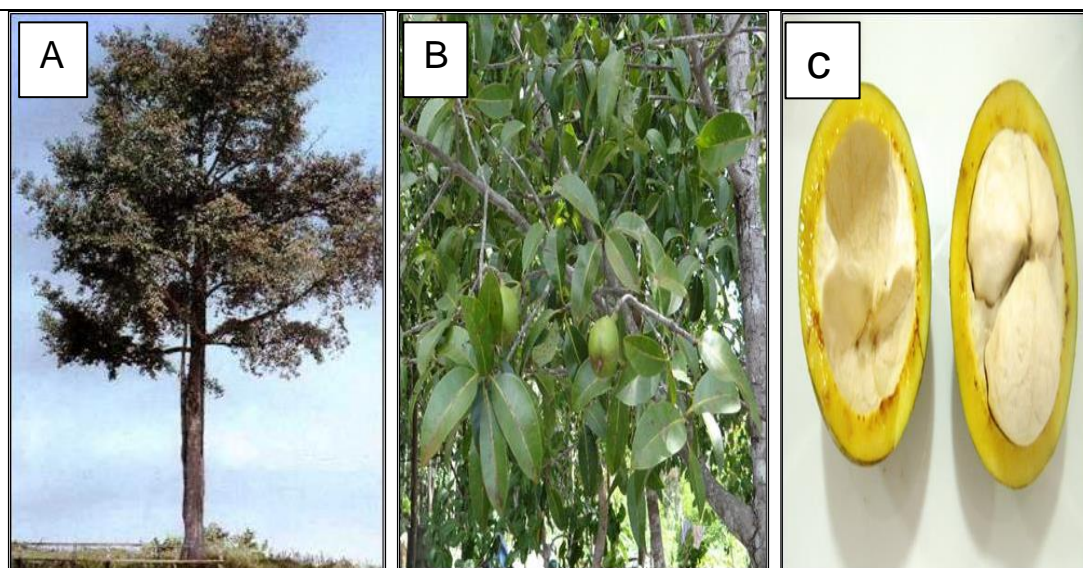
Platonia insignis Mart., pertencente à família Clusiaceae, é uma espécie arbórea encontrada principalmente na Amazônia.⁴¹ Apesar de ser originária da Amazonia e Pará, *Platonia insignis* se espalhou em direção ao Nordeste do Brasil, chegando aos Estados do Maranhão ao Piauí. É encontrada espontaneamente nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Goiás, até chegar ao Pará. Nessas localidades é encontrada em áreas de florestas primárias, com exceção dos estados de Roraima e Tocantins, que também é encontrado em florestas secundárias. Alguns exemplares podem ser encontrados no estados do Ceará e Pernambuco, mas não estão naturalmente dispersos.⁴² A figura 2.3⁴³ mostra os locais de ocorrência da *P. insignis*.

Figura 2.3. Locais de ocorrência da *Platonia insignis* Mart⁴³.



O bacurizeiro, nome pelo qual a *Platanus insignis* é popularmente conhecida, é uma árvore economicamente importante, pois a população em geral tem grande apreço pelo seu fruto. Porém, essa espécie também possui propriedades medicinais que merecem destaque, como antioxidante, antiparasitária, estimulante do sistema nervoso central (SNC), dentre outras.⁴⁴ Os aspectos gerais da planta são ilustrados na Figura 2.4.

Figura 2.4. Aspectos gerais da *Platanus insignis*. (A) Árvore; (B) folhas; (C) fruto.



Fonte: Autores, 2024.

O interesse crescente pelo uso de *P. insignis* está relacionado com as diversas propriedades farmacológicas presentes nessa substância, desde a sua forma como extrato até o composto isolado de diversas partes da planta. As propriedades farmacológicas incluem cicatrizante, antimicrobiana, digestiva, diurética, antitumoral, citotóxica e antioxidante. Essas propriedades se dão por meio da presença de metabólitos secundários presentes na *P. insignis* e vários estudos relatam que as frações voláteis e os extratos polares de suas sementes são ricos em atividades antioxidantes, anti-inflamatórios, anticonvulsivantes, antiparasitários e imunorreguladores.^{45,46} Além disso, os terpenos e compostos fenólicos se destacam como seus principais compostos bioativos.⁴⁷

Seu perfil fitoquímico demonstra a presença de uma grande variedade de substâncias, como flavonoides, cumarinas, terpenos, xantonas, entre outros compostos químicos, que possuem atividades de interesse biológico.⁴⁸ Portanto, o beneficiamento dos produtos derivados da *Platonia insignis*, sob a perspectiva de futuras aplicações terapêuticas, poderia gerar maior renda para as localidades onde a planta é comumente cultivada. Haja visto que a comercialização de cosméticos e medicamentos derivados de produtos naturais envolve questões socioeconômicas, devido ao custo benefício do processo e à geração de emprego e renda local e ambientais, relacionadas à exploração sustentável desta fonte natural renovável, que é a biodiversidade brasileira.^{49,50} Um sumário das atividades biológicas descritas na literatura para algumas das partes da planta pode ser verificado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Atividades biológicas e uso etnofarmacológico da *Platonia insignis* Mart.

Partes da planta	Atividade biológica	Referências
Semente	<p>Diarreia, problema de pele, Dores de ouvido; Picadas de insetos, aranhas e cobras; Reumatismos e artrites; Cicatrizante; atividade leishmanicida;</p> <p>Antioxidante; Anti-inflamatória ; citotoxicidade em Artemia salina; efeito genotóxico em fibroblastos de pulmão de hamster chinês; efeito anticonvulsivante induzidas por pilocarpina; Efeito protetor, reduzindo a peroxidação lipídica; Atividade anticonvulsivante; Efeito estimulador no SNC em camundongos.</p> <p>Tratamento de lesões relacionadas à leishmaniose cutânea.^{51,52,53,54,55}</p>	<p>Costa Júnior et al., 2013; Costa Júnior et al., 2011; Costa Junior et al., 2010; Moraes e Gutjahr, 2009; LUSTOSA et al., 2021.</p>
Polpa	Atividade antioxidante. ⁵⁶	Rufino et al., 2010.
Casca do tronco	Tratamento de eczemas, vírus do herpes e tratamento de dermatites. ⁵⁷	Shanley e Medina, 2005.
Folhas	Ação antioxidante in vitro	SILVA et al., 2020;

	pelos métodos TBARS, sequestro de radicais hidroxilas (OH) e óxido nítrico (NO), atividade citotóxica e leishmanicida. Atividade antifúngica contra a <i>Candida albicans</i> . Efeito de diminuição da síndrome do desconforto respiratório agudo. ^{58,59}	SILVA et al., 2022
--	--	--------------------

Fonte: Autores, 2024.

2.4 Toxicidade de substâncias candidatas a fármacos e Estudo in silico

Os fitoterápicos são medicamentos produzidos a partir de matéria-prima vegetal, com propriedades profiláticas e/ou curativas, e necessitam assegurar qualidade, eficácia clínica e segurança para uso e comercialização, comprovados por meio de levantamentos farmacológicos e ensaios clínicos.⁶⁰

As atividades de pesquisa na área de medicamentos têm passado por constante evolução. A descoberta e isolamento de substâncias e o potencial bioativo molecular contam com um arsenal de testes pré-clínicos e clínicos, envolvendo experimentos que buscam alcançar os padrões de segurança e eficácia exigidos para os fins comerciais farmacêuticos.⁶¹ Neste sentido, vale destacar o estudo *in silico* dos parâmetros farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) que são importantes para elucidar a forma mais segura de usufruir do potencial bioativo de moléculas, ligando esse potencial aos ensaios de toxicidade.

Existe uma percepção na população que o uso de plantas no tratamento de doenças é natural, seguro, barato e eficaz, sendo essas, muitas vezes, utilizadas no

tratamento de doenças crônicas associadas com medicamentos convencionais.⁶² No entanto, antes de serem usadas para fins terapêuticos, as substâncias precisam passar por testes de toxicidade. Há uma grande importância na avaliação da ação biológica em produtos naturais, assim os ensaios toxicológicos acrescentam informações para garantir a devida segurança na aplicação dos mesmos. Os experimentos toxicológicos têm por objetivo elucidar os limites de concentração de drogas/fármacos na ingestão destas substâncias e os possíveis efeitos colaterais que podem aparecer no homem após sua administração.⁶³ Assim sendo, a análise de toxicidade em *in silico* tem uma importância fundamental no início de estudos com plantas medicinais.

Os modelos *in silico* são empregados nos estágios iniciais de pesquisas que visam o desenvolvimento de moléculas naturais e sintéticas com potencial terapêutico. Esses ensaios são usados de forma crescente como triagem preliminar e devem ser associados a outros estudos, como *in vitro* e *in vivo*. Este procedimento visa diminuir a quantidade de moléculas avaliadas, otimizando tempo e recursos na identificação de novas substâncias, além de possuir reprodutibilidade, rapidez e exatidão.⁶⁴ Dessa forma, pretende-se maximizar as chances de sucesso do candidato a fármaco.

Neste contexto, o desenvolvimento de fármacos é um processo complexo, que se inicia com a identificação de uma molécula com alta afinidade por um alvo terapêutico, seguida por análises para avaliar suas propriedades farmacológicas, farmacocinéticas e toxicológicas, tanto *in silico*, *in vitro* como *in vivo*. Sendo esta etapa denominada de pré-clínica e determinante para a continuidade do processo.⁶⁵

Capítulo 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Coleta do material vegetal

Inicialmente, foi realizado o cadastro do projeto, na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN, sob o número ACB65D0. As folhas de *P. insignis* foram coletadas em 13 de fevereiro de 2022, na cidade de Timon no Maranhão, Brasil, nas seguintes coordenadas (04° 50' 56,6" S 042° 05' 04,8" W). Uma exsicata foi depositada no Herbário Graziela Barroso – UFPI, sob o registro TEPB 31.718.

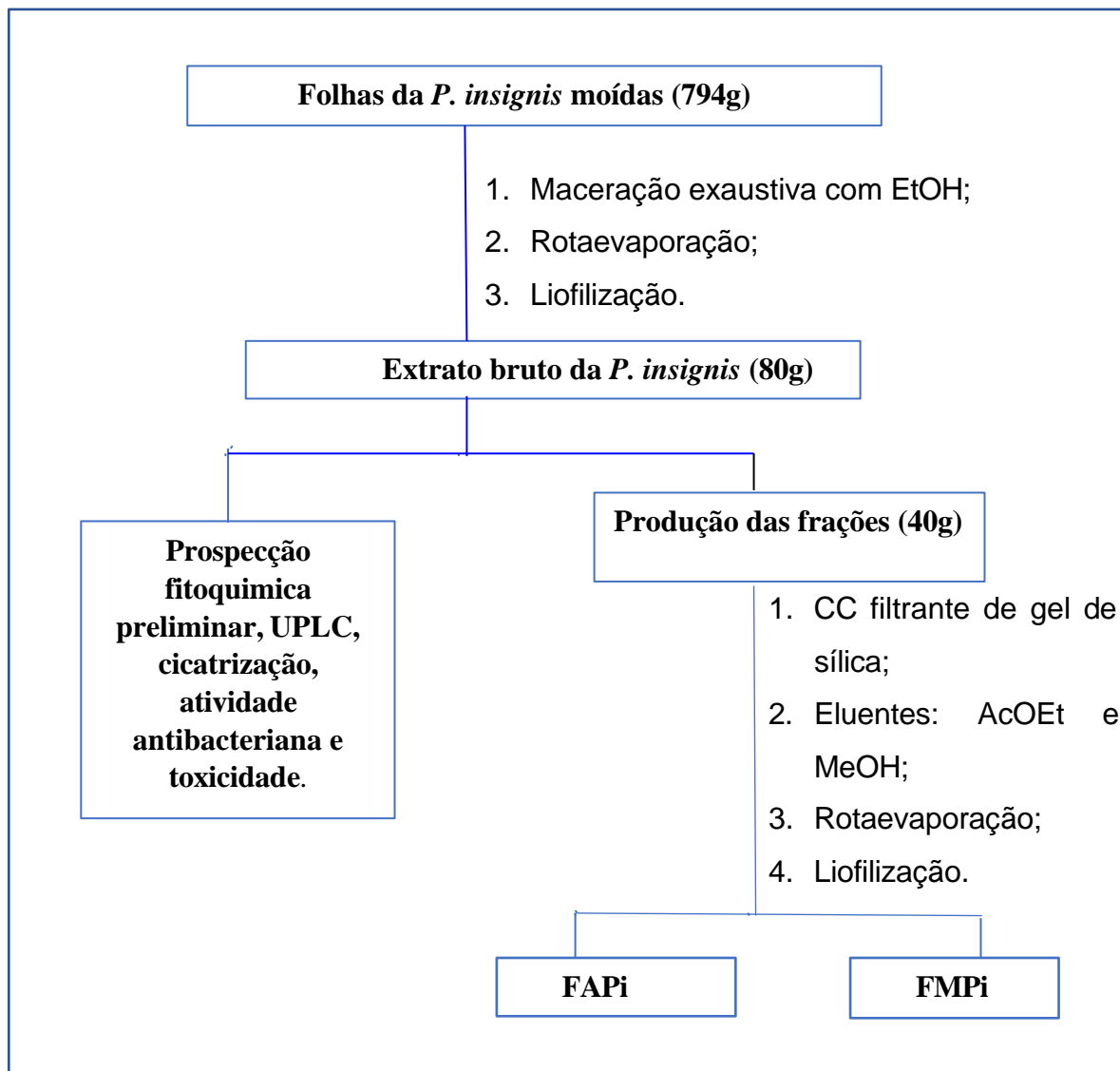
3.2 Preparação do extrato e frações

O extrato das folhas de *P. insignis* foi obtido da seguinte maneira: as folhas foram secas à temperatura de 25°C e submetidas à trituração em um moinho de facas, obtendo uma massa de 794 g de material que foi levado para maceração com etanol por oito vezes em um intervalo de 24 horas. Na etapa final desse processo, as soluções foram reunidas e destiladas no evaporador rotativo com a pressão reduzida. A água residual foi retirada pelo processo de liofilização, restando uma massa de 80 g, com um rendimento final de 10,1% do extrato EtOH das folhas de *P. insignis* (EETPi).

As frações foram obtidas usando cromatografia filtrante em coluna de gel de sílica (5x30cm, 80g), onde foi realizada utilizando uma amostra de 40g do extrato das folhas de *P. insignis*, a qual foi solubilizada em clorofórmio e metanol com 10g de sílica para a obtenção da “farofa de sílica” e, posteriormente, foi utilizado o evaporador rotativo na mistura para a retirada do solvente até a obtenção de um pó homogêneo, que de forma gradiente, foi eluída com os respectivos solventes: acetato de etila - AcOEt (100%) e metanol - MeOH (100%) com o aumento da polaridade em cada eluente. No final, o solvente foi removido com o evaporador rotativo e o extrato das duas frações foram obtidos. A figura 3.1 mostra o

Fluxograma da produção do extrato bruto e das frações AcOEt e MeOH da *P. insignis*.

Figura 3.1. Fluxograma da produção do extrato bruto e das frações



Fonte: Autores, 2024.

3.3 Triagem fitoquímica por prospecção preliminar do extrato etanólico das folhas de *P. insignis*

A triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *P. insignis* foi realizada segundo o protocolo descrito por Matos (2009)⁶⁶ para identificação de flavonoides, taninos, saponinas, triterpenoides e alcalóides, e os resultados obtidos

fundamentam-se nas reações de precipitação, mudança de coloração e nas propriedades físico-químicas dos constituintes químicos que compõem a planta.

3.4 Análise por UPLC-DAD-UV do extrato etanólico e das frações das folhas de *P. insignis*

Foi realizada a determinação de alguns marcadores de flavononas derivados da Naringenina e Pinocembrina e de flavonóis derivados pinobanksina, utilizando 6 padrões analíticos da sigma-aldrich ou extrasynthese, sendo eles, Naringenina (Sig), pinobanksina (sig), kaempferol (Ext.), pinocembrina (Sig), galangina (Sig.), pinostrombina (Sig.) por análise de cromatografia líquida de ultra eficiência UPLC-DAD-UV com amostrador automático (SIL-20A), utilizando Software Labsolution – Shimadzu e coluna cromatográfica: C18 Kinitex da phenomenex (150 mm de comprimento x 4.6 mm de diâmetro e 5 µm de tamanho das partículas). A temperatura da coluna foi 33°C. A fase móvel foi realizada com uma solução em água milliQ contendo 0,1% de ácido fórmico e metanol grau HPLC. O volume de injeção foi de 2 µL com sistema de autoinjeção e o tempo da análise foi de 40 minutos. Os padrões analíticos foram preparados pesando-se aproximadamente 1mg de cada padrão e transferiu-se para vial HPLC, um frasco pequeno de 1,0 mL, solubilizando cada amostra com metanol grau HPLC para obter uma solução estoque de 1,0 mg/mL. A curva de calibração dos padrões analíticos foi preparada da seguinte forma: Solução estoque de 200 µg/mL a 1000 µg/mL de cada padrão foi preparado em metanol e diluído para concentrações entre 0,3 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,75 µg/mL; 1,0 µg/mL; 2 µg/mL, 5 µg/mL, 15 µg/mL, 30 µg/mL, 60 µg/mL e 75 µg/mL também com metanol para obter as respostas no UPLC-DAD e ensaios de adequabilidade linearidade de resposta. Para o preparo das amostras 10 mg do extrato e das frações da *P. insignis* foram solubilizados em metanol grau HPLC (5mL) e filtrados em unidades filtrantes de 0,22 µm, transferidos para frascos do tipo ampicilina para obter concentração de 2 mg/mL. Em seguida, preparou-se soluções de 0,5 mg/mL ou de 2 mg/mL e transferiu-se para vials HPLC e diretamente injetadas pelo auto injetor SIL do UPLC-DAD-UV.

3.5 Predição ADMET

Para o estudo *in silico* foram usados os constituintes químicos das folhas de *P. insignis* identificados no estudo cromatográfico (UPLC). Inicialmente, as estruturas tridimensionais dos ligantes foram obtidas a partir do banco de dados de estruturas químicas PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).⁶⁷ A partir dos ligantes obtidos utilizaram-se as plataformas SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>)⁶⁸ e PreADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr/>)⁶⁹ para a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos (Tabela 3.1).^{70,71,72,73,74,75,76,77,78,79}

Tabela 3.1. Parâmetros usados para a predição farmacocinética e toxicológica usando os softwares PreADMET e SwissADME

Parâmetros	Valores de Referência	Referência
HIA (Absorção Intestinal Humana)	Alto 70 -100 % Médio 20 – 70 % Baixo < 20 %	ZHAO et al., 2001
Caco-2 (Células do Adenocarcinoma de Cólon Humano)	Alto > 70 nm/sec Médio 4- 70 nm/sec Baixo < 4 nm/sec	YAMASHITA et al., 2000
MDCK (Células renais caninas)	Alto > 500 Médio 25- 500 Baixo < 25	IRVINE et al., 1999
PPB (Ligação com proteínas plasmáticas)	Forte > 90 % Fraco < 90 %	WERMUTH, 2003
BBB (Barreira hematoencefálica)	Alto > 2 Médio 0,1 – 2 Baixo < 0,1	MA; CHEN; YANG, 2005
CYP_2C19_inibição		

Capítulo 3 - Metodologia Experimental

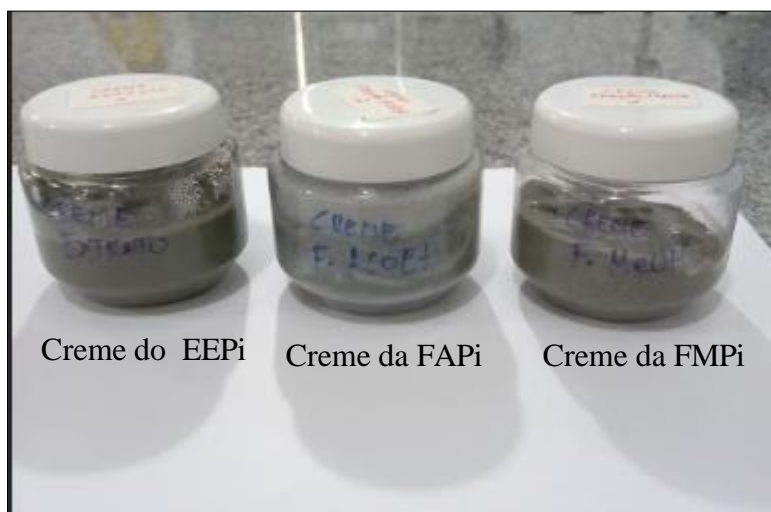
CYP_2C9_inibição	Isoenzimas	LI, 2001
CYP_2D6_inibição	P450	
CYP_2D6_substrato		
CYP_3A4_inibição		
CYP_3A4_substrato		
Teste de Ames	Não mutagênico	
	Mutagênico	AMES; DURSTON; YAMASAKI; LEE, 1973
Carcinogenicidade em rato		
Carcinogenicidade em camundongos	Positivo Negativo	
hERG_inibição	Alto risco Médio risco Baixo risco	ALVES; BRAGA; ANDRADE 2018; YU et al., 2015
Coeficiente de permeabilidade da pele (Kp)	log Kp superior a -2,5 cm/h (-0,000694 cm/s) molécula penetrará na pele	AWADELKAREEM et al., 2022
Fonte: Autores, 2024.		

