



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RAPHAEL DE OLIVEIRA RODRIGUES

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIO E
CICATRIZANTE DE *Bauhinia unguolata* L.**

FORTALEZA

2019

RAPHAEL DE OLIVEIRA RODRIGUES

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIO E
CICATRIZANTE DE *Bauhinia unguolata* L.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Aparecida Tiemi Nagao-Dias.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliana Navarro Ueda Yaochite.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R616e Rodrigues, Raphael de Oliveira.
Estudo do potencial antioxidante, anti-inflamatório e cicatrizante de *Bauhinia unguolata* L. / Raphael de Oliveira Rodrigues. – 2019.
138 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias.
Coorientação: Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite.
1. *Bauhinia unguolata* L.. 2. Células RAW 264.7. 3. Espécies reativas de oxigênio. 4. Atividade antioxidante. 5. Cicatrização. I. Título.

CDD 615

RAPHAEL DE OLIVEIRA RODRIGUES

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIO E
CICATRIZANTE DE *Bauhinia unguolata* L.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Aparecida Tiemi Nagao-Dias (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Juliana Navarro Ueda Yaochite
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Gandhi Rádis Baptista
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Roberto Nicolete
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Rogério e Laedes.

À minha esposa, Andressa.

À minha filha, Marina.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as maravilhas que tem me proporcionado, por guiar meus passos na direção correta e por colocar tantas pessoas especiais na minha vida.

Aos meus pais, Francisco Rogério Rodrigues e Laedes de Oliveira Rodrigues, por toda a dedicação. Por me apoiarem nos meus primeiros passos, pelo amor incondicional e; mesmo depois de adulto, continuarem participando das minhas decisões, compartilhando a realização dos meus sonhos. Serei eternamente grato por todos os sacrifícios que foram realizados para minha formação pessoal e profissional, mesmo diante de todas as adversidades.

Ao meu irmão, Rodrigo, pelo companheirismo e por todo apoio.

À minha esposa, Andressa, que me acompanha e me motiva todos os dias. Por todo amor e compreensão. Por ter me dado o meu maior presente: nossa amada filha Marina! Por todos os momentos de alegrias, mas também pelas angústias compartilhadas. Eu nunca teria conseguido sem você!

À minha filha, Marina, meu amor incondicional. Minha princesa, você chegou para me completar! Agradeço a Deus todos os dias pela sua vida e por ter me concedido a maior bênção que eu poderia receber. Amo muito você!

À minha orientadora, Professora Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias, pelo companheirismo, atenção e ensinamentos. Serei sempre grato por toda dedicação e confiança. Mesmo nos momentos mais difíceis é conselheira e confiante de todos os seus alunos.

À professora Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite, por toda paciência, pelos ensinamentos e pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFC, por todo aprendizado em conjunto, pelas alegrias e companheirismo.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) da UFC, pelo apoio na realização desta pesquisa.

Aos colaboradores do Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) da UNIFOR, pelo apoio para os experimentos.

Ao professor Dr. Paulo Germano de Carvalho, por todo o suporte e incentivo para a realização desta tese.

Ao professor Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca, pela paciência e por toda solicitude para a construção deste trabalho.

À professora Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo total apoio para a realização deste doutorado.