3.6 Preparo das formulações (cremes) contendo extrato e frações (FAPi e FMPI) das folhas da *P. insignis*

Com a intenção de produzir uma formulação eficiente que permitisse a incorporação tanto do extrato como das frações das folhas da *P. insignis*, foram testadas duas formulações, gel e creme, sendo que a formulação que melhor incorporou os princípios ativos foi um creme hidratante (adquirido em farmácia de manipulação), composto de álcool cetearílico, polisorbato, petrolato, metilparabeno, propilparabeno, EDTA dissódico, imidazolidinil uréia, propilenoglicol e glicerina. O creme hidratante foi usado como veículo para o preparo dos cremes da seguinte forma: foi pesado, em balança analítica, 95g do creme e a ele incorporado 5g do

extrato bruto de *P. insignis* até sua total homogeneização. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes, uma incorporando a fração AcOEt e a outra incorporando a fração MeOH. Ao final dos procedimentos obtive três cremes (um do EEPi, outro da FAPI e outro da FMPI) de 100g cada, todos nas concentrações de 5% (Figura 3.2)

Figura 3.2. Cremes produzidos das folhas de *P. insignis* EEPi, FAPI e FMPI.



Fonte: Autores, 2024.

3.7 Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do creme base (veículo) e dos cremes do EEPi, FAPI e FMPI pelo método de difusão em poço

3.7.1 Cepas microbianas utilizadas e preparo do inóculo

Foram selecionados para avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica dos cremes, as espécies bacterianas *Staphylococcus aureus* – ATCC25923 (bactéria gram-positiva), *Escherichia coli*- ATCC25922 (bactéria gram-negativa) e uma espécie fúngica *Candida albicans* - ATCC10231 (uma levedura).

Preparou-se os inóculos das espécies microbianas a serem testadas, padronizando-os pelo método de suspensão direta das colônias, em solução salina esterilizada 0,9%, a partir de colônias crescidas por 24 horas em meio BHI (Brain Heart Infusion ágar – HIMEDIA) no caso das espécies bacterianas e por 48 horas em meio Sabouraud (HIMEDIA), no caso da espécie fúngica. Todas as culturas

semeadas foram incubadas à temperatura de 37° C em estufa de crescimento tipo BOD (demanda bioquímica de oxigênio). A suspensão de células foi ajustada para uma concentração de 1×10^8 UFC/mL, que corresponde a solução padrão 0,5 da escala de McFarland.⁸⁰

3.7.2 Teste de suscetibilidade por meio de difusão em poço

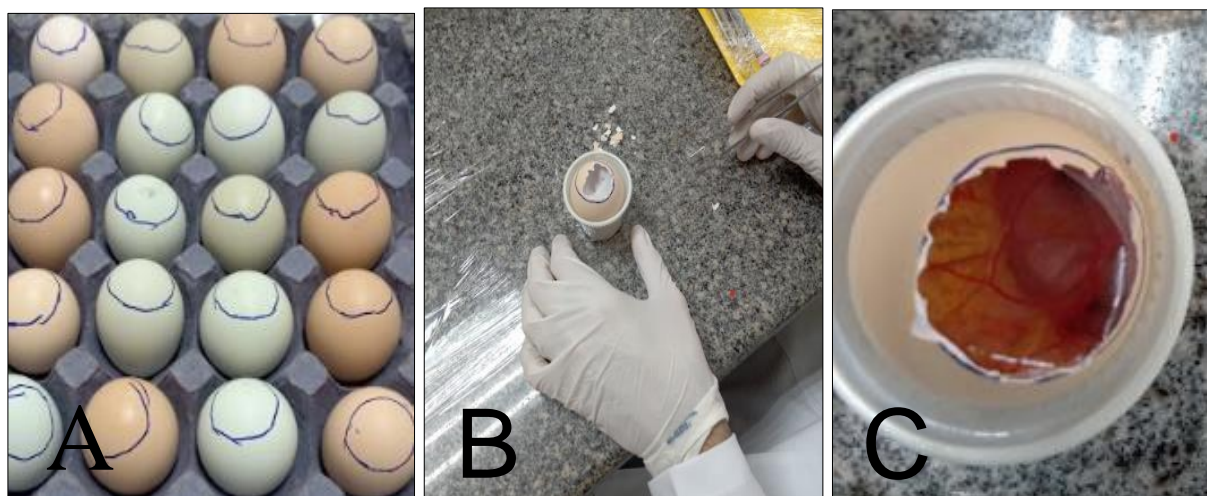
A análise da atividade antimicrobiana e antifúngica dos materiais frente às bactérias e a levedura, foi executada pelo método de difusão em poço⁸¹ com adaptações. Foram realizados 4 orifícios de 6 mm de diâmetro na superfície do meio de cultura contido nas placas de Petri com auxílio de um molde formando os poços. As placas foram inoculadas com as suspensões bacterianas com auxílio de um swab esterilizado e então os poços foram preenchidos com 30 µL dos cremes a serem testados. Após a adição dos cremes aos poços, as placas foram incubadas a 37°C em estufa BOD por um período de 24 horas para as bactérias e 48 horas para a levedura. Os halos de inibição do crescimento, quando formados, tiveram os diâmetros mensurados por meio de uma régua milimetrada. Os testes foram realizados em triplicata e foram considerados a média das três repetições.

3.8 Avaliação da toxicidade dos cremes do EEPi, FAPi e da FMPi pelo teste HET-CAM

Para a realização do teste foram selecionados ovos frescos de galinha (*Gallus sp*) incubados no período de 9-10 dias, período no qual o embrião não chegou a desenvolver os nervos e a percepção da dor nesse período foi inativa, em incubadora modelo Premium Ecológica IP70, com temperatura regulada em 38°C \pm 0,5°C e umidade relativa de 70% \pm 10%. No 10° dia de incubação, a câmara de ar foi demarcada (Figura 3.3 A) e a casca do ovo retirada ao seu redor de modo que a membrana da casca seja evidenciada. Após exposição da membrana da casca do ovo (Figura 3.3 B), a mesma foi lavada durante 30 segundos com solução salina (NaCl) 0,9% em temperatura de 37°C para auxiliar na sua retirada, cuidadosamente, com uma pinça para revelar a membrana córioalantóica (CAM) altamente vascularizada. (Figura 3.3 C). Em seguida, foram aplicados 0,3 ml dos cremes, diluídos em água destilada a 10%, em teste diretamente na CAM, observando as reações durante um período de 300 segundos. O tempo para o aparecimento dos

eventos, hemorragia (sangramento dos vasos), lise vascular (desintegração do vaso sanguíneos) e coagulação (desnaturação proteica intra e extravascular), foram anotados, monitorados e registrados (fotos) em intervalos de tempo fixos de 30 segundos, 120 segundos e 300 segundos.^{82,83}

Figura 3.3 Protocolo geral do teste HET-CAM.



Fonte: Autores, 2024.

O tempo para lise, hemorragia e coagulação receberam uma pontuação específica de acordo com o tempo em que cada evento aconteceu. Esta relação pode ser observada na Tabela 3.2^{83,84}

Tabela 3.2 Esquema de pontuação para testes de irritação com o método de teste.

EFEITOS	PONTUAÇÃO		
	0,5 min (30s)	2 min (120s)	5 min (300s)
LISE	5	3	1
HEMORRAGIA	7	5	3
COAGULAÇÃO	9	7	5

Em seguida, as pontuações foram somadas obtendo um valor numérico único, evidenciando a capacidade de irritação dos cremes testados em uma escala comum que varia de 0 a 21. O teste foi realizado em sextuplicata e, com os resultados obtidos, determinou-se uma média (entre 0 a 21), indicado às categorias irritantes e não-irritante como é observado na tabela 3.3.^{83,84}

Tabela 3.3 Categoria de irritação de acordo com a faixa de pontuação do HET-CAM.

FAIXA DE PONTUAÇÃO	CATEGORIA DE IRRITAÇÃO
0 a 0,9	Não rotulado
1 a 4,9	ligeira irritação
5 a 8,9	Irritação moderada
9 a 21	Irritação grave

3.9 Animais

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Estadual do Piauí sob protocolo 006122/2023-81 – CEUA/UESPI. Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus*), linhagem *Wistar*, machos e fêmeas com idade entre 12 a 16 semanas, pesando entre 250 a 300 g, cedidos pelo Biotério do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade (NPBio – UESPI). Os animais foram mantidos em sala climatizada e acondicionados em gaiolas plásticas sob temperatura constante de 23 ± 1 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Os ratos foram divididos em 5 grupos experimentais, com 6 ratos em cada grupo, como descrito na Quadro 3.1.

Quadro 3.1 Divisão dos animais em grupos experimentais

Grupo	Descrição
G1–Controle negativo	Tratado com veículo: creme base.
G2–Controle positivo	Tratado com o Fármaco Iruxolmono (colagenase 1.2u)
G3 - (EEPi)	Tratado com creme do extrato de concentração 5%
G4 - (FMPI)	Tratado com o creme da fração metanólica de concentração 5%
G5 - (FAPi)	Tratado com o creme da fração acetanólica de concentração 5%

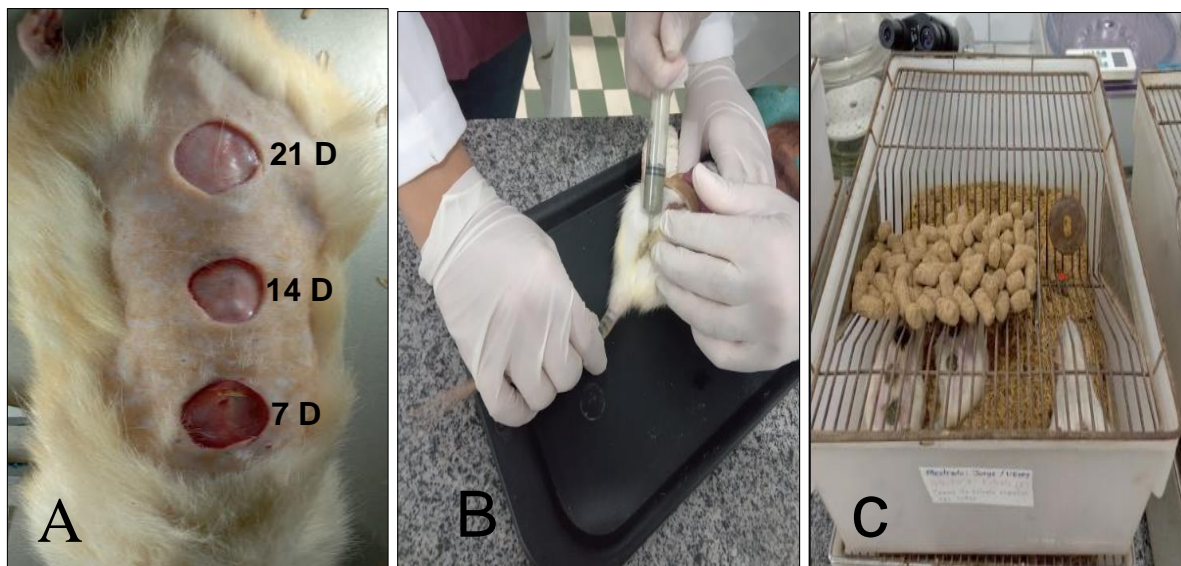
Fonte: Autores, 2024.

3.10 Protocolo experimental

3.10.1 Preparo dos animais e procedimento de tratamento no reparo tecidual

Os animais foram previamente pesados e receberam por via subcutânea, um pré-tratamento com atropina na dose de 0,01 mL para cada 100 g de peso corpóreo, aguardando repouso de 15 minutos para o procedimento anestésico. Em seguida, os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de cetamina 10% (0,1ml/100g de peso corpóreo) e cloridrato de xilazina 2% (0,1 ml/100g de peso corpóreo) e cada animal foi posicionado em decúbito dorsal, imobilizado em prancha operatória, submetido à tricotomia na região dorsal e assepsia com povidine tópico. Posteriormente, foram realizadas 3 lesões cirúrgicas, em cada animal, de forma padronizada, na região anatômica do dorso, com área e profundidade iguais para todos os animais. Para a realização das feridas, a remoção circular da pele de aproximadamente 1 cm de diâmetro, utilizou o auxílio de um punch metálico (instrumento dotado de uma superfície circular cortante) até expor a fáscia muscular. Com a ajuda de pinça e tesoura, as lesões foram induzidas permitindo a retirada completa da epiderme e parte da derme (Figura 3.4A). A homeostasia da região da ferida foi realizada por compressão suave digital, durante 2 min, com gaze estéril umedecida em solução de cloreto de sódio a 0,9 %.⁸⁵

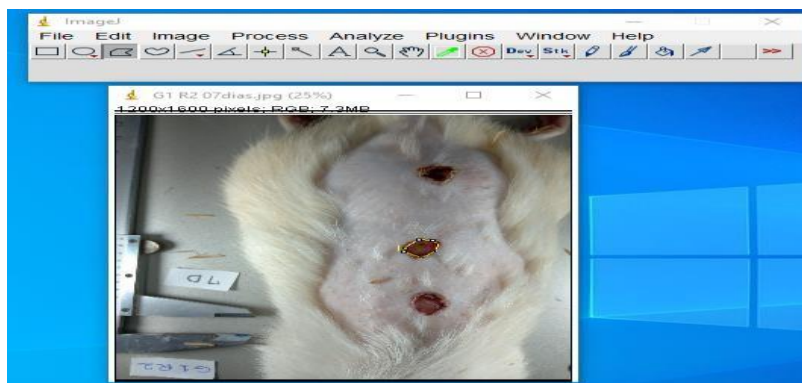
Após o procedimento cirúrgico, os animais dos 5 grupos experimentais foram tratados da seguinte maneira: grupo I controle negativo (creme base), grupo II controle positivo (fármaco), os grupos III, IV e V com os cremes do EEPi, da FMPI e da FAPI, respectivamente (Figura 3.4B), na frequência de uma vez ao dia com duração de 7, 14 e 21 dias. Em seguida, foram recondicionados nas caixas específicas, sendo mantidos durante todo o experimento em boas condições de higiene, e alimentados com dieta padrão do biotério, ração (LabinaTM) e água *ad libitum*, ou seja, permitindo que o animal tenha acesso ilimitado à água (Figura 3.4C).

Figura 3.4 Procedimento de tratamento no reparo tecidual

Fonte: Autores, 2024.

3.10.2 Avaliação macroscópica - área de regressão dos ferimentos

Os animais tiveram a área de suas lesões aferidas a partir de imagens capturadas com câmera digital, fixada em tripé e mantida à distância constante de 30 cm da ferida cirúrgica. As imagens foram obtidas no pós-operatório 7, 14 e 21 dias e de cada grupo e posteriormente importadas para o software Image J® para a avaliação macroscópica, como mostrado na figura 3.5. A área inicial foi comparada com as demais áreas em todos os animais dos diferentes grupos. Após tratamentos dos dados no programa Excel, a regressão cicatricial foi mensurada em porcentagem.

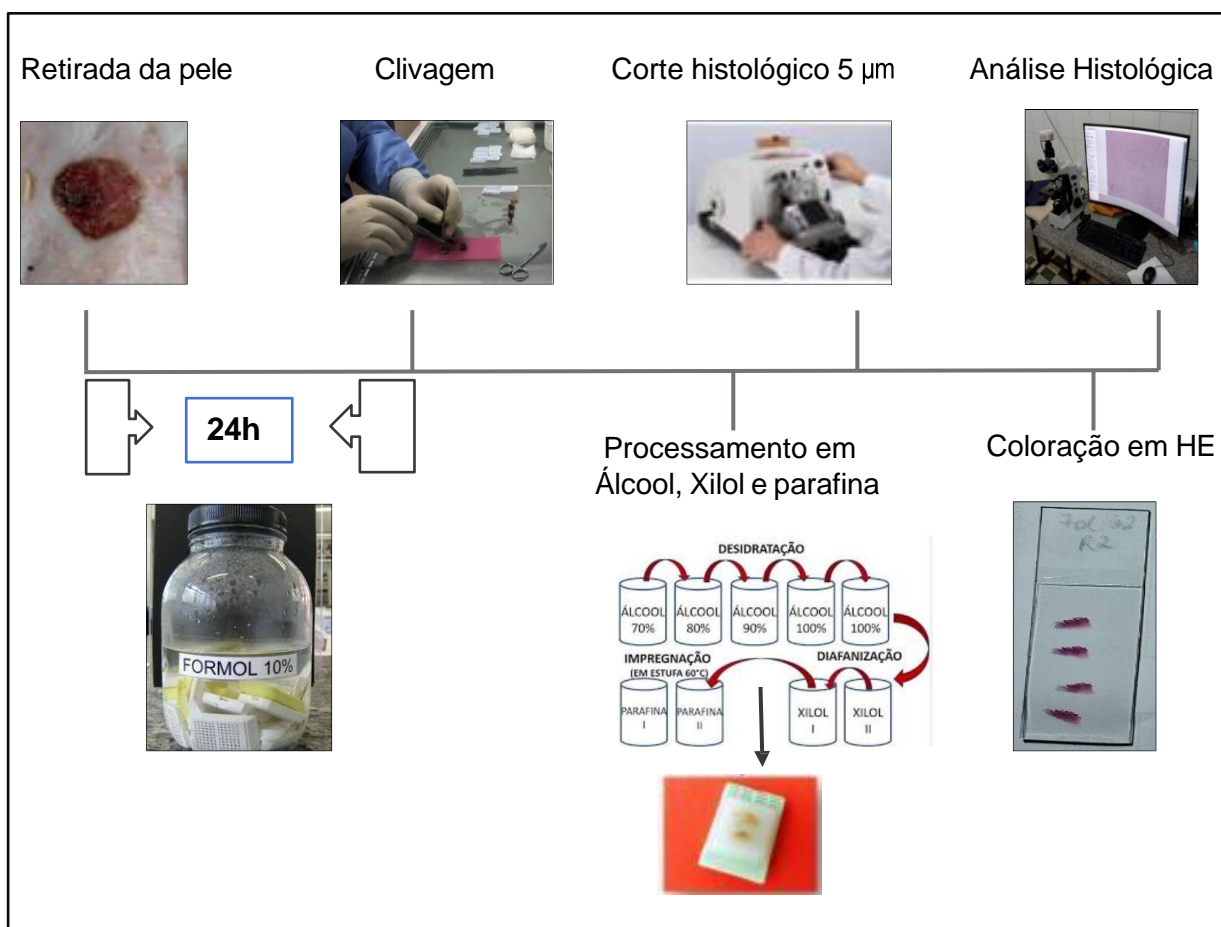
Figura 3.5 Aferição dos ferimentos usando o software Image J®

Fonte: Autores, 2024.