RESUMO

Bauhinia unguolata L. é uma espécie nativa do Brasil e pouco estudada com relação às suas atividades farmacológicas. Estudos realizados com a planta resultaram no isolamento e identificação de alguns compostos químicos, dentre eles, flavonoides, bibenzis, triterpenoides e derivados oxepínicos, por exemplo. O presente trabalho teve como objetivo investigar atividades antioxidante, imunomodulatória, antimicrobiana e cicatrizante de *Bauhinia unguolata* L. em modelos *in vitro* e *in vivo*. Fração acetato de etila, rica em flavonoides, denominada de FABU, foi obtida do caule de *Bauhinia unguolata*. A capacidade antioxidante total da FABU foi avaliada pelo método de redução do fosfomolibdênio. Para investigar sua atividade imunomodulatória, foi utilizado modelo *in vitro* com cultura celular de macrófagos murinos, RAW 264.7, estimulados com LPS e tratados com diferentes concentrações de FABU. Após o tratamento, foram mensurados os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), bem como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os níveis das citocinas TNF- α , TGF- β e IL-10 também foram analisados no sobrenadante da cultura. Para investigar atividade antimicrobiana da FABU, foram realizados testes de sensibilidade antifúngica contra *Candida albicans* e antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Pseudomonas aeruginosa*. Foi avaliado ainda a capacidade de FABU modular o processo de migração celular em modelo *in vitro*, utilizando células epiteliais humanas A549. Modelo de ferida cirúrgica em camundongos C57BL/6 foi utilizado para estudar o potencial cicatrizante de um gel contendo a fração de *B. unguolata*, tendo sido analisados parâmetros antioxidantes, de imunomodulação, e taxa de fechamento da ferida nas fases iniciais do processo de cicatrização. FABU não demonstrou atividades antimicrobiana ou imunomodulatória significativas no modelo de cultura de macrófagos murinos estudado, entretanto, verificou-se significativa atividade antioxidante no teste de redução de fosfomolibdênio, bem como diminuição dos níveis de EROs, NO, H₂O₂ e TBARS em células RAW 264.7 estimuladas por LPS. O efeito da fração FABU sobre o processo de migração celular demonstrou que a mesma acelerou significativamente a redução do tamanho da fenda provocada nos poços. O modelo de ferida cirúrgica em camundongos demonstrou que o tratamento tópico com o gel contendo a fração reduziu significativamente o nível de peroxidação lipídica nas lesões. Observou-se também redução significativa nos níveis da expressão gênica relativa de IL-1 β e TNF- α no tecido da lesão. Análise macroscópica revelou redução significativa do tamanho da área lesionada no grupo tratado com FABU. Entretanto, a análise histopatológica das lesões não demonstrou

diferença significativa entre os grupos. Como conclusão, o presente trabalho demonstrou que FABU apresentou significativa atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, capaz de contribuir com o processo de cicatrização das lesões cirúrgicas, prevenindo os danos celulares causados por EROs. Além disso, o tratamento com a fração demonstrou importante atividade no processo de migração celular através do modelo avaliado. Os dados sugerem que a fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* L. pode interferir na cascata de dano celular causada por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, possuindo potencial promissor em modelos de doenças crônicas que envolvam altos níveis destas moléculas.

Palavras-chave: *Bauhinia unguolata* L.; Células RAW 264.7; Células A549; Lipopolissacarídeo; Espécies reativas de oxigênio; Atividade antioxidante; Cicatrização.

ABSTRACT

Bauhinia unguolata L. is a species native to Brazil and little is known in respect to its pharmacological properties. Studies carried out with the plant resulted in the isolation and identification of some chemical compounds, among them, flavonoids, bibenzyls, triterpenoids and oxepinic derivatives, for example. The present work aimed to investigate the antioxidant, immunomodulatory, antimicrobial and wound healing activities of *Bauhinia unguolata* L. on *in vitro* and *in vivo* models. A flavonoid-rich fraction was obtained from *Bauhinia unguolata* L. stem, called ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* (FABU). Total antioxidant capacity of FABU was determined through phosphomolibdenum reduction method. Moreover, to investigate its immunomodulatory activity on cell culture model, LPS-stimulated RAW 264.7 cells were treated with different concentrations of FABU and used to measure the levels of reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), hydrogen peroxide (H₂O₂), as well as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). TNF- α , TGF- β and IL-10 cytokine levels were also measured in culture supernatant. In order to determinate the antimicrobial activity of FABU, antifungal and antibacterial susceptibility testing were performed against *Candida albicans*, methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. Wound healing assay using A549 human epithelial cells was employed to evaluate the ability of FABU to modulate the cell migration process. In addition, a surgical wound model in C57BL/6 mice was used to study the wound healing potential of FABU, through the analysis of antioxidant parameters, immunomodulators and the rate of wound closure in the early stages of the healing process. FABU did not demonstrate a significant antimicrobial or immunomodulatory activities. Nonetheless, a potential antioxidant activity was demonstrated by the phosphomolibdenum reduction assay, as well as, when measured the levels of ROS, NO, H₂O₂, and TBARS on LPS-stimulated cells. The effects of FABU on the cell migration process demonstrated that the fraction significantly accelerated the reduction of the wound area promoted in the wells containing the cells. In addition, the surgical wound model used to evaluate the beneficial effects of FABU in the initial stages of healing, it was shown that this fraction was effective in significantly reducing the level of lipid peroxidation in the lesions. It was also observed that FABU promoted a significant reduction in the relative gene expression levels of IL-1 β and TNF- α in the wound region, contributing significantly to the maintenance of a regulated inflammatory environment. Macroscopic analysis of wound closure checked by photographic follow-up showed that the group treated with the ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* presented a significant reduction in the size