3.10.3 Avaliação microscópica - análise histológica qualitativa e quantitativa

Todos os animais de cada grupo, foram eutanasiados por injeção intramuscular excessiva de cetamina/xilazina sete, quatorze e vinte e um dias, após o procedimento cirúrgico. Um fragmento elíptico de pele centrado pela ferida e com margem de pele íntegra foi removido de cada animal e fixado em solução tamponada de formalina a 10% durante 24 horas. Duas a três amostras transversais desses fragmentos foram submetidas ao processamento histológico de rotina em histotécnico Lupetec PT 05 TS e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo Lupetec MRP 09, obtendo-se secções com 5 μ m de espessura. Para o estudo histológico qualitativo, os cortes histológicos foram corados pela hematoxilina-eosina (H.E.) e examinadas em microscópio óptico trinolocular Olympus CX31, modelo YS100 equipado com câmera digital (Bell & Howell, EU 16.0 Plus, U.S.A.), como é mostrado na figura 3.6. Para efeito de comparação dos grupos na análise qualitativa, as preparações histológicas foram fotografadas sempre no centro das lesões.

Figura 3.6 Processamento histológico



Fonte: Autores, 2024.

Como o processo de cicatrização ocorre da periferia para o centro, a documentação fotográfica, para efeitos comparativos, foi feita no centro das lesões. Para quantificação das células inflamatórias e fibroblastos, três campos microscópicos não coincidentes de cada lâmina foram analisados sob um aumento de 400 vezes e fotografados. As imagens digitalizadas foram analisadas usando o software de análise de imagem Image-J® (versão 1:32 para Windows 10).

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Triagem fitoquímica por prospecção preliminar do extrato etanólico das folhas de *P. insignis*

No estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *P. insignis* por prospecção preliminar, foram identificadas classes de compostos secundários através dos resultados de coloração e precipitação, por meio das propriedades químicas que compõem o material vegetal. Após análise, observou-se que o extrato apresentou resultado positivo para 5 classes investigadas conforme mostrado no quadro 4.1.

Quadro 4.1 Triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Platonia insignis*.

Classe de compostos	Resultado esperado	Folhas de <i>P. insignis</i>
Alcaloides	Formação de um precipitado floculoso	Positivo
Flavonoides	Variável - parda a vermelha	Positivo
Saponinas	Espuma persistente e abundante (colarinho)	Positivo
Taninos	Variável - azul e vermelho	Positivo
Esteroides	Azul seguido de verde permanente	Positivo

Fonte: Autores, 2024.

A presença dessas 5 classes identificados no extrato etanólico de *P. insignis* corroboram com os resultados encontrados nos estudos de Rocha (2017)⁸⁶, onde sua análise fitoquímica do extrato das folhas *P. insignis*, coletadas em São Luís no Maranhão, mostrou a presença de fenóis (taninos, catequinas e flavonoides), esteroides, alcaloides e saponinas. Os estudos feitos por SILVA et al. (2021)⁸⁷ com o

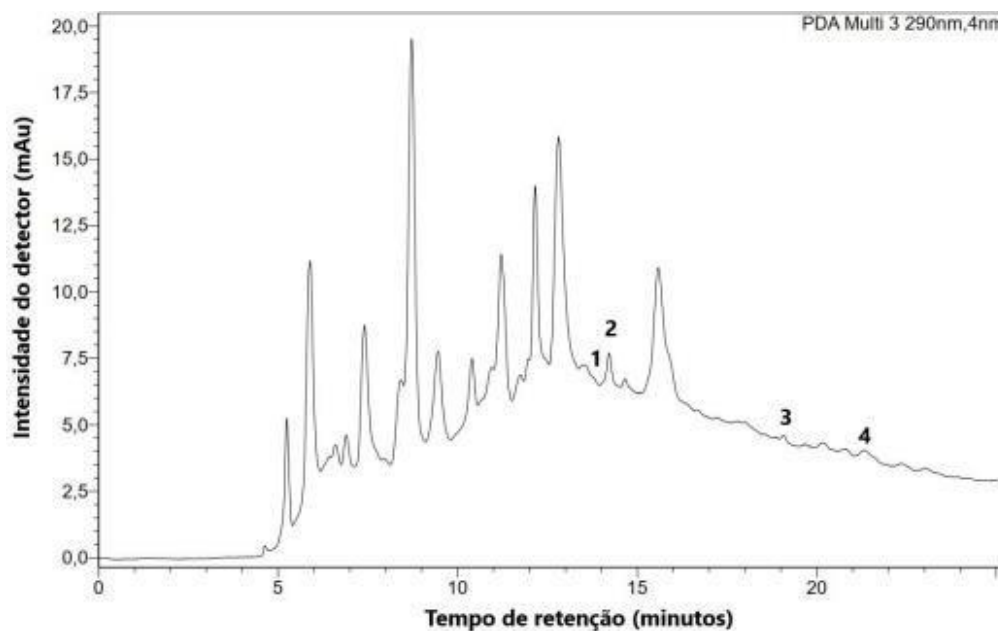
extrato bruto dos galhos da *P. insignis* mostram que são ricos em polifenóis, entre eles os flavonoides, biflavonoides, identificados como compostos majoritários.

Ensaio biológicos usando combinações isoladas revelam que os flavonoides exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos demonstrando efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, antihepatotóxico, antihipertensivo, hipolipidêmico, antiinflamatório, antiplaquetário. Também demonstrou aumento na permeabilidade capilar, inibição da exsudação proteica e migração de leucócitos.^{88,89}

4.2 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência - UPLC do extrato etanólico e frações das folhas de *P. insignis*.

Pela técnica moderna de UPLC-DAD-UV foi possível identificar a presença de 4 marcadores de flavonóides (naringenina, pinobanksina, pinocembrina e galangina), no extrato etanólico (EETi) e nas frações (FMTi e FAPi) de *P. insignis*, através do uso de padrões analíticos de flavononas derivados da Naringenina e Pinocembrina e flavononois derivados pinobanksina, sendo eles, naringenina, pinobanksina, kaempferol, pinocembrina, galangina, pinostrombina. Destes a pinobanksina apresentou-se em quantidades maiores. Essa técnica também permitiu a quantificação desses compostos através da construção de curvas analíticas usando os dados das amostras padrões. Para a pinobanksina, composto majoritário entre os identificados, no EETi a concentração encontrada foi de 11,87 µg/mL com um tempo de retenção (TR) em 14,26 minutos, na faixa de comprimento de 291 nm, no espectro na região do UV-Vis. Os demais picos intensos apresentavam-se com comprimento de onda de 290 nm que podem ser sugestivos de flavonoides do tipo flavononas e flavononois. Estes flavonoides não foram identificados devido à falta de padrões analíticos e estes estão em quantidades superiores à pinobanksina que devem ser submetidos a análise LC-MS e outras técnicas de isolamento e purificação (Figura 4.1).

Figura 4.1 Cromatograma do extrato etanólico das folhas de *P. insignis* (EEPi). Identificação dos flavonoides: 1 naringenina (290 nm), 2 Pinobanksina (291 nm), 3 pinocembrina (290 nm), 4 Galangina (266 nm).

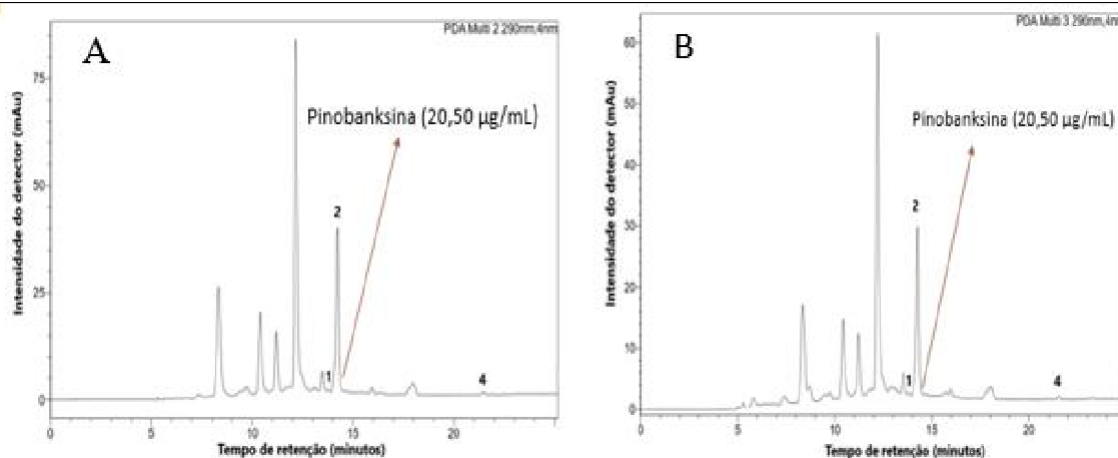


Fonte: Autores, 2024.

Já nas frações (FAPi e FMPi), representado na figura 4.2 (A e B), respectivamente, a pinobanksina apresentou concentrações iguais de 20,50 µg/mL com um tempo de retenção (TR) em 14,2 minutos, na faixa de comprimento de 290 nm, no espectro na região UV-Vis.

Figura 4.2 Cromatogramas das amostras FAPi e FMPi 2000 µg/mL. Identificação dos flavonoides: 1 naringenina (290 nm), 2 Pinobanksina (291 nm), 4 Galangina (266 nm), respectivamente.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão



Fonte: Autores, 2024.

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático e como substituinte uma hidroxila, podendo possuir outros grupos funcionais.⁹⁰ Entre esses compostos fenólicos, estão os flavonoides como a pinobanksina, presentes em abundância no extrato de *P. insignis*. A Pinobankisina é um composto com propriedades farmacológicas diversificadas, incluindo atividades antimicrobianas, neuroprotetoras e anticancerígenas, além de possuir também notável potencial antioxidante.⁹¹ Atualmente existe um grande interesse no estudo das substâncias com propriedades antioxidantes, devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. O quadro 4.2 mostra os compostos identificados no extrato e frações da *P. insignis* com suas estruturas moleculares e atividades biológicas.

Os resultados obtidos corroboram com o trabalho de ALBUQUERQUE et al., 2024⁴², no qual foi analisado 15 artigos e destes foi possível observar que os princípios ativos ou compostos majoritários eram uma quantidade significativa, compostos fenólicos ou flavonoides, cerca de 40%. Dentre eles, o estudo com extrato hidroalcóolico e frações das flores da *P. insignis*, que mostrou um alto teor de flavonoides e fenóis e um potencial antioxidante pelos ensaios de atividade

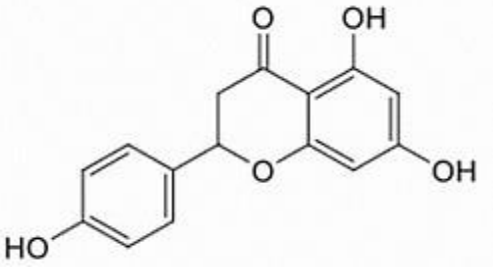
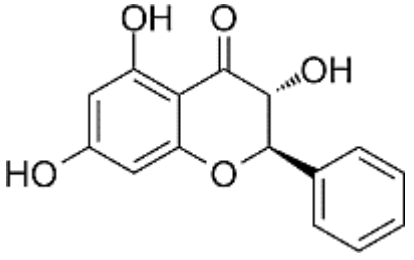
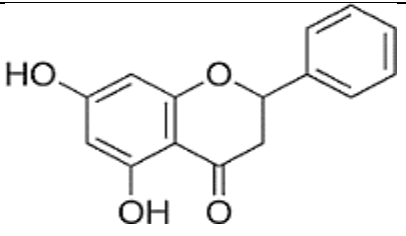
antirradicalar frente a DPPH e ABTS, potencial redutor do ferro (FRAP), peroxidação lipídica e em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* selvagens e mutadas para diferentes sistemas antioxidantes⁹². Garcinielliptona FC (GFC) é uma benzofenona prenilada, que mostrou efeito *in vitro* da GFC contra o verme sanguíneo *Schistosoma mansoni*, o parasita responsável pela esquistossomose mansoni. A atividade anti-*S. mansoni* e a citotoxicidade para células de mamíferos foram determinadas para o composto⁹³. A mistura de dois biflavonóides (moreloflavona e volkensiflavona) do extrato hidroalcoólico de flores de *P. insignis*, demonstraram atividade antileishmania, dependente da concentração, com inibição do crescimento do parasita em todas as concentrações analisadas e apresentou baixos efeitos citotóxicos para macrófagos, caracterizando o aumento da atividade lisossomal, sugerindo um possível efeito modulador.⁹⁴ Glicosídeos flavonóides, principalmente derivados de quercetina e miricetina, apresentaram atividades antifúngicas e antivirulentas contra espécies vaginais de *Candida* por um ensaio de microdiluição em caldo e não apresentaram citotoxicidade, que foi determinado em células RAW 264.7.⁹⁵

Segundo estudos de SOROMOU (2012)⁹⁶, a pinocembrina apresentou efeitos anti-inflamatórios significativos em células de macrófagos RAW e mostrou potencial terapêutico na atenuação da lesão pulmonar aguda induzida por endotoxina. No modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por LPS (lipopolissacarídeo), a pinocembrina atenuou o desenvolvimento de edema pulmonar, gravidades histológicas, bem como infiltração de neutrófilos, linfócitos e macrófagos, que foram aumentados pela administração de LPS. Além disso, as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa), IL-1 β (Interleucina 1 beta) e IL-6 (Interleucina 6) diminuíram significativamente, enquanto a concentração

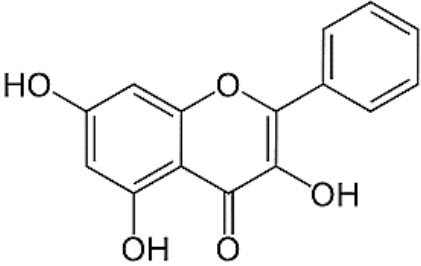
Capítulo 4 - **Resultados e Discussão**

de IL-10, uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel crucial na regulação negativa da resposta imune e na modulação da inflamação, aumentou significativamente após o pré-tratamento com pinocembrina.

Quadro 4.2 Compostos identificados por UPLC-DAD-UV no extrato etanólico e frações das folhas de *P. insignis* com suas respectivas atividades biológicas.

Nº	Compostos	Estrutura molecular	Atividade Biológica
1	Naringenina		Anti-inflamatórias, antioxidantes, neuroprotetoras, hepatoprotetoras e anticâncer ⁹⁷ .
2	Pinobanksina		Atividades antimicrobianas, neuroprotetoras, anticancerígenas e antioxidante ⁹¹ .
3	Pinocembrina		Antimicrobianas Neuroprotetoras Anticancerígena. ⁹⁶

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

4	Galangina		Antioxidantes, anti-inflamatórios e antiangiogênicos ⁹⁸ .
---	-----------	--	--

Fonte: Autores, 2024.

Tanto a galangina como a pinobanksina apresentam atividades biológicas importantes como antioxidantes, anti-inflamatórios e antiangiogênicos em diversas células cancerígenas.⁹⁹ Em um estudo foi identificado também atividades de inibição da xantina oxidase (XOD). A pinobanksina destacou-se como particularmente potente, demonstrando uma forte atividade inibitória contra a XOD.⁹⁶ A análise de acoplamento molecular revelou que ambas as substâncias foram capazes de interagir com o sítio ativo da XOD, formando ligações de hidrogênio com resíduos específicos de aminoácidos.

No estudo fitoquímico realizado por Da Silva et al., 2023¹⁰⁰, a análise por CG-EM realizada no extrato etanólico das folhas de *P. insignis*, revelou a presença de sessenta compostos fitoquímicos. Alguns compostos apresentaram percentuais de áreas mais significativas e outros menos. No caso do extrato etanólico, os compostos fitol, gama – sitosterol e ácido hexadecanóico mostraram um maior percentual relativo de área, sendo de 10,54%, 9,88% e 9,84%, respectivamente, sendo o fitol, um diterpeno, o composto majoritário, que apresenta atividade antimicrobiana, antituberculose e efeito anti-inflamatório.

Este perfil fitoquímico é completamente novo e diferente daqueles descritos na literatura para extratos de *P. insignis* que compreendem principalmente ácidos graxos, terpenos, xantonas, identificados como constituintes majoritários. Além disso, encontramos os flavonoides naringenina, pinobanksina, pinocembrina e

galangina que não foram identificados em estudos mencionados nesse artigo, o que torna a identificação dessas espécies inéditas do ponto de vista fitoquímico e em relação às suas possíveis ações biológicas no estudo cicatricial.

4.3 Predição ADMET

Os resultados das predições ADMET para os compostos identificados no UPLC, naringenina, pinobanksina, pinocembrina e galangina, estão apresentados nas tabelas 4.1 e 4.2. As quatro moléculas apresentaram alta capacidade de absorção intestinal humana (HIA) (70 – 100), sendo que todas tiveram valores acima de 80% (Tabela 4.1). Isso mostra que elas são solúveis no processo de absorção. No modelo de células de adenocarcinoma do cólon humano (Caco-2), que são utilizados para determinar a absorção de fármacos administrados por via oral por transporte passivo (transcelular e paracelular) em humanos e auxilia na pesquisa de moléculas com uma possível ação terapêutica devido possibilitar a predição de absorção destas moléculas dentro do corpo humano, somente a naringenina apresentou média permeabilidade (4-70), as demais apresentaram baixa permeabilidade (<4), em comparação com os valores de referência de permeabilidade: maior que 70 nm/seg: alta permeabilidade; entre 4 - 70 nm/seg: permeabilidade intermediária, menor que 4 nm/seg: baixa permeabilidade.⁷¹

A predição das células renais caninas de Madin-Darby (MDCK) avalia a interação do constituinte químico com a membrana celular, sendo considerada “alta difusão” quando apresenta valor maior que 500, “média difusão” quando possui valor entre 25-500 e “baixa difusão” com valores menores que 25.⁷² As quatro moléculas apresentam média difusão às membranas celulares das células renais caninas de

Madin-Darby (MDCK) (Tabela 4.1). Esses dados sugerem que as moléculas analisadas apresentam boa absorção oral e difusão celular.

A distribuição dos constituintes da *P. insignis*, através dos sistemas biológicos, foi avaliada pela força de ligação com as proteínas plasmáticas (PPB), onde as ligações existentes são consideradas como “forte” (maior que 90%) ou “fraca” (menor que 90%).⁷³ Dos constituintes químicos estudados, a naringenina e a pinocembrina apresentam fortes ligações, enquanto que a galangina e pinobanksina apresentam ligações fracas com as proteínas plasmáticas (Tabela 4.1). Os valores acima de 90% podem indicar uma maior meia-vida, favorecendo efeitos sobre os sistemas biológicos, benéficos ou maléficos, mais prolongados.¹⁰¹ Outro parâmetro que avalia a distribuição é a capacidade de penetração pela barreira hematoencefálica (BBB), podendo ser “alta” (maior que 2), “média” (0,1-2) ou “baixa” (menor que 0,1)⁷⁴, sendo que as quatro moléculas apresentaram média permeabilidade à barreira hematoencefálica.

Tabela 4.1 Predição das propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição e metabolismo) dos flavonoides: 1. Naringenina, 2. Pinobanksina, 3. Pinocembrina, , e 4. Galangina, identificados na fração metanólica (FMPI) de *Platonia insignis*.

Moléculas	Absorção			Distribuição			Metabolismo				
	HIA (%)	P _{ca} c _{o-2} (nm/s)	MDC K	PPB (%)	BBB	CYP2 C19 Inibiçã	CYP 2C9 inibiçã	CYP 2D6 Inibiçã	CYP 2D6 subs trato	CYP 3A4 Inibiçã	CYP 3A4 Sub strato
1	87,31	10,50	44,63	100	0.59	I	I	N	N	I	N
2	87,60	3,69	66,13	86,64	0.60	I	I	N	N	I	N
3	92,35	2,47	43,04	98,45	0.90	I	I	N	N	I	N

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

4	88,12	3,70	79,4	88,12	0,67	I	I	N	N	I	N
			0								

Subtítulo: HIA (70-100: alto; 20-70%: médio; <20: baixo); PCaco-2 (>70: alto; 4-70: médio; <4: low); MDCK (>500: alto; 25-500: médio; <25: baixo); BBB (>2: alto; 0,1-2: médio; <0,1: baixo); PPB (>90%: forte; <90%: fraco); N (Não); I (inibidor); S (substrato); W (fracamente).
Fonte: Autores, 2024.

A metabolização foi avaliada através das isoformas do complexo P450: CYP2C19_inibição, CYP2C9_inibição, CYP2D6_inibição, CYP2D6_substrato, CYP3A4_inibição, CYP3A4_substrato (LI, 2001). Todos os constituintes químicos são inibidores para a isoforma CYP2C19_inibição, CYP2C9_inibição e CYP3A4_inibição. Todos os constituintes são não inibidores para CYP2D6_inibição, CYP2D6_substrato e CYP3A4_substrato. (Tabela 4.1).

A interação de fármacos/ligantes com as CYPs, como processo de primeira fase do metabolismo (oxidação, redução ou hidrólise), pode gerar metabólitos que serão mais fáceis de serem excretados.^{102,103} As isoformas podem funcionar como inibidoras que irão formar complexos, assim impedindo o metabolismo dos fármacos/ligantes. Ou, os fármacos/ligantes podem funcionar como indutores na produção de isoformas, aumentando o metabolismo desses fármacos/ligantes.^{104,105,106}

Tabela 4.2 Predição das propriedades toxicológicas e Regra de Lipinski dos flavonoides: 1. Naringenina, 2. Pinobanksina, 3. Pinocembrina e 4. Galangina, identificados na fração metanólica (FMPi) de *Platonia insignia*.

Moléculas	Carcinogenicidade		Dano celular	Citotoxicidade	Lipinski	Permeabilidade cutânea
	Rato	Camundongo				
1	N	N	M	MR	0	- 6,17
2	N	N	M	MR	0	- 6,78
3	N	N	M	MR	0	- 5,82
4	N	N	M	MR	0	- 6,35

Subtítulo: P (positivo); N (negativo); M (mutagênico); NM (não-mutagênico); LR (baixo risco); MR (médio risco); HR (alto risco). Fonte: Autores, 2024.

Quanto à mutagenicidade, foi usado teste de AMES, que é método utilizado para avaliar a mutagenicidade de substâncias químicas, ou seja, a capacidade de uma substância causar mutações em material genético de organismos vivos. Foi utilizada várias cepas da bactéria *Salmonella typhimurium*, que carregam mutações em genes envolvidos na síntese de histidina, de modo que requerem histidina para crescer. A variável que foi testada é a capacidade dos mutagênicos de causar uma reversão ao crescimento em um meio livre de histidina⁷⁶, todos se apresentaram como mutagênicos. Quanto ao parâmetro carcinogenicidade, os quatro constituintes apresentam negatividade para ratos e camundongos. A avaliação da citotoxicidade (hERG_inibição) é um parâmetro que avalia a probabilidade de cardiotoxicidade aos canais iônicos de potássio hERG.⁷⁸ Nesta avaliação, todos apresentam “médio risco” (Tabela 4.2).

Para a predição druglikeness, termo usado na descoberta de medicamentos para descrever a probabilidade de que uma determinada molécula possa se tornar um medicamento seguro e eficaz, levou-se em consideração a Regra de Lipinski, que caracteriza que um bom candidato a fármaco deve possuir: (1) número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; (2) número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor ou igual a 5; (3) massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol (4) coeficiente de partição octanol-água (log P) menor ou igual a 5; (6) área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 Å.^{107,108,109} Nenhuma das moléculas mostrou violação à Regra de Lipinski, portanto, as moléculas analisadas são passíveis de boas características farmacocinéticas, tais como absorção e biodisponibilidade. (Tabela 4.2). Além disso, uma regra adicional,

proposta por Veber et al. (2002)¹¹⁰, diz que o número de ligações rotacionáveis (NLR) não deve ser superior a 10, visto que a molécula deve adotar uma conformação fixa para interagir com o alvo, passar pelas membranas, e ao mesmo tempo adotar a conformação ativa.

A permeação de fármacos administrados por via tópica pode ocorrer por três vias, sendo elas, por via transdérmica, por meio da interação do fármaco com os queratinócitos via anexos cutâneos como ductos de suor, glândulas sebáceas e sudoríparas e por via intercelular, por meio da interação do fármaco com a matriz.¹¹¹ O coeficiente de permeabilidade da pele (K_p) é um parâmetro importante que auxilia na avaliação da permeabilidade epidérmica de um composto. Este parâmetro está relacionado à absorção sistêmica de drogas após a administração transdérmica.¹¹² Na descoberta por fármacos, ou cosméticos a serem utilizados na pele, é importante avaliar sua permeabilidade, ou seja, a taxa de penetração de uma molécula no estrato córneo, para determinar o potencial de criação de uma forma de liberação transdérmica de drogas. Considera-se que uma molécula penetrará na pele no valor de $\log K_p$ superior a -2,5 cm/h (-0,000694 cm/s).⁷⁹ Os valores do $\log K_p$ de permeabilidade cutânea encontrados neste estudo, para as quatro moléculas, foram menores que -2,5 cm/h, sugerindo baixa absorção cutânea (Tabela 4.2), o que pode limitar a utilização no tratamento de feridas cutâneas.

Os resultados demonstrados aqui, corrobora com o estudo de SILVA e CAVALCANTE (2022)¹¹³, que previu parâmetros farmacológicos e toxicológico ADMET de um grupo de flavonoides (catequina, apigenina, naringenina, quercetina, cianidina e daidzeina) mesmo grupo de metabólitos de nosso estudo, onde apresentam alta probabilidade de atividades biológicas e valores significativos para os parâmetros farmacocinéticos indicativos de uma boa absorção e distribuição

destas moléculas em circuitos biológicos. Em nosso estudo, flavonoides estudados, apesar de não apresentarem boa permeação cutânea, mostraram uma alta probabilidade de atividades biológicas e uma boa distribuição destas moléculas em circuitos biológicos, mostrando que essas moléculas podem se dispersar e se movimentar através do corpo, alcançando diferentes tecidos e órgãos e isso pode contribuir no processo de cicatrização. A mutagenicidade das substâncias, pelo teste de Ames, mostrou que podem causar alterações no material genético, porém, a carcinogenicidade, que indica o potencial de uma substância de causar câncer, foi negativo para ratos e camundongos, animais que apresentam várias semelhanças com os seres humanos na genética e na fisiologia.

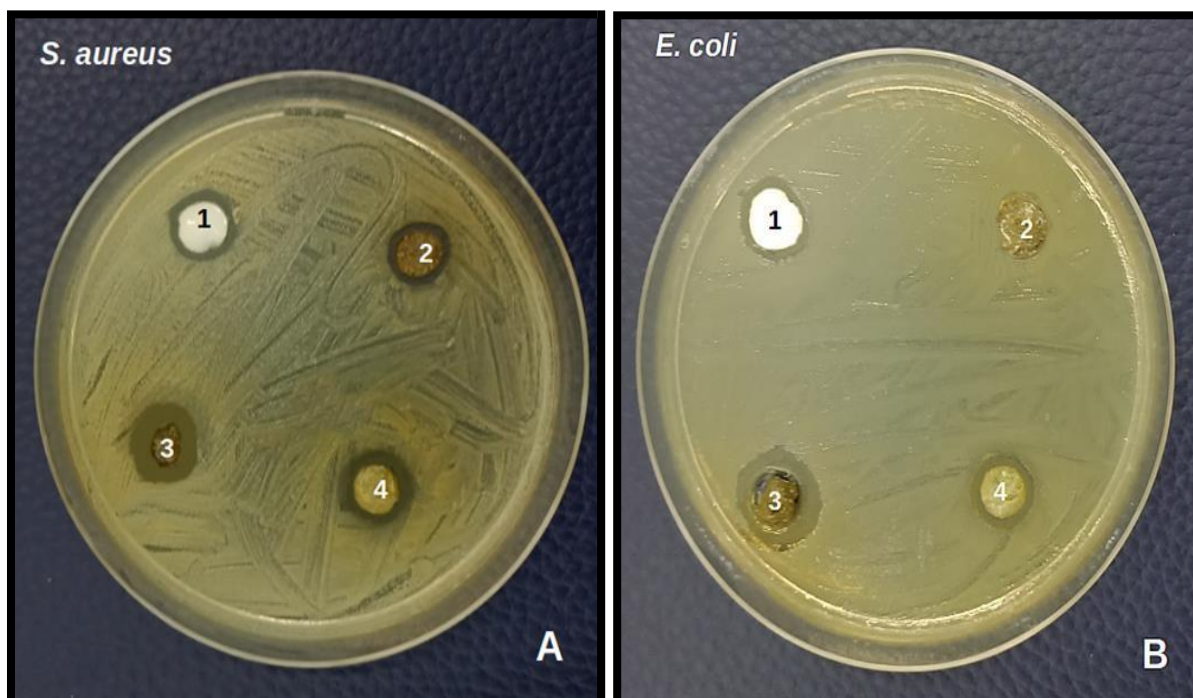
4.4 Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do creme base(veículo) e dos cremes do EEPi, FAPi e FMPi pelo método de difusão em poço.

4.4.1 Atividade antibacteriana

Na avaliação da atividade antimicrobiana dos cremes do extrato etanólico e frações das folhas da *P. insignis*, observou-se que para a bactéria *Staphylococcus aureus* houve inibição do crescimento microbiano em todas as amostras testadas, conforme mostra a figura 4.3 A, onde o creme da FMPi apresentou melhor resultado com halo de inibição de 14mm. Nos testes dos cremes com a bactéria *Escherichia coli*, não apresentou halo de inibição do crescimento microbiano com o creme do EEPi. Contudo, os demais cremes apresentaram halos de inibição, conforme mostra a figura 4.3 B, onde o melhor resultado apareceu frente ao creme da FMPi com halo de inibição de 15mm. Esses resultados demonstram que o extrato e frações das

folhas de *Platonia insignis* possui atividade antimicrobiana tanto para bactérias gram-positivas quanto gram-negativas.

Figura 4.3 Teste de difusão em poços contendo os cremes (Base-1, EEPi-2, FMPI-3 e FAPI-4) contra (A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Escherichia coli*.



Fonte: Autores, 2024.

Esses resultados corroboram com os estudos realizados por ROCHA et al. (2017)⁸⁶ com extrato hidroetanólico das folhas da *P. insignis* que apresentaram ação antimicrobiana frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, onde houve uma atividade inibitória de moderada a alta. A tabela 4.3 mostra os valores de halos de inibição dos cremes do extrato e frações da *P. insignis* frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

SILVA et al., (2021)⁸⁷ avaliou a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolico de *P. insignis*, da fração acetato de etila e sua subfração contendo mistura de biflavonóides (morelloflavona/volkensiflavona) em cepas

de *Staphylococcus aureus*. Os seus resultados demonstraram que o extrato apresentou efeito microbicida contra *S. aureus*, enquanto a fração foi bacteriostático para *S. aureus*. Já a mistura de biflavonoides foi capaz de inibir o fluxo de EtBr em cepas de *S. aureus*.

Tabela 4.3 Valores de halos de inibição (mm) dos cremes do extrato e frações da *P. insignis* contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

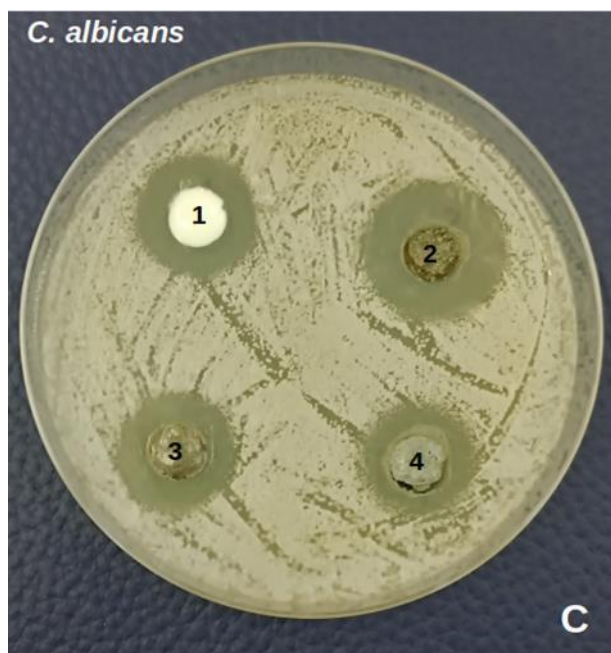
	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Escherichia coli</i>			
	Cremes				Cremes			
	Base	EEPi	FMPI	FAPI	Base	EEPi	FMPI	FAPI
Placa 1	13	11	15	11	10	0	15	12
Placa 2	12	10	15	13	12	0	15	13
Placa 3	0	12	12	12	0	0	15	10
Média	8,3	11	14	12	7,3	0	15	11,6

Fonte: Autores, 2024.

4.4.2 Atividade antifúngica

As espécies de *Candida albicans* podem causar infecção superficial da mucosa oral e vaginal, pode ser a candidíase ou a balanite por cândida no caso homem, bem como infecções disseminadas para a corrente sanguínea e tecidos profundos. Na avaliação da atividade antifúngica do creme do extrato e das frações das folhas da *P. insignis*, observou-se que para a levedura *Candida albicans* houve inibição do crescimento microbiano em todas as amostras testadas, conforme mostra a figura 4.4, onde o creme da EEPi apresentou melhor resultado com halo de inibição de 25mm, como é mostrado na tabela 4.4.

Figura 4.4 Teste de difusão em poços contendo os cremes (Base-1, EEPi-2, FMPI-3 e FAPI-4) contra espécie fúngica *Candida albicans*



Fonte: Autores,2024.

Os resultados apresentados corroboram com o estudo de SILVA et al.,(2020)⁵⁸, que investigou o potencial antifúngico de um extrato hidroetanólico de folhas de *P. insignis* (PiHE) e das frações diclorometano (DCMF) e acetato de etila (EAF) contra *Candida* spp., isolado de secreções vaginais. Em seus estudos os extratos apresentaram potencial antifúngico, com menor valor para a concentração inibitória mínima (CIM) para EAF (1,3 mg/mL) e inibiram a adesão de *Candida*. Em outro estudo, SILVA et al., (2022)⁵⁹, avaliou a atividade antifúngica da Ononina, um glicosídeo de isoflavona, através do método Concentração inibitória mínima (CIM). A ononina inibiu significativamente o crescimento de *C. albicans* ATCC 10231 no MIC após 6 h. Além disso, foi observada uma redução significativa do crescimento após 9h para duas concentrações subinibitórias, concentrações de substâncias que estão presentes em níveis abaixo da concentração mínima necessária para inibir completamente o crescimento microbiano. Esse resultado mostra a capacidade

inibidora dos flavonoides na ação contra fungos e reforça os resultados de nossos estudos.

Muitas plantas são utilizadas em pesquisas para identificar novas bases de agentes antifúngicos. Os resultados dos testes biológicos realizados pelo nosso grupo mostram que o extrato etanólico e a frações (FMPI e FAPI) de *P. insignis* apresentam atividade antifúngica. Esses resultados corroboram com os estudos feitos por SILVA (2022)¹¹⁴ e colaboradores, onde investigou a atividade antifúngica da ononina, um glicosídeo isoflavona, obtido na extração das folhas da *P. insignis* e verificou que tanto o extrato quanto a fração acetato de etila exerceu atividade anti-*Candida albicans*, pela microdiluição em caldo (MIC), entre 3,9 e 7,8 µg/mL, e inibiu biofilmes jovens e maduros, com redução na densidade celular e atividade metabólica de 50 a 80%.

Tabela 4.4 Valores de halos de inibição (mm) dos cremes do extrato e frações da *P. insignis* contra a levedura *Candida albicans*

<i>Candida albicans</i>				
Cremes				
	Base	EEPi	FMPI	FAPI
Placa 1	20	27	22	20
Placa 2	19	24	21	21
Placa 3	19	25	23	24
Média	19,3	25,3	22	21,6

Fonte: Autores, 2024.

4.5 A Avaliação da toxicidade dos cremes do EEPi, FAPI e da FMPI pelo teste HET-CAM

Uma metodologia alternativa ao teste de irritação ocular *in vivo* é o teste HET-CAM para avaliação toxicológica. Nos últimos anos, também tem sido empregado

como um teste de triagem preliminar antes do estudo *in vivo* para fornecer o potencial irritante de substâncias nas membranas e na pele.^{115,116}

O resultado para o potencial irritante do creme da FAPi é mostrado na Tabela 4.5, onde não houve aparecimento de reações irritantes, ou seja, nenhum efeito irritante foi evidenciado. Como não apresentou nenhum dano aos vasos sanguíneos na superfície da CAM após 5 minutos, foi classificado como não irritante. O potencial não irritativo do creme da FAPi, somado aos resultados obtidos com avaliação da atividade antibacteriana, sugere que o creme desenvolvido pode ser aplicado com segurança por via tópica, incluindo aplicação em pele danificada.

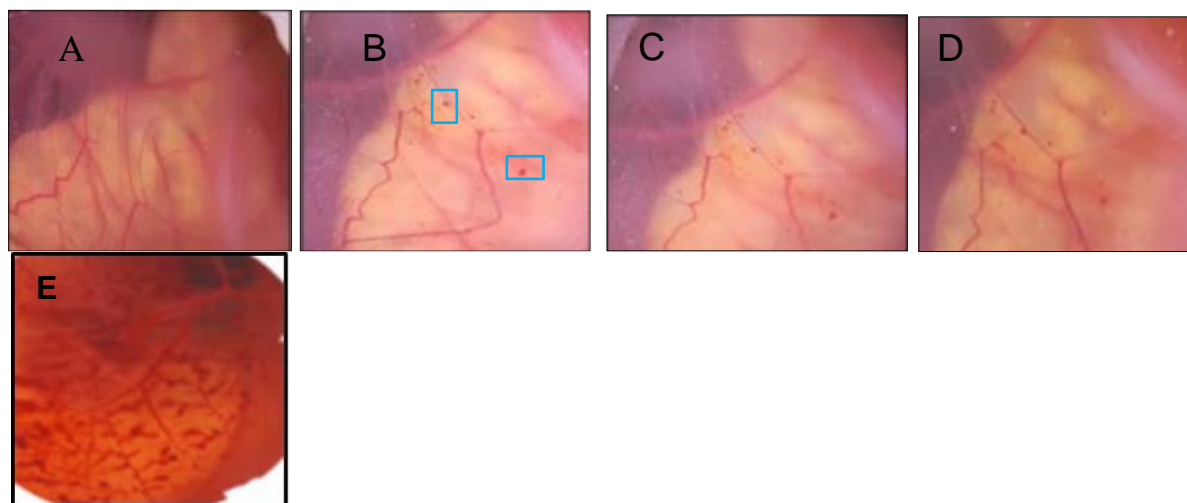
Tabela 4.5 Escore de irritação e classificação de irritação no teste da membrana corioalantóica do ovo de galinha (HET-CAM) para o creme da FAPi.

OVO	LISE		HEMORRAGIA		COAGULAÇÃO		INDICE
	Tempo	Nota	Tempo	Nota	Tempo	Nota	Σ Notas
1	-	0	-	0	-	0	0
2	-	0	-	0	-	0	0
3	-	0	-	0	-	0	0
4	-	0	-	0	-	0	0
5	-	0	-	0	-	0	0
6	-	0	-	0	-	0	0

Fonte: Autores, 2024.

Na outra formulação, creme do EEPi, observou-se uma leve irritação no tempo 30 segundos como são mostrados na figura 4.5 e na tabela 4.6 onde apareceram pontos de hemorragia, no qual obtiveram uma pontuação de 7 e média das sextuplicatas de 1,17. Essas pontuações classificam o creme com uma ligeira irritação. Como os testes foram feitos em sextuplicata e só uma delas apresentou essa ligeira irritação, sem danos nos vasos sanguíneos na superfície da CAM, o creme apresenta um potencial não irritativo.

Figura 4.5 Imagens que ilustram os efeitos do creme do EEPi aplicadas na membrana córioalantóide. (**A**) estado inicial, (**B**) durante o período de 30 segundos, (**C**) durante o período de 120 segundos , (**D**) durante o período de 300 segundos. (**E**) controle positivo, NaOH 0,1M de 300 segundos.



Fonte: Autores, 2024.