of the injured area during evaluated period. The histopathological analysis of the lesions, however, showed no significant difference between the groups tested. In conclusion, the present study demonstrated that FABU presented significant antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*, capable of contributing to the wound healing process, preventing cellular damage caused by ROS. In addition, treatment with the fraction showed important activity in the cellular migration process through the evaluated model. The data suggest that the ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* L. can interfere in the cascade of cellular damage caused by reactive oxygen and nitrogen species, with promising potential in models of chronic diseases that involve high levels of these molecules.

Keywords: *Bauhinia unguolata* L.; RAW 264.7 cells; Lipopolysaccharide; Reactive oxygen species; Antioxidant activity; Wound healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Componentes de uma resposta inflamatória em um tecido.	20
Figura 2	– Camadas e anexos da pele.	23
Figura 3	– Fases da Cicatrização	26
Figura 4	– Fotografia de um espécime de <i>Bauhinia unguolata</i> L.	38
Figura 5	– Estruturas de compostos isolados da fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> L.	42
Figura 6	– Cromatograma do padrão fisetinidol, isolado da fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> , obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).	56
Figura 7	– Cromatograma da fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> , obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).	57
Figura 8	– Citotoxicidade da fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> em células RAW 264.7 através da técnica do MTT.	60
Figura 9	– Capacidade da fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> em reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio em células RAW 264.7 estimuladas por LPS	61
Figura 10	– Capacidade da fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> em reduzir os níveis de óxido nítrico em células RAW 264.7 estimuladas por LPS	62
Figura 11	– Capacidade da fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> em reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio em células RAW 264.7 estimuladas por LPS	63
Figura 12	– Capacidade da fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> em reduzir os níveis de substâncias	64
Figura 13	– Citotoxicidade de fisetinidol isolado da fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> em células RAW 264.7	65
Figura 14	– Capacidade de fisetinidol isolado da fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> em reduzir as concentrações de nitrito em células RAW 264.7 estimuladas por LPS.	66