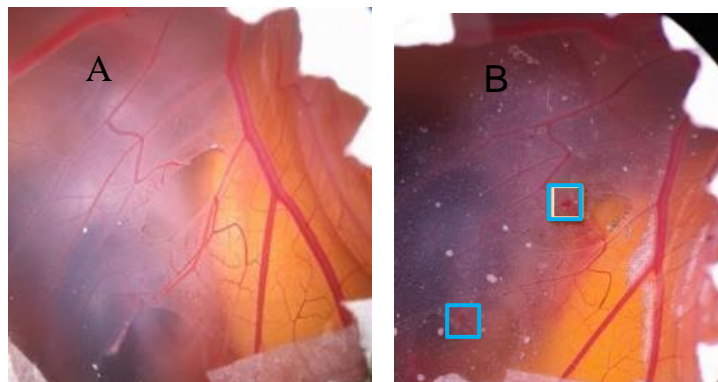
Tabela 4.6 Escore de irritação e classificação de irritação no teste da membrana corioalantóica do ovo de galinha (HET-CAM) para o creme da EEPi.

OVO	LISE		HEMORRAGIA		COAGULAÇÃO		INDICE
	Tempo	Nota	Tempo	Nota	Tempo	Nota	Σ Notas
1	-	0	-	0	-	0	0
2	-	0	-	0	-	0	0
3	-	0	-	0	-	0	0
4	-	0	-	0	-	0	0
5	-	0	-	0	-	0	0
6	-	0	30s	7	-	0	7
Total = 1,17							

Fonte: Autores, 2024

Para a outra formulação, creme da FMPI, observou-se um ponto de hemorragia no teste 6 no tempo 300 segundos (Figura 4.6), chegando aos valores 3 de pontuação e 0,50 de média das sextuplicatas, como é mostrado na tabela 4.7. Esses resultados classificaram o creme como não irritante.

Figura 4.6 Imagens que ilustram os efeitos do creme do FMPi aplicado na membrana córioalantóide . (A) estado inicial, (B) durante o período de 300 segundos.



Fonte: Autores, 2024.

Tabela 4.7 Escore de irritação e classificação de irritação no teste da membrana corioalantóica do ovo de galinha (HET-CAM) para o creme da FMPi

OVO	LISE		HEMORRAGIA		COAGULAÇÃO		ÍNDICE
	Tempo	Nota	Tempo	Nota	Tempo	Nota	Σ Notas
1	-	0	-	0	-	0	0
2	-	0	-	0	-	0	0
3	-	0	-	0	-	0	0
4	-	0	-	0	-	0	0
5	-	0	-	0	-	0	0
6	-	0	300s	3	-	0	3
							Total = 0,5

Fonte: Autores 2024.

Esses resultados corroboram com os estudos feitos por BALESTRIN et al., (2021)¹¹⁷ onde foi analisado o potencial irritante de nanoemulsão carregadas com extrato de *Achyrocline satureioides* (ASE), ao qual seu extrato etanólico e por meio de cromatografia líquida ultrarrápida validada (UFLC) mostrou a presença dos flavonoides quercetina, luteolina e 3- O -metilquercetina que são do mesmo grupo de metabólitos secundários de nosso estudo e que tem sido muito investigado para tratamento de diversas doenças da pele. Foi observado que a nanoemulsão com ASE não apresentou potencial irritante, conforme demonstrado pelo teste HET-CAM,

mostrando que, quando incorporado a uma pomada, foi capaz de promover uma melhor cicatrização de feridas, tendo em vista os efeitos ao potencial não irritante.


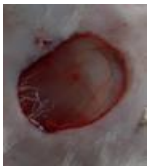


















Ao analisar as características dos estudos que envolveram a aplicação do HET-CAM, é importante levar em consideração as limitações da metodologia, tanto em relação a subjetividade do observador ao identificar o surgimento dos três pontos finais, tanto na incapacidade de revelar a reversibilidade que pode ocorrer *in vivo*. Além disso, com o uso do HET-CAM observa-se apenas a toxicidade aguda uma vez que se realiza apenas a aplicação de uma dose do produto e a ocorrência de toxicidade crônica não é levada em consideração.¹¹⁸

4.6 Avaliação macroscópica - Regressão cicatricial

Na análise macroscópica é levada em consideração a regressão cicatricial, ou seja, a contração da ferida. Essa é uma fase do processo de cicatrização que se caracteriza pelo movimento centrípeto das bordas, podendo chegar até 62 % quando comparado à lesão inicial em feridas de segunda intenção.⁹⁹ A fase da contração da ferida é antecipada pela proliferação, que através da angiogênese e fibroplasia, o tecido de granulação é desenvolvido e enriquecido com fibras colágenas, concedendo à região lesada um início de cicatriz.¹¹⁹

O desenvolvimento da ferida cutânea nos grupos controle negativo, controle positivo, EEPi, FMPI e FAPI resultou na formação de crostas leves por volta do 7º dia de pós-operatório, com semelhanças em todos os grupos. A partir desse período, a cicatriz foi reforçada, tornando-se mais rígida e passou a destacar-se espontaneamente a partir do 14º dia, com melhor resultado nos grupos CP, FMPI e FAPI, progredindo para o remodelamento até o 21º de pós-operatório, com crescimento de pelos em volta da área lesada, em todos os grupos. (Figura 4.7).

Figura 4.7 Fotos comparativas dos ferimentos dos animais do grupo controle negativo e positivo com os grupos tratados com extrato e frações da *P. insignis* no 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório.

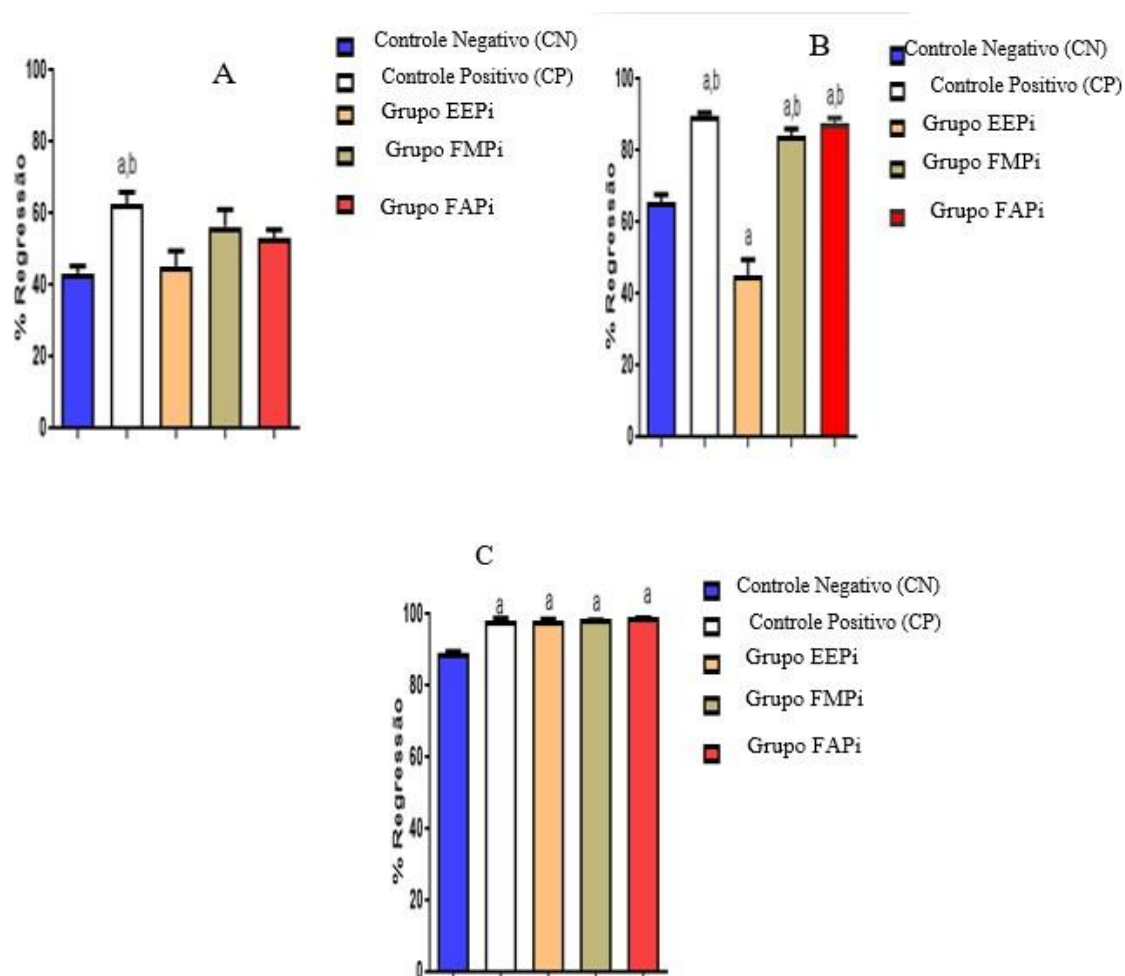
DIAS	CONTROLE NEGATIVO	CONTROLE POSITIVO	EEPI	FMPi	FAPi
ZERO DIA					
7 DIAS					
14 DIAS					
21 DIAS					

Fonte: Autores, 2024.

Os resultados da análise macroscópica foram expressos quantitativamente e a porcentagem de regressão cicatricial dos grupos experimentais está representada na Figura 4.8. Em análise da Figura 4.8 A , observa-se que os animais dos grupos FMPi e FAPi apresentaram o maior percentual de regressão cicatricial aos 7 dias, diferenciando-se significativamente, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), do grupo CN e aproximando-se do grupo CP, no qual, teve uma regressão de

60%. Já o grupo tratado com o extrato (EEPi) apresentou um percentual de regressão semelhante ao CN, que foi de 40%.

Figura 4.8 Percentual de regressão cicatricial dos grupos controles e experimentais tratados com extrato e frações de *P. insignis* por 7(A), 14 (B) e 21 dias (C). a e a,b estatisticamente significativo, $p < 0,05$.



Fonte: Autores, 2024.

No período de 14 dias, figura 4.8 B, os grupos FMPi e FAPi continuaram contribuindo positivamente de forma semelhante para a regressão da ferida, atingindo um percentual de 80%, sendo diretamente proporcionais ao controle positivo e se diferenciando estatisticamente dos demais grupos. Entretanto, o grupo

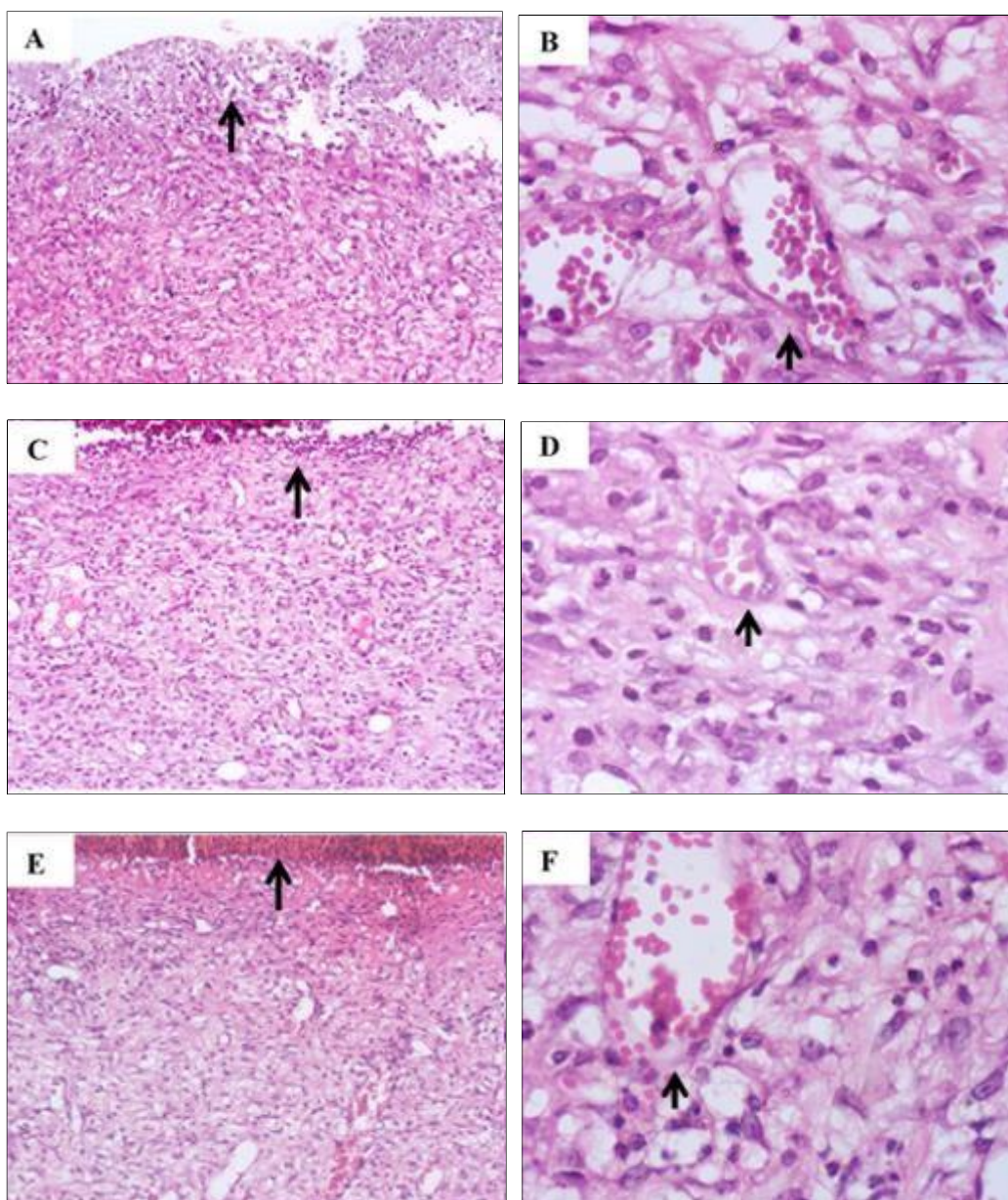
tratado com o extrato (EePi) não acompanhou, estatisticamente, a evolução dos demais grupos, quando comparados aos grupos controles e frações, apresentando diferença significativa de $p < 0,05$. Nos grupos tratados por 21 dias, figura 4.8 C, há aumento do percentual de regressão em todos os grupos, aproximando-se de 100%, não havendo, no entanto, diferença significativa entre eles.

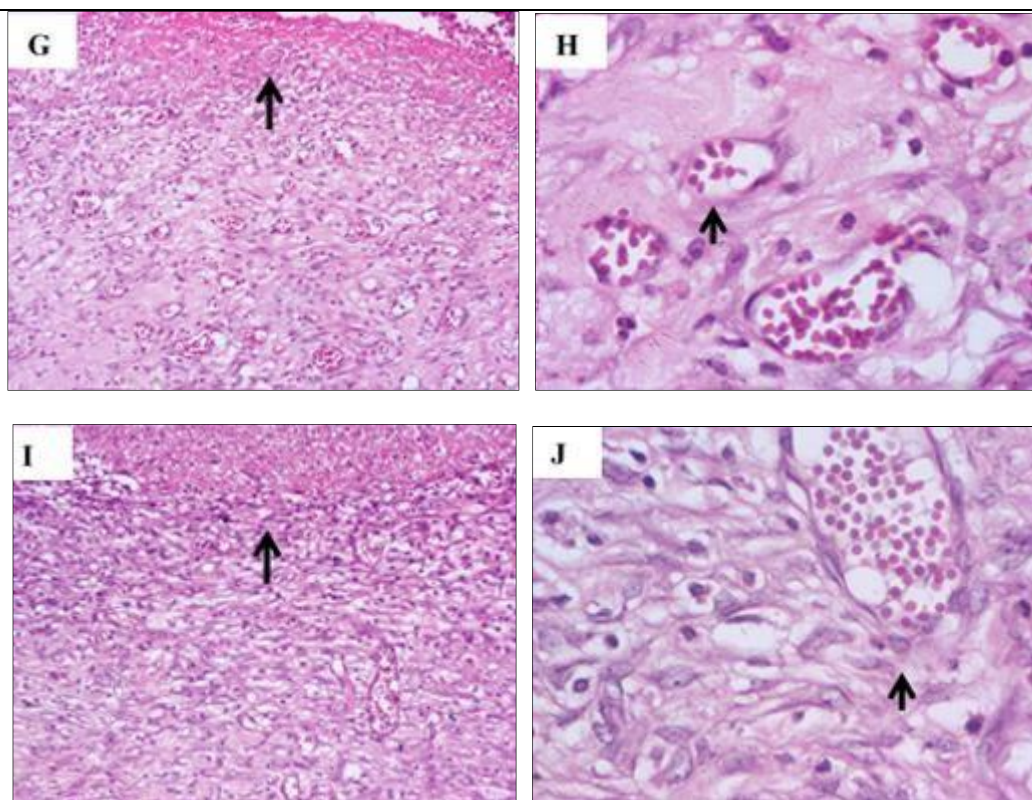
A análise e comparação dos resultados indicam que o extrato e frações das folhas da *P. insignis* utilizada resultaram em áreas menores de cicatrização em comparação com o grupo controle negativo, evidenciando que eles tiveram um efeito positivo no processo de cicatrização, com melhores resultados nas FMPi e FAPI. Esses resultados corroboram com estudos anteriores, como o de COSTA JÚNIOR (2011)⁵² e LUSTOSA et al. (2021)⁵⁵, no qual foi demonstrado que a manteiga, a base de *P. insignis*, por si só, tem um efeito cicatrizante e anti-inflamatório, respectivamente.

4.7 Avaliação microscópica - análise histológica qualitativa e quantitativa

Sete dias de evolução – Ao final desse período, todos os grupos mostraram reepitelização limitada à periferia e ainda distante da área central das feridas, que se mostraram recobertas por crosta de espessura variável, formada por material fibrinoneutrófilico e hemorrágico. O leito das feridas estava ocupado por tecido de granulação jovem, caracterizado por uma matriz extracelular (MEC) frouxa, contendo numerosos capilares sanguíneos neoformados, fibroblastos jovens e uma grande quantidade de infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e macrófagos de aspecto vacuolado (Figura 4.9).

Figura 4.9 Aspectos histológicos após sete dias de evolução. Feridas recobertas por crosta fibrinoneutrófila (setas maiores) de espessura variável. No leito das feridas, tecido de granulação jovem com matriz extracelular (MEC) frouxa contendo numerosos capilares sanguíneos neoformados (setas menores), neutrófilos, macrófagos vacuolados e fibroblastos jovens. Grupo CN (A, B); grupo CP (C, D); grupo EEPi (E, F); grupo FMPi (G, H); grupo FAPi (I, J). A, C, E, G, I: H.E., 100x. B, D, F, H, J: H.E., 400x.