Figura 15	– Capacidade da fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> em modular os níveis das citocinas TGF- β , IL-10 e TNF- α em macrófagos estimulados com LPS.	67
Figura 16	– Viabilidade celular de células A549 após incubação na presença de várias concentrações de FABU por 24 h.	68
Figura 17	– Ensaio de avaliação da migração celular <i>in vitro</i> promovida por FABU sobre células epiteliais A549.	69
Figura 18	– Teste de irritabilidade cutânea do gel contendo fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> a 0,5%.	71
Figura 19	– Capacidade da FABU em reduzir os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na área da lesão.	72
Figura 20	– Análise da expressão relativa de genes de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios na área da ferida cirúrgica em camundongos C57BL/6 tratados com fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> .	73
Figura 21	– Avaliação macroscópica da progressão inicial da cicatrização de feridas cirúrgicas em camundongos C57BL/6 tratados topicamente com gel contendo fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i> .	75
Figura 22	– Avaliação macroscópica e histopatológica da lesão 5 dias após a cirurgia.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Plantas medicinais com atividade cicatrizante	32
Tabela 2 – Avaliação da atividade antibacteriana de FABU contra as cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> sensível a meticilina (MSSA), <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	59
Tabela 3 – Avaliação do efeito antifúngico de FABU contra <i>Candida albicans</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHT	Hidroxitolueno Butilado
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenase-2
CXCL8	Quimiocina 8 (motivo C-X-C)
CXCL12	Quimiocina 12 (motivo C-X-C)
DAMPS	Padrões moleculares associados ao dano
DEPC	Pirocarbonato de dietila
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEBU	Extrato etanólico do caule de <i>Bauhinia unguolata</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
FABU	Fração Acetato de Etila de <i>Bauhinia unguolata</i>
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
H ₂ DCFDA	2',7' Diacetato de diclorofluoresceína
IFN- γ	Interferon gama
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
LPS	Lipopolissacarídeo
MEC	Matriz extracelular
MDA	Malondialdeído
MMP	Metaloproteinase
MPO	Mieloperoxidase
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
NF- κ B	Fator nuclear kappa B

NLRs	Receptores do tipo NOD
NO	Óxido Nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE ₂	Prostaglandina E2
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Reação de Transcriptase Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento β
VEGF-a	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular A
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TBP	<i>TATA-Box Binding Protein</i>
TLR	Receptores do tipo <i>toll</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Inflamação	20
1.2	Pele	23
1.3	Aspectos gerais da cicatrização	25
1.4	Plantas medicinais	30
1.5	Plantas medicinais e cicatrização	31
1.6	Compostos fenólicos	33
1.7	Espécies do gênero <i>Bauhinia</i>	35
1.8	<i>Bauhinia unguolata</i> L.	36
2	JUSTIFICATIVA	39
3	OBJETIVOS	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Material Vegetal	41
4.2	Fração rica em flavonoides	41
4.3	Quantificação do teor de compostos fenólicos totais e de taninos totais	42
4.4	Perfil cromatográfico de FABU e determinação do teor de fisetinidol	43
4.5	Capacidade antioxidante total	43
4.6	Teste de sensibilidade microbiológica	44
4.6.1	Avaliação da atividade antifúngica de <i>Bauhinia unguolata</i>	44
4.6.2	Avaliação da atividade antibacteriana de <i>Bauhinia unguolata</i>	44
4.7	Testes <i>in vitro</i> com macrófagos RAW 264.7	45
4.7.1	Teste de viabilidade celular	45
4.7.2	Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO)	46
4.7.3	Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio	46
4.7.4	Atividade da fração acetato de etila sobre células RAW 264.7 estimuladas com LPS	47
4.7.5	Determinação da concentração de nitrito	47
4.7.6	Níveis de citocinas TNF- α , TGF- β e IL-10	47
4.7.7	Determinação da peroxidação lipídica	48
4.8	Teste de migração de células epiteliais	48
4.8.1	Citotoxicidade da fração FABU sobre células epiteliais A549	48