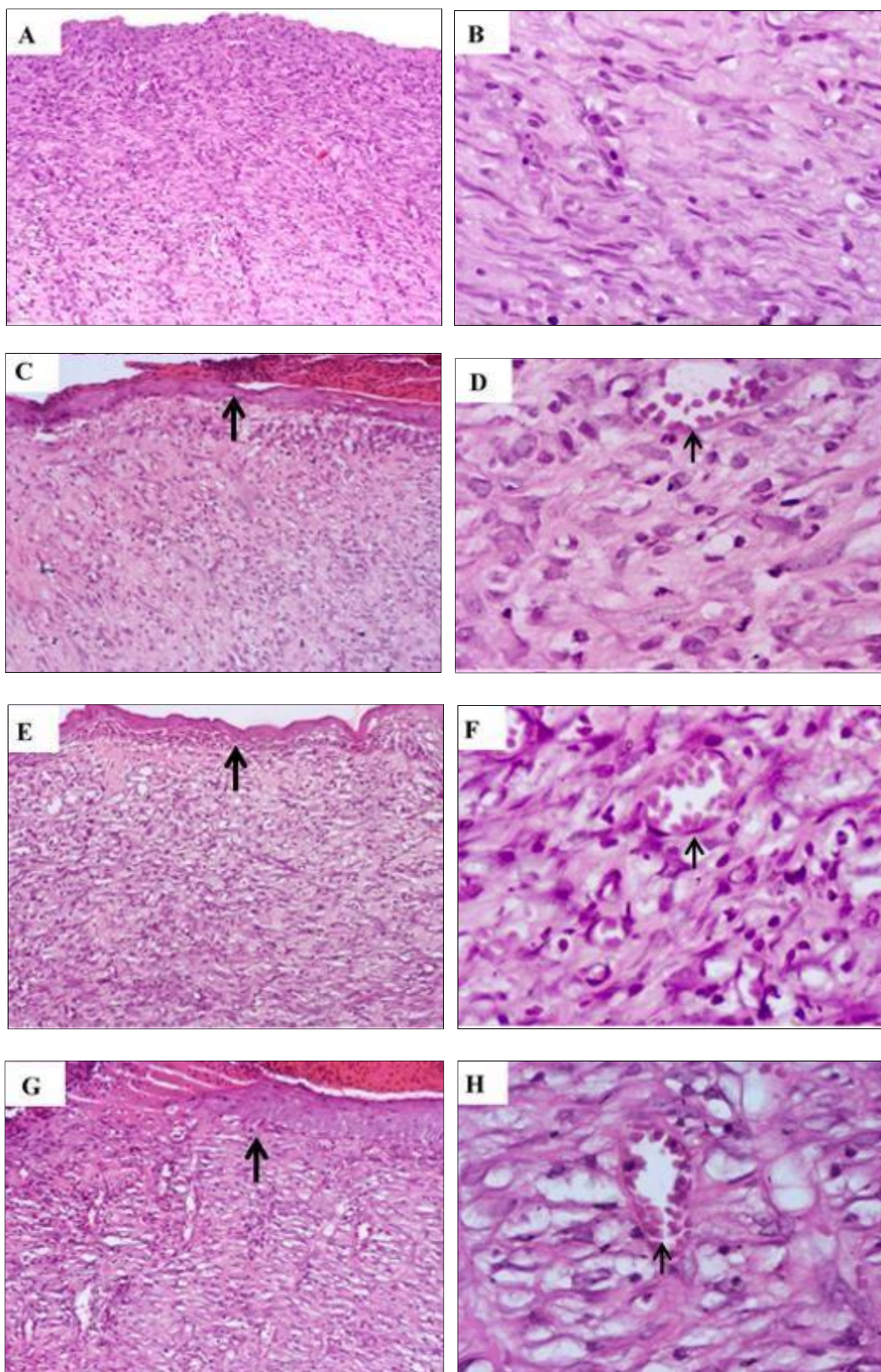
Fonte: Autores, 2024.

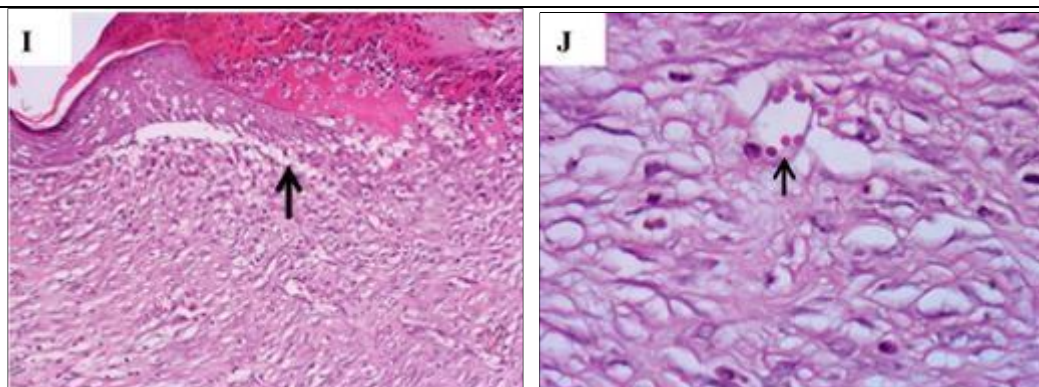
Quatorze dias de evolução – Nessa fase, o grupo CN não exibiu reepitelização da área central das feridas. Em compensação, a MEC se apresentou densa, contendo fibroblastos delgados de aspecto maduro dispostos em feixes compactos. Macrófagos e capilares sanguíneos foram raramente encontrados. Nos demais grupos, a epiderme neoformada recobria parcial ou totalmente as lesões. A MEC se mostra frouxa, contendo capilares sanguíneos, neutrófilos e macrófagos vacuolados em número ainda elevado (Figura 4.10).

Figura 4.10 Aspectos histológicos após quatorze dias de evolução. No grupo CN (A e B), a reepitelização ainda não alcança a área central das feridas. A derme mostra MEC densa, contendo fibroblastos maduros, raros capilares sanguíneos e macrófagos. Nos grupos CP (C, D), EEPi (E, F), FMPi (G, H) e FAPi (I, J) a epiderme

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

neoformada (setas maiores) recobre parcial ou totalmente as lesões; capilares sanguíneos (setas menores), neutrófilos e macrófagos vacuolados estão presentes em número considerável. A, C, E, G e I: H.E., 100x. B, D, F, H e J: H.E., 400x.

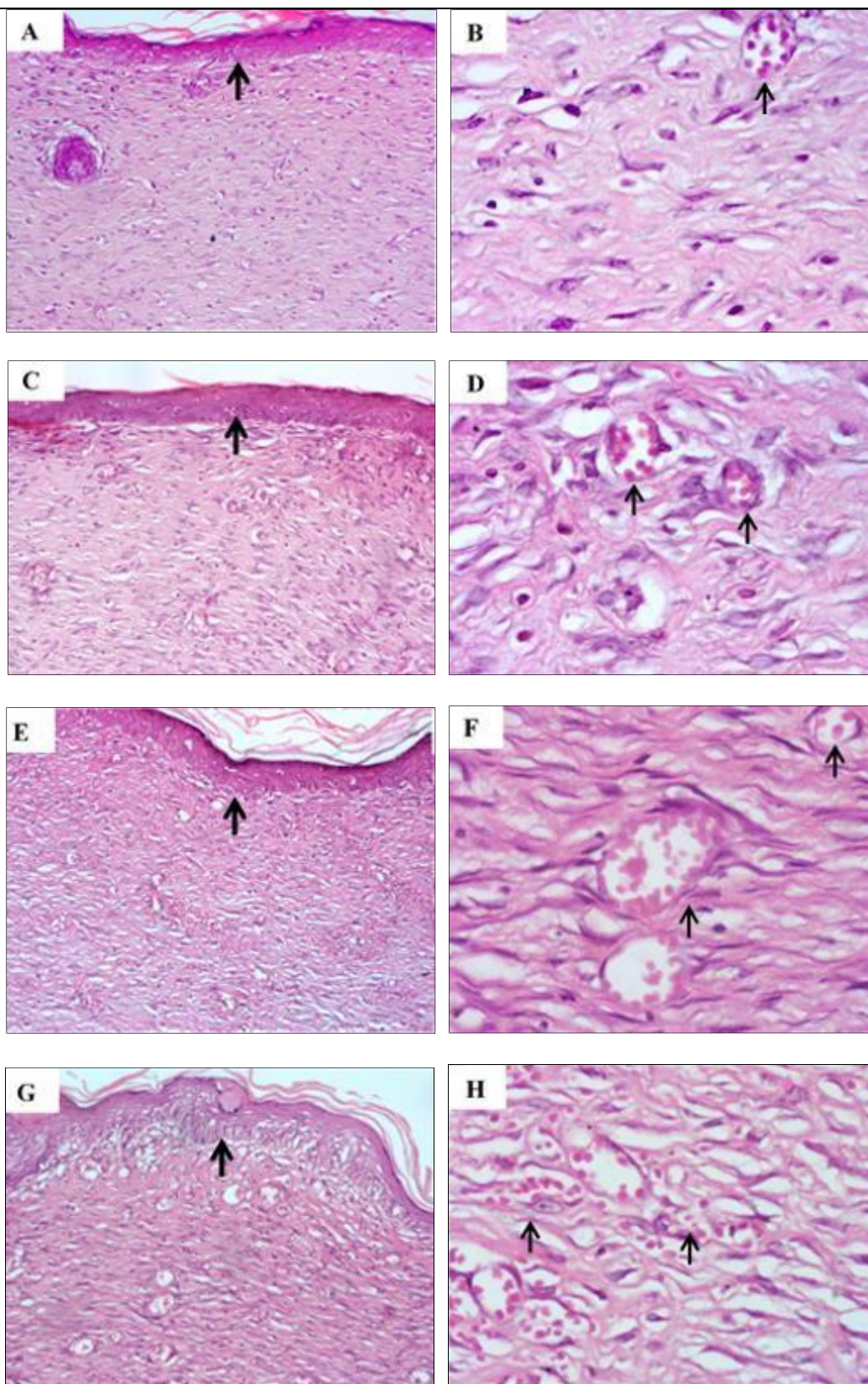


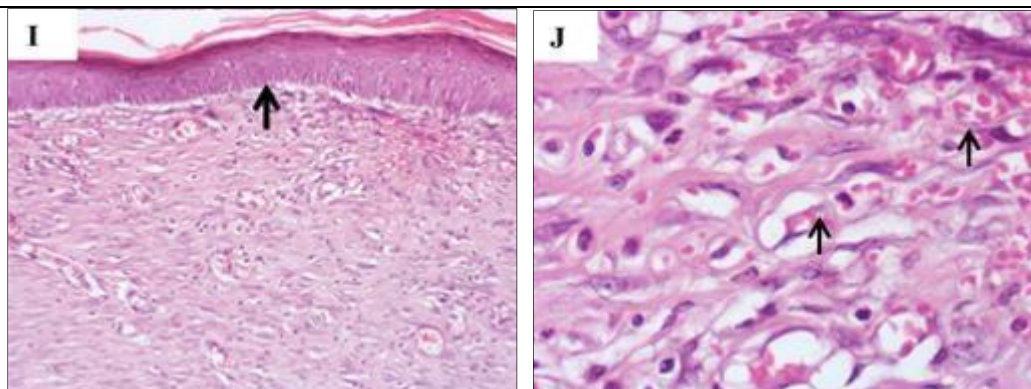


Fonte: Autores, 2024.

Vinte e um dias de evolução. Em todos os grupos ocorreu reepitelização das feridas. No grupo CN, a MEC se mostrou densa e de aspecto fibrilar, contendo fibroblastos maduros e raros capilares sanguíneos e macrófagos. Nos demais grupos, a MEC apresentou densidade variável, contendo numerosos capilares sanguíneos, além de infiltrados focais de macrófagos vacuolados. (Figura 4.11).

Figura 4.11 Aspectos histológicos após vinte e um dias de evolução. Todos os grupos exibem epiderme neoformada (setas maiores) recobrimdo totalmente a ferida. No grupo 1 (A, B), a derme contém fibroblastos maduros e raros capilares sanguíneos. Os grupos 2 (C, D), 3 (E, F), 4 (G, H) e 5 (I, J) mostram numerosos capilares sanguíneos (setas menores) e infiltrados focais de macrófagos na MEC. A, C, E, G e I: H.E., 100x. B, D, F, H e J: H.E., 400x.





Fonte: Autores, 2024.

Os resultados descritos acima, revelou que os grupos tinham aspectos muito semelhantes após 7 dias, caracterizando-se por feridas recobertas por material fibrinoneutrofílico, MEC (derme) frouxa e reepitelização limitada. Após 14 dias, os grupos CP, EEPi, FMPI e FAPI evidenciaram uma reepitelização mais acelerada, quando comparados ao Grupo Controle Negativo. Aos 21 dias de evolução, todos os grupos apresentaram características similares, como reepitelização completa e madura; a derme se mostrou com densidade variável e organizada e apresentando alguns capilares sanguíneos. Portanto, os resultados indicam que, no modelo experimental utilizado, o tratamento com os cremes do extrato e frações da *P. insignis*, aumentou, significativamente, o efeito na reepitelização, quando comparado com o grupo CN. No entanto, nesse estudo qualitativo, os mesmos grupos não mostraram melhora significativa em termos de redução da inflamação, com a presença em quantidade considerável, em 14 e 21 dias, de células inflamatórias. Essa falta de melhora pode ser atribuída à baixa permeação cutânea dos flavonoides identificados em nosso estudo com a Predição ADMET.

Esses resultados corroboram com os estudos de SANTOS JUNIOR e colaboradores (2010)¹¹⁹, onde analisou a cicatrização de feridas cutâneas tratadas

com a banha de bacuri. Em seus resultados pôde-se observar que grupo tratado com a banha do bacuri, no período de sete dias, a crosta mostrou-se exuberante, e com tecido conjuntivo subjacente contendo intenso infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos e com neovascularização moderada. No período de 14 dias o grupo tratado com a banha de bacuri, no mesmo período, houve uma redução da crosta, permanecendo com presença de polimorfonucleares, neutrófilos. O tecido conjuntivo subjacente apresentou atividade fibroblástica intensa com formação de fibras colágena desorganizadas. Vale ressaltar que seu estudo o tratamento ocorreu em 4, 7 e 14 dias.

Vários mecanismos estão envolvidos na promoção da cicatrização de feridas. Os remédios naturais podem auxiliar neste processo reduzindo a formação de cicatrizes. Compostos bioativos com efeitos antimicrobianos, antioxidantes e anti-inflamatórios, como os flavonoides identificados em nosso estudo, ajudam a prevenir infecções no local da cicatriz, aceleram a coagulação sanguínea e promovem a cicatrização de feridas.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) causam danos às células e desempenham um papel crucial no início da resposta natural de cicatrização de feridas. Assim, compostos com ação antioxidante reduzem os danos dos tecidos por contribuírem para a neutralização das ROS, abundantes no local da ferida e que em excesso prejudicam a cicatrização.^{120,121} Eles previnem danos causados por radicais livres a outras moléculas vitais, como proteínas ou DNA, ativando uma cascata de reações que convertem ROS em moléculas mais estáveis e reduzem os níveis não tóxicos de ROS para proteger os tecidos.¹²² Para estimular a cicatrização eficaz de feridas, é importante proteger os tecidos da infecção e ativar os sinais de

sobrevivência das células.¹²³ Os antioxidantes são mantidos nos tecidos da ferida e ajudam a melhorar o processo de cicatrização.

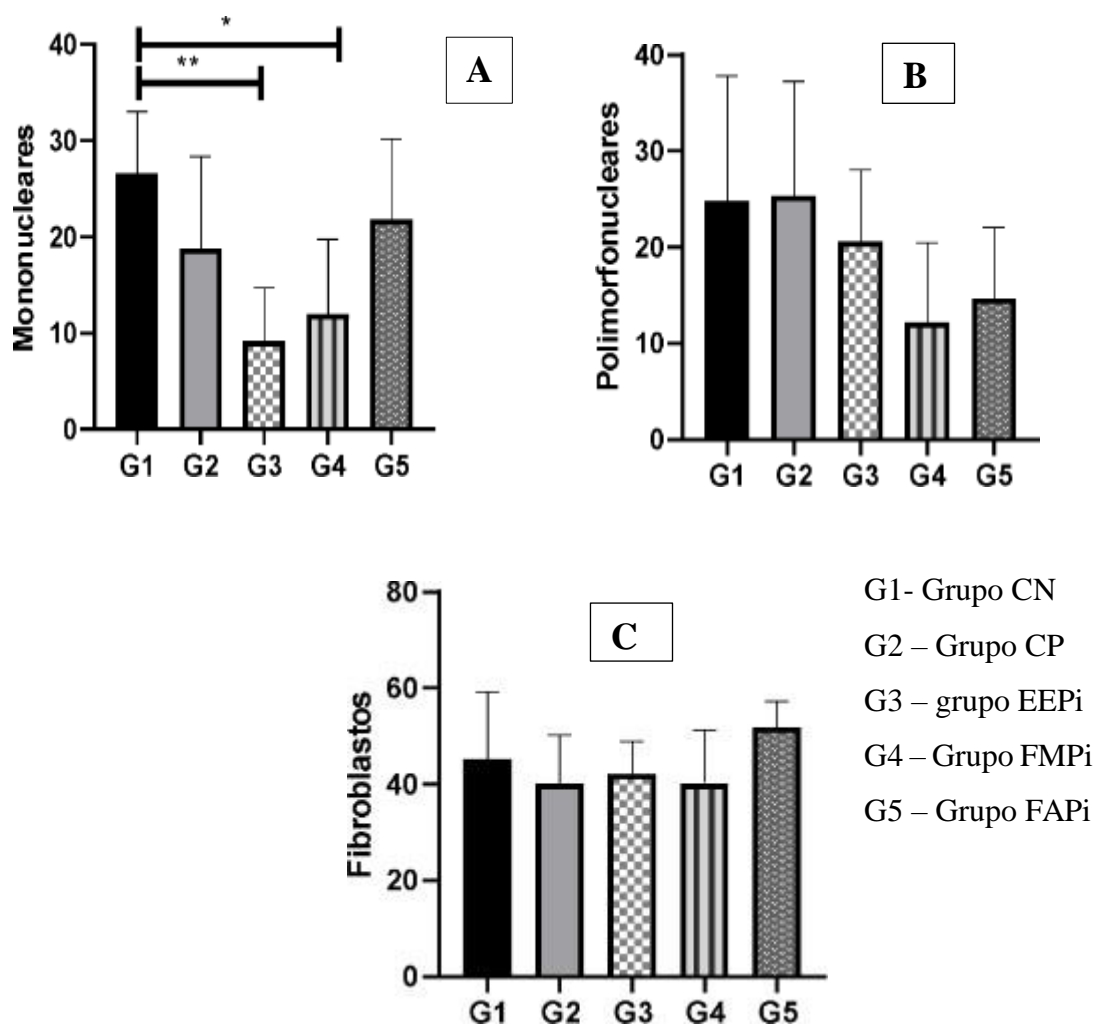
Segundo estudos de NECIP (2023)¹²⁴, relacionado a ação antioxidante e cicatrizante de feridas da mucosa oral que foi investigado usando incubação de extrato aquoso de própolis (PWE), mostrou que a galangina teve uma forte atividade de eliminação de radicais livres, o qual foi avaliado usando métodos de DPPH, ABTS e poder redutor de metais com BHA, BHT e trolox como controles. Foi observado que galangina obteve resultados próximos aos antioxidantes padrões, mostrando ser um excelente antioxidante. A pinobanksina, outro composto identificado no PWE, também apresentou uma atividade de eliminação de radicais livres considerável. Esses resultados corroboram com nosso estudo, já que esses compostos também foram identificados no extrato e frações da *P.insignis*, e por terem essa ação antioxidante, podem contribuir para acelerar o processo de cicatrização.

O TGF-beta (fator de crescimento transformador beta), é uma citocina importante para o reparo e a regeneração tecidual, pois estimula os fibroblastos a sintetizarem colágeno e outras proteínas estruturais da matriz extracelular. Ele impulsiona os fibroblastos a sintetizar colágeno tipo 1 e a se transformarem em miofibroblastos, ricos em actina e miosina, que estão envolvidos no processo da contração da ferida.¹²⁵ Alguns estudos mostram que os flavonoides podem influenciar positivamente o TGF- β , modulando a sua ação, ajudando assim a potencializar essa função de síntese de colágeno. GOMES et al, (2018)¹²⁶; mostrou em seus estudos que o uso de uma membrana bioativa de gelatina contendo naringenina (GEL/NAR) sobre a cicatrização em um modelo de feridas cutâneas abertas em roedores, provocou uma maior vascularização e deposição de

fibroblastos quando comparado aos outros grupos, acelerando a formação do tecido de granulação através de uma possível deposição de colágeno e atividade dos miofibroblastos. Esse resultado corrobora com nossos estudos, já que flavonoide naringenina foi um dos compostos identificado no extrato e frações *P. insignis*.

A análise histológica das lâminas confeccionadas com os materiais de pele dos animais submetidos aos procedimentos experimentais e coradas com H.E, nos permitiu ainda, a identificação e quantificação de células mononucleares, polimorfonucleares e células fibroblásticas, como é mostrado na figura 4.12.

Figura 4.12 (A) Células mononucleares no órgão lesionado. Animais tratados por 14 dias. Os valores mostram que há uma diferença significativa entre os grupos CN e EEPi, e entre os grupos CN e FMPI, com uma redução dessas células nos grupos tratados. (B) Células polimorfonucleares no órgão lesionado. Animais tratados por 14 dias. Não há diferença significativa entre os grupos estudados. (C) Número de fibroblastos no órgão lesionado. Animais tratados por 14 dias. Não há diferença significativa entre os grupos estudados. Os valores apresentados representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados ($n = 6$).*, estatisticamente significativo, $p < 0,05$. ANOVA seguida de Tukey.



Fonte: Autores, 2024

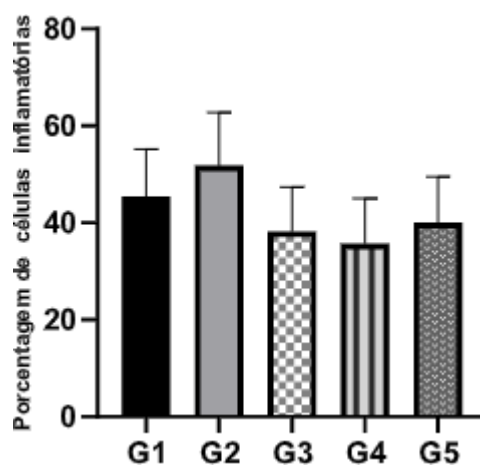
A avaliação da presença de células mono e polimorfonucleares permite a correlação da presença dessas com o desenvolvimento do processo inflamatório inicial.¹¹⁸ As primeiras células circulantes a povoarem a área e as encontradas em maior quantidade no processo inflamatório são os neutrófilos. Em seguida, os macrófagos unem-se a esses com a função semelhante de proteção contra microrganismos patógenos.¹²⁷

O material celular mononucleado pode ser diretamente relacionado à presença de macrófagos. Espera-se que a relação entre essas células inflamatórias

e número de dias de tratamento seja inversamente proporcional. O avançar do período pós-operatório requer uma diminuição de células mononucleares, pois o processo inflamatório, inicialmente essencial ao processo de cicatrização, é completado e novas fases ganham prioridade, como a fibroplasia, deposição de matriz extracelular e remodelação.¹²⁸

Os dados da avaliação quantitativa corroboram as análises qualitativas, mostrando que o tratamento de 14 dias apresenta uma maior proporção de fibroblastos no grupo CN em relação aos demais, e que a proporção de células inflamatórias ainda se mantém elevadas em todos os grupos, essa percepção acontece quando se observa a proporção de células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares) em porcentagens nos grupos estudados, figura 4.13.

Figura 4.13 Porcentagem de células inflamatórias no órgão lesionado. Animais tratados por 14 dias.

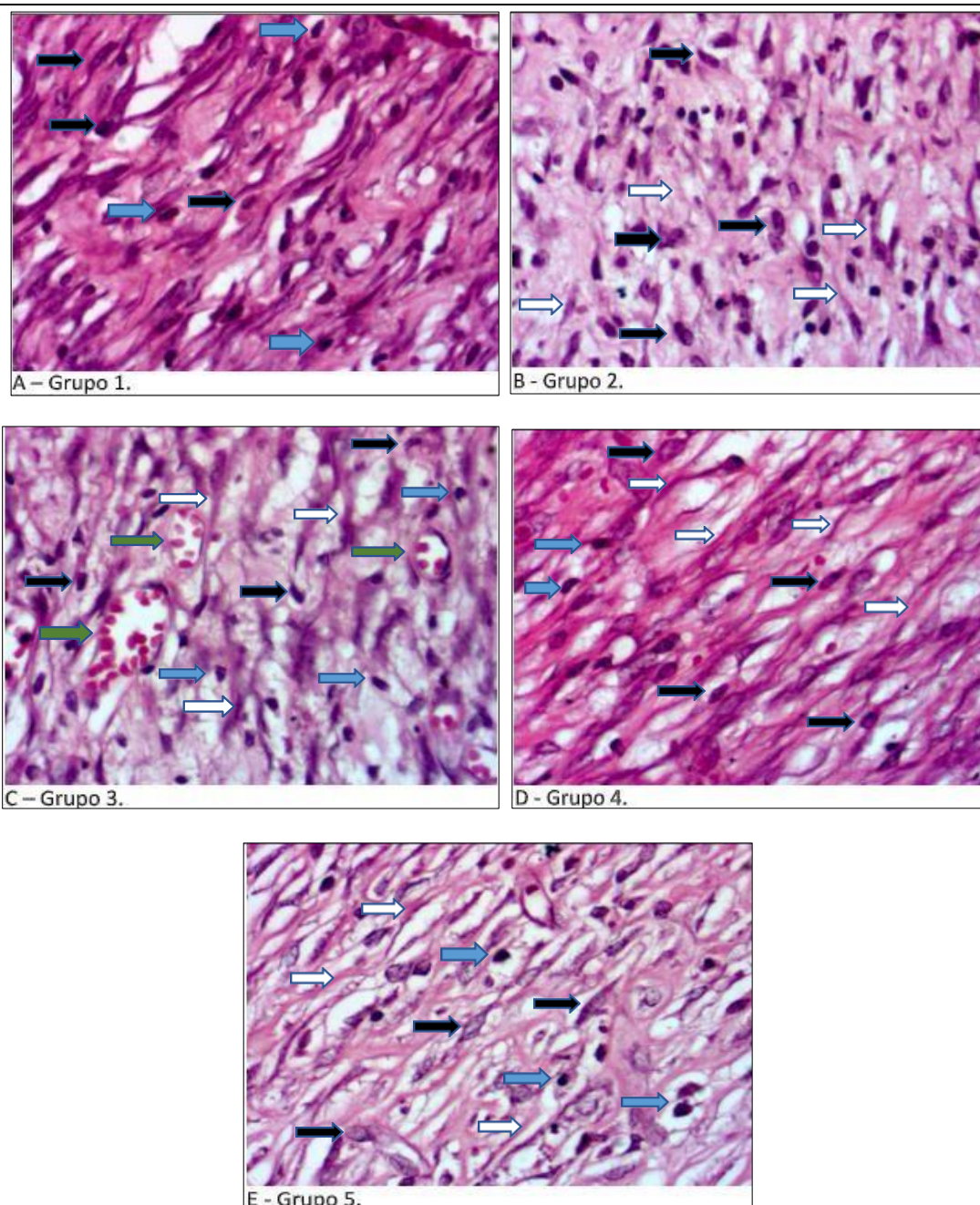


Fonte: Autores, 2024.

Analizando individualmente cada grupo celular, embora com uma média de 40% de células inflamatórias, mostra que talvez os extratos utilizados não tenham a absorção adequada ao ponto de contribuir com essa etapa do processo de

cicatrização que é a diminuição do processo inflamatório, e com isso não conseguiram inibir a ação o de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa), as interleucinas como IL-6 ou os leucotrienos, que podem contribuir para a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular no local da inflamação, porém, pode-se opinar que os grupos G3 (EEPi) e G4 (FMPi) obtiveram uma melhor resposta anti-inflamatória, e o grupo G5 (FAPi) reduziu um grupo de células importantes, os polimorfonucleares, já que esses só se apresentam na pele se forem recrutados por meio de mediadores inflamatórios. Nesse intervalo de tempo, os animais dos grupos FMPi e FAPi obtiveram um melhor resultado, observando o número de fibroblastos associado a redução de células inflamatórias, como mostrado na figura 13, o que pode ser corroborado com os dados de regressão da cicatriz no mesmo período nesses grupos.

Figura 4.14 Mosaico de imagens da pele dos animais tratados por 14 dias. A – Representa o grupo 1, tratado somente com o creme(CN); B – Representa o grupo 2, tratado com o medicamento collagenase (CP); C – Representa o grupo 3, tratado com o creme EEPi; D – Representa o grupo 4, tratado com o creme da FMPi e E – Representa o grupo 5, tratado com creme da FMPi. Seta preta indica fibroblasto; Seta azul aponta célula inflamatória; Seta branca remete a fibra colágeno; Seta verde aponta vaso sanguíneo. Todas a imagens obtidas com o aumento de 10 x 40.



Fonte: Autores, 2024.

Assim, a utilização do extrato etanólico e frações das folhas da *P.insignis* associados a creme hidratante, mostraram que contém substâncias químicas ativas que ajudaram na cicatrização de feridas, ao qual, promoveu a maior deposição de fibroblastos no tecido conjuntivo no período de 14 dias de tratamento. Essas células

são responsáveis pela síntese de colágeno, o principal agente no processo de remodelação, capaz de conferir força e qualidade à área reepitelizada.¹²⁹ O crescimento populacional de fibroblastos ajuda a acelerar a cicatrização de feridas. Além disso, apesar de constar uma quantidade de células inflamatórias no período de 14 dias, o tratamento com o creme da FMPI reduziu um grupo considerados de células polimorfonucleares, indicando que essa associação atuou na redução do processo inflamatório, de forma a contribuir para o processo de cicatrização. A ação anti-inflamatória desse produto pode ser associada à presença de metabólitos secundários na composição química da planta.

Capítulo 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que os constituintes químicos das folhas de *P. insignis* apresentaram bons parâmetros farmacocinéticos, tais como a distribuição pelos tecidos e por se ligarem fortemente às proteínas plasmáticas, além de atenderem à Regra de Lipinski de forma bastante satisfatória. Os cremes à base do extrato etanólico e frações das folhas da *P. insignis*, apresentaram a capacidade de inibição do crescimento para as bactérias *S. aureus* e *E. coli* (exceto no extrato) e para espécie fúngica *Candida albicans*, comprovando um efeito antibacteriano e antifúngico. Além disso, não apresentaram potencial irritante no teste de HET-CAM, uma vez que nenhum dos cremes apresentou coagulação e/ou lise de vasos, e com uma ligeira irritação hemorrágica, tendo um escore de irritação entre 1 e 4,9, mostrando que não houve efeito tóxico.

Os cremes atuaram positivamente no processo de cicatrização de feridas cirurgicamente induzidas em ratos, evidenciado através de redução de áreas das feridas e na reepitelização mais acelerada, quando comparados ao Grupo Controle Negativo, principalmente, no período de 14 dias. O tratamento com o creme a base da FMPi apresentou melhor resultado, pois mostrou uma diminuição das células polimorfonucleares e um aumento de fibroblastos em comparação aos outros grupos no período de 14 dias. O estudo fitoquímico revelou a presença de metabólitos secundários alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, esteroides no extrato etanólico das folhas de *P. insignis*. A análise por UPLC revelou a presença, no

extrato e frações, dos flavonoides naringenina, pinobanksina, pinocembrina e galangina que possuem ação antioxidante, na qual, ajudam a neutralizar os radicais livres e reduzem o estresse oxidativo nas células da pele, criando um ambiente mais propício para a cicatrização e a ação anti-inflamatório, evitando uma inflamação excessiva ou prolongada que pode retardar a recuperação e causar complicações no processo cicatricial.

Verifica-se, portanto, que o extrato e frações de *P. insignis* favorecem o processo cicatricial, porém, o aparecimento de 40% de células inflamatórias em 14 dias, em todos os grupos, faz necessitar um estudo mais profundo, com ênfase na permeabilidade cutânea dos metabólitos secundários, para aumentar eficácia e a utilização da planta no tratamento de feridas.

REFERÊNCIAS

1. DE AQUINO JUNIOR, A. E. ; CARBINATTO, F. M; COELHO, V. H. M.; BAGNATO, V. S. Feridas – Um desafio para a saúde pública. São Carlos: Editora, 2019.216p.
2. KIERSZENBAUM, L., A. Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução à Patologia, 5th Edition. [[VitalSource Bookshelf version]]. Retrieved from vbk://9788595158382 (2021)
3. JOVEM, A., MCNAUGHT, C.E. A Fisiologia da Cicatrização de Feridas. Surg. Oxf. 2011; 29 :475–479. doi: 10.1016/j.mpsur.2011.06.011. [CrossRef] [Google Acadêmico].
4. GHOMI, E.R; SHAKIBA, M; ARDAHAEI A.S; KENARI, M.A; FARAJI, M., ATAEI, S.; KOHANSAL, P.; JAFARI, I. ABDOUSS, M.; RAMAKRISHNA, S. Inovações na administração de medicamentos para cura de feridas crônicas. Curr. Farmacêutico. Des. 2022; 28 :340–351. doi: 10.2174/1381612827666210714102304.
5. BEN-SHABAT S, YARMOLINSKY L, PORAT D, DAHAN A. Efeito antiviral de fitoquímicos de plantas medicinais: aplicações e estratégias de administração de medicamentos. Administração de Medicamentos e Pesquisa Translacional 10(2):354-367, 2020.
6. AKRAM M, RIAZ M, NOREEN S, SHARIATI MA, SHAHEEN G, AKHTER N, PARVEEN F, AKHTAR N, ZAFAR S, OWAIS GHOURI A, RIAZ Z. Potencial terapêutico de plantas medicinais para o tratamento da sarna. Dermatologic Therapy 33:e13186, 2020.
7. BALACHANDAR V, MAHALAXMI I, KAAVYA J, VIVEKANANDHAN G, AJITHKUMAR S, ARUL N, SINGARAVELU G, SENTHIL KUMAR N, MOHANA DEV S. COVID-19: medidas de proteção emergentes. Revisão Europeia de Ciências Médicas e Farmacológicas 24(6):3422-3425, 2020.
8. MEHTA, P.; XÁ, R.; LOHIDASAN, S.; MAHADIK, K.R; Perfil Farmacocinético de Fitoconstituente(s) Isolados de Plantas Medicinais - Uma Revisão Abrangente. J. Tradição. Complemento. Med. 2015 , 5 , 207–227. [Google Scholar] [CrossRef] [Versão Verde]
9. PORTUGUÊS OVAIS, M.; AHMAD, I.; KHALIL, AT; MUKHERJEE, S.; JAVED, R.; AYAZ, M.; RAZA, A.; SHINWARI, ZK. Aplicações de cicatrização de feridas de nanopartículas biogênicas coloidais de prata e ouro: tendências recentes e perspectivas futuras. 2018 , 102 , 4305–4318.
10. ZOHRA, T.; OVAIS, M.; KHALIL, A.T; QASIM, M.; A.Y.A.Z, M.; Shinwari. Otimização de Extração ZK, Fenólico Total, Conteúdo de Flavonóides, Análise HPLC-DAD e Avaliações Farmacológicas Diversas de Disphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants. Nat. Prod. Res. 2019 , 33 , 136–142. [Google Scholar] [CrossRef]

11. LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C; NAKAMURA, C.V; DIAS FILHO, B.P; HERNANDES, L.; DE MELLO, J.C.P; Influência de Extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e *Stryphnodendron obovatum* Benth. sobre a cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *J. Etnofarmacol.* 2005, 99 ,265–272. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
12. DESHMUKH, P.T; FERNANDES, J.; ATUL, A.; TOPPO, E. Atividade de cicatrização de feridas da casca da raiz de *Calotropis Gigantea* em ratos. *J. Etnofarmacol.* 2009 , 125 , 178–181. [Google Scholar] [CrossRef]
13. GETIE, M.; GEBRE-MARIAM, T.; RIETZ, R.; NEUBERT, R.H.H. Avaliação dos perfis de liberação de flavonoides de formulações tópicas do extrato bruto das folhas de *Dodonea Viscosa* (Sapindaceae). *Die Pharmazie* 2002, 57,320–322. [Google Acadêmico] [PubMed].
14. SHETTY, N.P; JØRGENSEN, H.J.L; JENSEN, J.D; COLLINGE, D.B; SHETTY, H.S. Papéis das espécies reativas de oxigênio nas interações entre plantas e patógenos. *EUR. J. Planta Pathol.* 2008 121 , 267–280. [Google Scholar] [CrossRef]
15. MOURA, M.C.C.L. Bacuri: Agrobiodiversidade. São Luis: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. 1ª ed. 2007. 210 p.
16. SOUSA, T.O; SILVA, R.A.C; CAVALCANTE, M.V.S; CITÓ, A.M.G.L; SAFFI, J; COSTA JÚNIOR, J.S. Atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos e frações das sementes de *Platonia insignis* MART. In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2009
17. SOUZA, A.C. et al., *Platonia insignis* Mart., uma planta amazônica brasileira: o extrato de casca do caule e seu principal constituinte, o lupeol, exercem efeitos antileishmania envolvendo a ativação de macrófagos. *Complemento Alternativo Baseado em Evid Med*, 2017.
18. BERNARDO, C. B.; SANTOS, K.; SILVA, D. P. Pele: Alterações anatômicas do nascimento à maturidade. *Revista saúde em foco, Brasil*, n.11, p. 1221-1233, 2019.
19. TORTORA, G. J.; NIELSEN, M. T. *Princípios de anatomia humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
20. MCKELVEY K, JACKSON CJ, XUE M. Activated protein C: A regulator of human skin epidermal keratinocyte function. *World J Biol Chem.* 2014 May 26;5(2):169-79. doi: 10.4331/wjbc.v5.i2.169. PMID: 24921007; PMCID: PMC4050111.
21. SHI, Yupeng et al. Janus amphiphilic nanofiber membranes synergistically drive antibacterial and anti-inflammatory strategies for skin wound healing. *Materials and Design*, [s. l.], v. 227, 2023.
22. WEI, Zeming et al. Jailbreak and guard aligned language models with only few in-context demonstrations. *arXiv preprint arXiv:2310.06387*, 2023.

23. GOMES, F.P, GALVÃO, N.S, ALBUQUERQUE, A.D. Perfil sociodemográfico e clínico dos pacientes com lesões agudas e crônicas em atendimento ambulatorial. REAS/EJCH 2021;13(2):e5196. <https://doi.org/10.25248/reas.e5196.2021>
24. MENDES, E.V. Interview: The chronic conditions approach by the Unified Health System. Ciênc Saúde Colet 2018;23(2):431-5. <https://doi.org/10.1590/1413-81232018232.161520173>.
25. COTRIM, O.S. Auditoria em saúde promovendo o desenvolvimento de novos produtos para feridas crônicas. Revista Saúde e Desenvolvimento. 2017;11(9):283-307.
26. WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes: Cellular Mechanisms of Wound Repair. [S. l.]: Royal Society Publishing, 2020.
27. WILLENBORG, S. et al. Mitochondrial metabolism coordinates stage-specific repair processes in macrophages during wound healing. Cell Metabolism, [s. l.], v. 33, n. 12, p. 2398-2414.e9, 2021.
28. TOTTOLI, E. M. et al. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. [S. l.]: MDPI AG, 2020.
29. WANG, G. et al. The initiation of oxidative stress and therapeutic strategies in wound healing. [S. l.]: Elsevier Masson s.r.l., 2023.
30. DALISSON, B.; BARRALET, J. Bioinorganics and Wound Healing. [S. l.]: Wiley-VCH Verlag, 2019.
31. CAPELLA, S. O. et al. Traumatic skin injuries in small animals: characteristics and treatments. Brazilian Applied Science Review, v. 4, n. 2, p. 459-467, 2020.
32. BIZINOTO, L. B. et al.. Wound treatment principles . International Journal of Health Science, v. 2, n. 18, 2022.
33. BUDOVSKY A, YARMOLINSKY L, BEN-SHABAT S. Effect of medicinal plants on wound healing. Wound Repair Regen. 2015 Mar-Apr;23(2):171-83. doi: 10.1111/wrr.12274
34. GONÇALVES, Rodrigo Noll et al. Plantas medicinais na atenção primária à saúde: riscos, toxicidade e potencial para interação medicamentosa. Revista de APS, v. 25, n. 1, 2022.
35. HOSSEINZADEH, H.; MOHAMMADI, S. Quince seed mucilage magnetic nanocomposites as novel bioadsorbents for efficient removal of cationic dyes from aqueous solutions. Carbohydrate polymers, v. 134, p. 213-221, 2015.
36. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília: Anvisa, 2011. 126 p.
37. DIAS,V.N.et al.Plantas medicinais do Cerrado: potencial terapêutico, farmacológico e de preservação, Revista Cerrado Agrociências, v. 14, 2023.