4.8.2	Ensaio de migração celular <i>in vitro</i>	49
4.9	Testes <i>in vivo</i>	49
4.9.1	Preparação de gel contendo a fração acetato de etila de <i>Bauhinia unguolata</i>	49
4.9.2	Animais	50
4.9.3	Teste de irritabilidade cutânea em pele íntegra	50
4.9.4	Modelo de ferida cutânea	51
4.9.5	Estimativa da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	51
4.9.6	Extração de RNA e expressão relativa de TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-1 β , COX-2 e VEGF-a	52
4.9.7	Monitoramento da redução inicial da área da lesão	53
4.9.8	Avaliação histológica	54
4.10	Análise estatística	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Teor de compostos fenólicos totais e taninos totais	55
5.2	Determinação relativa do teor de flavonoides	55
5.3	Capacidade antioxidante total	57
5.4	Atividade antimicrobiana	58
5.5	Toxicidade celular de FABU contra macrófagos murinos RAW 264.7	60
5.6	Deteção de espécies reativas de oxigênio usando 2,7-diclorofluoresceína diacetato	60
5.7	Avaliação dos níveis de óxido nítrico em células RAW 264.7 estimuladas com LPS	61
5.8	Redução dos níveis de peróxido de hidrogênio em macrófagos estimulados com LPS	62
5.9	Efeito de FABU sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	63
5.10	Citotoxicidade e avaliação do potencial antioxidante de Fisetinidol	64
5.11	Quantificação dos níveis de citocinas após tratamento com FABU	66
5.12	Avaliação da atividade cicatrizante <i>in vitro</i>	68
5.12.1	Toxicidade Celular em células A549	68
5.12.2	Efeito cicatrizante <i>in vitro</i> de FABU contra células epiteliais A549	68
5.13	Modelo <i>in vivo</i> de ferida cirúrgica	70
5.13.1	Teste de irritabilidade cutânea	70

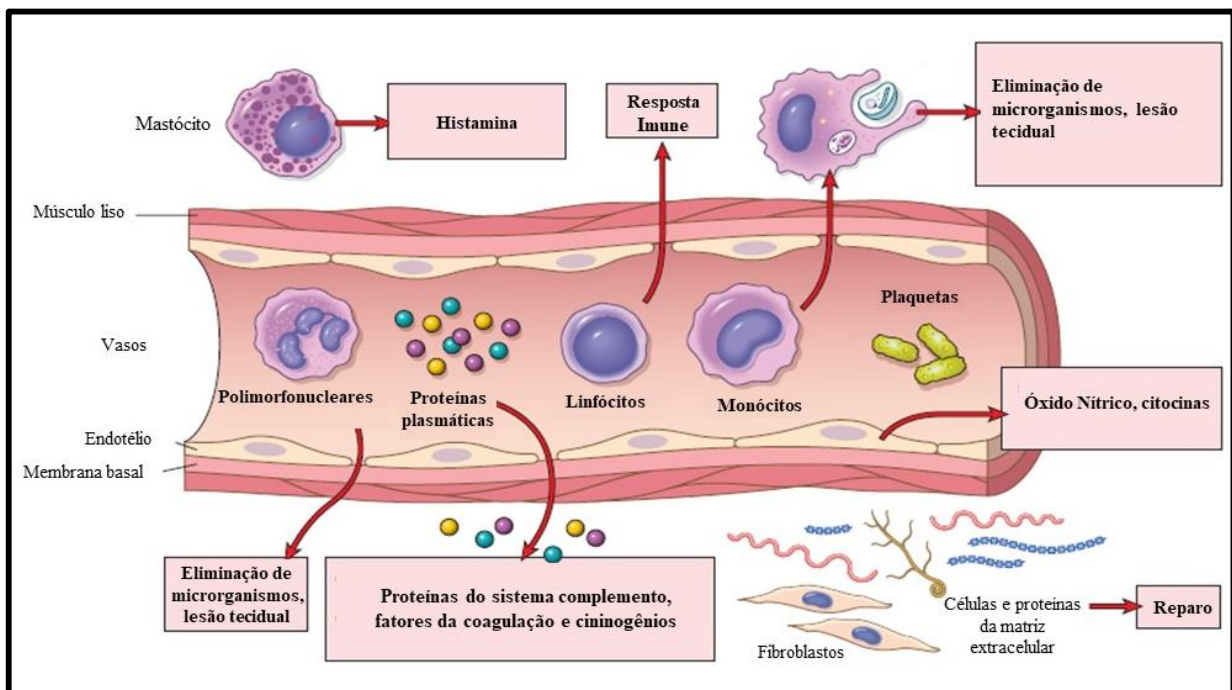
5.13.2	Estimativa da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	71
5.13.3	Avaliação dos níveis de expressão relativa de TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-1 β , COX-2 e VEGF-a nos tecidos	72
5.13.4	Monitoramento da redução inicial da área da lesão e análise histopatológica	74
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO <i>PHARMACOGNOSY JOURNAL</i>	99
	APÊNDICE B – MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO	105
	ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	137