38. PORTELLA, C. F. S. Naturologia, transdisciplinaridade e transracionalidade. Cadernos de Naturologia e Terapias Complementares, 2013 2(3), 57-65.
39. LOMBARDO, M. Potencial adverso de medicamentos fitoterápicos: um estudo com foco em medicamentos de registro simplificado. Rev Ciên Saúde. 2018 <https://revistaeletronicafunvic.org/index.php/c14ffd10/article/view/91/85>
40. BRUNING, M. C. R; et al. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. Ciência & saúde coletiva, v. 17, p. 2675-2685, 2012.
41. AGUIAR, L. P. Qualidade e potencial de utilização de bacuris oriundos da região meio-norte. 2008, 114f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará - Departamento de Tecnologia de Alimentos. Fortaleza, 2008
42. ALBUQUERQUE, J.M.M; SILVA, I.F.M.; SILVA, A.M.O.; SOARES, S.R.; ARAÚJO, T.C.; DE FREITAS, S.D.L.; UCHÔA, V.T. Bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.), phytochemical profile and therapeutic and medicinal uses: a bibliographical review. Science, Society and Emerging Technologies v. 2 n. 1 p. 165 – 179, 2024
43. Rev. Bras. Futico., v. 29, n. 3, p. 657-660, dezembro 2007.
44. FERREIRA, S.L et al. PERFIL FITOQUÍMICO, TOXICOLÓGICO E FARMACOLÓGICO DE *Platonia insignis* Mart.: UMA REVISÃO INTEGRATIVA. Ciências da vida: estudo das plantas, animais e seres humanos / Organizadores Clécio Danilo Dias da Silva, Danyelle Andrade Mota. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.
45. LUSTOSA, A.K.M.F; et al. Avaliação imunomodulatória e toxicológica de sementes de frutos de *Platonia insignis*, uma espécie nativa da floresta amazônica brasileira. Rev. Brás. Farmacog. 2016, 26, 77-82.
46. TEIXEIRA, N.; et al. Frutos comestíveis da biodiversidade brasileira: uma revisão sobre suas características sensoriais versus bioatividade como ferramenta para selecionar pesquisas. Alimentos Res. Int. 2019, 119, 325-348.
47. DO NASCIMENTO, C.A.; et al. Toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e modelos antioxidantes in vitro de 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol isolado do extrato hexânico de sementes de *Platonia insignis* Mart. Tóxico. Rep. 2020; 7 :209-216.
48. SANTOS JÚNIOR R.Q., SOARES L.C., MAIA FILHO, A.L.M., ARAUJO, K.S, SANTOS, I.M.S.P., COSTA JÚNIOR J.S, SAFFI, J. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). ConScientiae Saúde. 9(4): 575-581, 2010.
49. COSTA, R. C.; NUNEZ, C. V. Mercado de bioprodutos fitoterápicos e fitocosméticos: gestão, tecnologias e inovação. Revista Fitos, v. 10, n. 3, p. 295–306, 2016.

50. PAULA, A. et al. *Platonia insignis* Mart com aplicações farmacológicas para o Sistema Nervoso Central: uma revisão. Boletim Informativo Geum, v. 7, n. 2, p. 24–31, 2016.
51. COSTA JÚNIOR, J.S.; DE ALMEIDA, A.A.C.; FERRAZ, A.A.B.F.; ROSSATTO, R.R.; SILVA, T.G.; SILVA, P.B.N.; MILITÃO, G.C.G.; CITÓ, A.M.G.L.; SANTANA, L.C.L.R.; CARVALHO, F.A.A; FREITAS, R.M. Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. Nat Prod Res. 2013 Mar;27(4-5):470-4.
52. COSTA JÚNIOR, J S et al. Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart.(Bacuri) on epilepsy models. Epilepsy & Behavior, v. 22, n. 4, p. 678-684, 2011.
53. COSTA JÚNIOR, J. S. et al. Evaluation of effects of ethanolic extract (EE) from *Platonia insignis* Mart. on pilocarpine-induced seizures. J Biol Sci, v. 10, p. 747-753, 2010.
54. MORAES, L. R. B.; GUTJAHR, E. Química de Oleogenosas: Valorização da Biodiversidade Amazônica Brasília. German Technical Cooperation Agency, 2009.
55. LUSTOSA, A.K.M.F et al. Formulações tópicas à base de manteiga de sementes de *Platonia insignis* Mart. para o tratamento de lesões relacionadas à leishmaniose cutânea experimental. Research, Society and Development, v. 10, n. 4, e52310413665, 2021.
56. RUFINO, Maria do Socorro M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. Food chemistry, 2010.
57. SHANLEY, P.; MEDINA, G. Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Cifor, 2005.
58. SILVA, A.F. et al., Atividades antifúngicas e antivirulentas do extrato hidroalcoólico e frações de folhas de *Platonia insignis* contra isolados vaginais de espécies de *Candida*. Patógenos, 2020.
59. SILVA, D.L.M.L; CAVALCANTE, M.C. Estudo in silico da espécie *Dysphania ambrosioides* usada pela Comunidade Quilombola Timbó, Pernambuco, Brasil. Farmacologia Integrada: pesquisas emergentes em casos, efeitos e usos clínicos: Editora Científica Digital www.editoracientifica.org - Vol. 1 - Ano 2022.
60. RODRIGUES, L.A., MAGALHÃES, L.S., PUSSENTE, C.G., CRESPO, J.M.R.S. Elaboração de um fitoterápico antibiótico a partir da casca de *Anadenanthera macrocarpa*. Revista científica da Faminas. 10(3), 23-39, 2016.
61. SANTOS, R. B.; VALE, W. F. S.; COSTA, C. L. S. Planejamento estrutural, desenvolvimento e análise de propriedades farmacocinéticas in silico de análogos do ácido salicílico para fins cosméticos. Estação Científica (UNIFAP), v. 7, n. 1, p. 103-112, 2017.

62. CAMPOS, S.C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. *Rev. bras. plantas med.* 18 (1 suppl 1) • 2016 • https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_057.
63. MOURA, N.S., VASCONCELOS, A.C.M., BERNABÉ, B.M., TEIXEIRA, L.J.Q., SARAIVA, S.H. (2012). Ensaio toxicológicos: Um estudo sobre a utilização de testes in vivo e in vitro. *Enciclopédia biosfera*. 8(15), 1945-1956.
64. SRINIVAS, N.; SANDEEP, K. S.; ANUSHA, Y.; DEVENDRA, B. N. In vitro cytotoxic evaluation and detoxification of monocrotaline (Mct) alkaloid: an in silico approach. *International Invention Journal of Biochemistry and Bioinformatics*, v. 2, n. 3, p. 20- 29, 2014.
65. ANDRADE, E. L. et al. Non-clinical studies in the process of new drug development -Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 49, n. 12, 12 dez. 2016.
66. MATOS, F. J. A. 2009. *Introduction to Experimental Phytochemistry*. Editora UFC, Fortaleza.
67. KIM, S., J. CHEN, T. CHENG, A. GINDULYTE, J. HE, S. HE, AND E. E. BOLTON. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic acids research*, 49(D1):D1388-D1395, 2021.
68. DAINA, A., O. MICHIELIN, AND V. ZOETE. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, 7(1):1-13, 2017.
69. LEE, S. K., I. H. LEE, H. J. KIM, G. S. CHANG, J. E. CHUNG, AND K. T. NO. The PreADME Approach: Web-based program for rapid prediction of physico-chemical, drug absorption and drug-like properties. *EuroQSAR 2002 Designing Drugs and Crop Protectants: processes, problems and solutions*, 418-420, 2003.
70. ZHAO, Y.H.; J. LE, M. H. ABRAHAM, A. HERSEY, P.J. EDDERSHAW, C. N. LUSCOMBE, D. BUTINA, G. BECK, B. SHERBORNE, I. COOPER, et al. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. *J Pharm Sci*, 90(6):749-84, 2001.
71. YAMASHITA, S.; FURUBAYASHI, T.; KATAOKA, M.; SAKANE, T.; SEZAKI, H.; TOKUDA, H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 10: 195–204, 2000.
72. IRVINE, J. D.; L. TAKAHASHI, K.; LOCKHART, J.; CHEONG, H. E.; SELICK, R. GROVE. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J. Pharm. Sci.*, 88 (1):28–33, 1999.
73. WERMUTH, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 2th ed. Academic Press: Great Britain, 2003.
74. MA, X. L., C. CHEN, AND J. YANG. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 26:500-512, 2005.

75. LI, Li; HALPERN, Joseph Y. Minimum-energy mobile wireless networks revisited. In: ICC 2001. IEEE International Conference on Communications. Conference Record (Cat. No. 01CH37240). IEEE, 2001. p. 278-283.
76. AMES, B. N., W. E. DURSTON, E. YAMASAKI, AND F. D. LEE. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. PNAS, 70 (8):2281-2285, 1973.
77. ALVES, V. M.; BRAGA, R. C.; MURATOV, E. N.; ANDRADE, C. H. Químioinformática: uma introdução. Quím. Nova, 41 (2), 2018.
78. YU, Z.; IJZERMAN, A. P.; HEITMAN, L.H. Kv11.1 (hERG)-induced cardiotoxicity: a molecular insight from a binding kinetics study of prototypical Kv11.1 (hERG) inhibitors. Br J Pharmacol, 172 (3): 940-955, 2015.
79. AWADELKAREEM, Amir Mahgoub et al. Phytochemical and in silico ADME/Tox analysis of *Eruca sativa* extract with antioxidant, antibacterial and anticancer potential against Caco-2 and HCT-116 colorectal carcinoma cell lines. Molecules, v. 27, n. 4, p. 1409, 2022.
80. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; 9th. ed. Approved standard: NCCLS document M07-A9. Wayne NCCLS, 2012. V. 32.
81. CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th Informative Supplement. Document M100-S19. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, 2009.
82. DESHMUKH, G. R.; KUMAR, K. H.; REDDY, P. V. S.; RAO, B. A.; KUMAR, C. V. S. Irritation Potential of Aqueous Leaf Extract of *Achyranthes aspera* by In Vitro and In Vivo Method. ISRN Toxicology, v. 2012, 2012.
83. ICCVAM - Documento de revisão de antecedentes Status atual dos métodos de teste in vitro para identificar irritantes oculares leves/moderados: o método de teste do ovo de galinha - membrana corioalantóide (HET-CAM)(2010).
84. DEROUICHE, M. T. T.; ABDENNOUR, S. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. Toxicology in Vitro, v. 45, p. 393-396, 2017.
85. ROCHA, Ana Carolina Pereira. Análise de transcriptoma de células-tronco mesenquimais humanas durante a osteogênese. 2017. Dissertação de Mestrado. Brasil.
86. ROCHA, E.S. et al. Produção de bioprodutos com atividade antimicrobiana a partir do extrato das folhas de *Platonia insignis* Mart. (BACURI). São Luis- MA, 2017.
87. SILVA, A.G.A.; MOREIRA, R.A.; DE SOUSA, R.P.; FILHO, E.S.M.; VERAS, M.D.A; CHAVES, M.H.; DE FREITAS, S.D.L. Composição química e atividades fotoprotetora e antiradicalar in vitro dos galhos de *Platonia insignis* (CLUSIACEAE). Quím. Nova, Vol. 44, No. 8, 2021.

88. MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.
89. RODRIGUES DA SILVA, Laís et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. Acta toxicol. argent., Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 23, n. 1, p. 36-43, mayo 2015.
90. SIMÕES, C. M. O.; SCHEMKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC, p.1104, 2007.
91. ZHENG, Y. et al. Theoretical studies on the antioxidant activity of pinobanksin and its ester derivatives: Effects of the chain length and solvent. Food chemistry, v. 240, p. 323- 329, 2018.
92. PINHEIRO, E.E.A.; BEZERRA, E.A.; OLIVEIRA, F.C.B.; SANTOS, J.V.O.; CAVALCANTE, A.A.C.M.; SOUSA, J.M.C.; LIMA NETO, J.S.; ARCANJO, D.D.R.; CITÓ, A.M.G.L.; Estudo fitoquímico e potencial antioxidante das flores do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart). Editora Científica. Livro – fitoquímica-potencialidades-biológicas-dos-biomas-brasileiros-vol2, 2022.
93. SILVA, A.P. et al., Garcinielliptone FC: atividade antiparasitária sem citotoxicidade para células de mamíferos. Toxicol In Vitro, 2015.
94. BEZERRA, É.A.; ALVES, M.M.M.; LIMA, S.K.R.; PINHEIRO, E.E.A.; AMORIM, L.V.; LIMA NETO, J.S.; CARVALHO, F.A.A.; CITÓ, A.M.D.G.L.; ARCANJO, D.D.R. Biflavones from *Platonia insignis* Mart. Flowers Promote In Vitro Antileishmanial and Immunomodulatory Effects against Internalized Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. Pathogens. 2021 10;10(9):1166.
95. SILVA, K. B. et al. Phytochemical characterization, antioxidant potential and antimicrobial activity of *Averrhoa carambola* L.(Oxalidaceae) against multiresistant pathogens. Brazilian Journal of Biology, v. 81, n. 3, p. 509-515, 2020.
96. SOROMOU LW, CHU X, JIANG L, WEI M, HUO M, CHEN N, et al. In vitro and in vivo protection provided by pinocembrin against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. Int Immunopharmacol. Sep;14(1):66– 74, 2012.
97. MAHZAD, M. et al. Naringenina: um potencial fitoquímico flavonóide para terapia do câncer. ELSEVIER, V.305, 2022.
98. DONG, Y.; HUANG, H.; ZHAO, M.; SUN-WATERHOUSE, D.; LIN, L.; XIAO, C. Mechanisms underlying the xanthine oxidase inhibitory effects of dietary flavonoids galangin and pinobanksin. J Funct Foods.; 24:26–36, 2016.
99. CHEN, W.; ZHANG, Y.; QIANG, Q.; ZOU, L.; ZOU, P.; XU, Y. Pinobanksin from peony seed husk: A flavonoid with the potential to inhibit the proliferation of SH-SY5Y. Food Sci Nutr. 12(2):815–29, 2024.

100. DA SILVA, M.L.S.; MOURÃO, P.S.; Reis, V.R.S.; Costa, C.A.C.B.; Moura, O.F.S.; Moreira, R.A.; De Freitas, J.D.; De Freitas, S.D.L.; Marques, R.B.; Figueredo-Silva, J.; Ferreira, D.C.L.; Uchôa, V.T.; Maia-Filho, A.L.M. Therapeutic action of the ethanolic extract of *Platonia insignis* Mart. leaves on induced respiratory distress syndrome in rats. *South African Journal of Botany* 160 (2023), 235-245.
101. YUAN, Y., S. CHANG, Z. ZHANG, Z. LI, S. LI, P. XIE, W-P. YAU, H. LIN, W. CAI, Y. ZHANG, AND X. XIANG. A novel strategy for prediction of human plasma protein binding using machine learning techniques. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* , 199(15):103962, 2020.
102. DI, L. The role of drug metabolizing enzymes in clearance. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*, 10:379–393, 2014.
103. TESTA, B.; KRAEMER S. D.. The biochemistry of drug metabolism – na introduction. *Chem Biodivers*, 4(3), 2007.
104. RANG, M. M., AND H. P. DALE. “RANG & DALE Farmacologia 8ed,” Elsevier, 2016.
105. VAN DE WATERBEEND, H., AND E. GIFFORD. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nature Rev. Drug Discovery*, 2:192–204, 2003.
106. WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T.L. Foye’s principles of medicinal chemistry. 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, p. 408-433, 2002.
107. URSU, O., A. RAYAN, A. GOLDBLUM, AND T. I. OPREA. Understanding drug-likeness. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci*, 1:760-781, 2011.
108. LIPINSKI, C.A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 44(1):235-49, 2000.
109. LIPINSKI, C.A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Ver*, 46(1-3):3-26, 1997.
110. VEBER, D.F.; JOHNSON, S.R.; CHENG, H-Y.; SMITH, B.R.; WARD, D.W.; KOPPLE, K.D. Molecular Properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*, 45(12):2615-23, 2002.
111. RABELO, A.; MOTA, L.; PINHEIRO, G. O USO DE ANTICONCEPCIONAIS EM PATCH TRANSDÉRMICOS (FARMÁCIA). *Repositório Institucional*, v. 1, n. 1, 2023.
112. SOBANSKA, Z. et al., Aplicações e atividade biológica de nanopartículas de manganês e óxidos de manganês em modelos in vitro e in vivo. *Revista Nanomateriais*. Volume 11, ed.5. 2021.
113. SILVA, Danielly Larissa de Moraes Lima; CAVALCANTE, Giani Maria. Estudo in silico da espécie *Dysphania ambrosioides* usada pela Comunidade Quilombola Timbó, Pernambuco, Brasil. In: FARMACOLOGIA INTEGRADA: PESQUISAS EMERGENTES EM CASOS, EFEITOS E USOS CLÍNICOS. Editora Científica Digital, 2022. p. 74-82.

114. SILVA, Anderson França da et al. Anti-Candida albicans activity of ononin and other secondary metabolites from *Platonia insignis* MART. *Metabolites*, v. 12, n. 11, p. 1014, 2022.
115. LUEPKE, N.P. Teste de membrana corioalantóica de ovo de galinha para potencial de irritação. *Química Alimentar. Toxicol.* 1985 ,23 , 287–291. [Google Scholar] [CrossRef]
116. PEREIRA, R.L; LEITES, F.I; PAESE, K.; ESPONCHIADO, R.M; MICHALOWSKI, C.B; GUTERRES, S.S; SCHAPOVAL, E.E.S; Hidrogel contendo nanocápsulas de núcleo lipídico carregadas de adapaleno e dapsona para aplicação cutânea: Desenvolvimento, caracterização, estudos de irritação e permeação in vitro. *Desenvolvedor de drogas. Ind.* 2016.
117. BALESTRIN, L.A. Nanoemulsões carregadas com extrato de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) como um promissor sistema de administração de cura tópica de feridas: avaliações in vitro em queratinócitos humanos (HaCaT) e potencial irritante HET-CAM. 2021;13(8):1241. doi: 10.3390/farmacêutica13081241.
118. MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *Anais Brasileiro de Dermatologia* 2003, 78, 393.
119. SANTOS JÚNIOR, R. Q. et al. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). *ConScientiae Saúde*, v. 9, n. 4, p. 575-581, 2010.
120. PITZ, H. S. Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de extratos de cascas de jabuticaba (*Plinia peruviana*) e sua atuação durante o processo de cicatrização. 2018. 165 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.
121. VALIZADEH, R. et al. Wound healing potential of *Althaea officinalis* flower mucilage in rabbit full thickness wounds. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Hainan, v. 5, n. 11, p. 937-943, 2015.
122. DUNNILL C, PATTON T, BRENNAN J, BARRETT J, DRYDEN M, COOKE J, LEAPER D, GEORGOPOULOS NT. Espécies reativas de oxigênio (ROS) e cicatrização de feridas: o papel funcional das ROS e tecnologias emergentes de modulação de ROS para aumento do processo de cicatrização. *Int Wound J.* 2017;14(1):89–96.
123. SCIALO F, FERNANDEZ-AYALA DJ, SANZ A. Papel do Transporte Reverso de Elétrons Mitocondriais na Sinalização de ROS: papéis potenciais em Saúde e Doença. *Front Physiol.* 2017;8:428.
124. NECIP, A. et al. Isolamento de compostos fenólicos da própolis de abelha branca ecológica: efeitos antioxidantes, cicatrizantes e anti-Alzheimer. *Ciência da Alimentação Nutr.* 2023;12(3):1928-1939. doi: 10.1002/fsn3.3888. 2024.

125. MEDEIROS, A. C.; DANTAS FILHO, A. M. Cicatrização de feridas cicúrgicas. J Surg CI Res, v. 7, n. 2, p. 87-102, jul. 2016.
126. GOMES, D. C. Bioactive gelatin membrane containing naringenin in liposomes in tissue repair. 2018. 51f. Monograph (Undergraduate Nursing) - Center for Biological and Health Sciences, Department of Nursing, Federal University of Sergipe, Aracaju, 2018.
127. OLIVEIRA, I. V. P. D. M.; DIAS, R. V. D. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. Acta Veterinária Brasília, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.
128. KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. Expert Reviews in Molecular Medicine, v. 13, p. 1-12, 2011.
129. BALBINO, C. A. et al. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.