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A inflamação pode ser definida como uma resposta imunológica desencadeada por estímulos nocivos, tais como infecções e injúria tecidual. Apresenta como objetivo principal a defesa do organismo para o restabelecimento da homeostase (MEDZHITOV, 2008). Trata-se de um mecanismo básico de reparo após uma injúria tecidual e consiste de uma cascata de eventos vasculares, celulares e moleculares com objetivo de remoção do estímulo danoso e regeneração tecidual. A cascata inflamatória inclui, dentre outros, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos e extravasamento plasmático para o tecido, liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pela imunomodulação do processo (figura 1). Entretanto, pode ocorrer lesão tecidual devido à atividade proteolítica de enzimas e pela formação de radicais livres (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

Figura 1: Componentes de uma resposta inflamatória em um tecido.



Fonte: Adaptado de KUMAR; ABBAS; ASTER (2013)

A primeira etapa da cascata inflamatória envolve o reconhecimento da infecção ou do dano tecidual. Isto é primariamente conseguido pela detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), moléculas presentes em microrganismos, mas ausentes em células hospedeiras, e por alarminas ou padrões moleculares associados a dano celular (DAMPs). Tais moléculas são reconhecidas pelo sistema imune inato, através dos receptores Toll-like (TLRs) e NOD-like (NLRs), presentes nas membranas celulares e citosol de várias células imunes, tais como como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e monócitos, as quais sinalizam uma resposta imediata contra a invasão por patógenos ou injúria tecidual (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012).

A ativação desses receptores induz uma série de cascatas de vias de sinalização intracelulares, culminando na produção e liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL-8 e IL-12 que, em conjunto com outras moléculas co-estimulatórias, facilitam o recrutamento e a ativação de mais células efetoras para o local da injúria (FUKATA; VAMADEVAN; ABREU, 2009).

Ativação dessas células leva à liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos, através de mecanismos dependentes ou independentes de oxigênio e nitrogênio, que, por sua vez, induz tanto o patógeno como as células do hospedeiro ao dano (MITTAL *et al.*, 2014).

A inflamação pode ser dividida em aguda ou crônica, conforme o tempo de curso do processo. A inflamação aguda é caracterizada como uma resposta rápida e relativamente curta a um agente nocivo, podendo durar até alguns dias. Inclui exsudação de fluidos, proteínas plasmáticas e transmigração de leucócitos, tendo como representantes principais os neutrófilos. Uma vez que o agente nocivo é eliminado, há uma tendência à resolução da resposta inflamatória, com o reparo tecidual e consequente restauração de sua funcionalidade. Caso haja falha na eliminação do agente patogênico, o processo inflamatório persiste levando à cronificação da inflamação, em geral de duração indefinida. Nestas circunstâncias, o infiltrado de neutrófilos é substituído por células mononucleares, principalmente macrófagos e linfócitos, associado à fibrose e necrose tissular (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012).

Os macrófagos possuem um importante papel no processo inflamatório, pois, a partir do reconhecimento dos PAMPs e DAMPs, através de seus receptores, tornam-se ativados e fagocitam os patógenos, além de produzir uma infinidade de mediadores inflamatórios, como por exemplo, citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos, enzimas lisossomais e radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) (SZLISZKA *et al.*, 2011; ARULSELVAN *et al.*, 2016;).

Essas células possuem uma característica de plasticidade para responder aos

estímulos no microambiente no qual estão inseridas, podendo mudar seu fenótipo de resposta e exercer diferentes funções dependendo das moléculas sinalizadoras presentes. Os macrófagos podem ainda ser subdivididos em duas categorias distintas, denominados de classicamente ativados ou M1, os quais são induzidos após uma lesão, pela presença de agentes microbianos, como por exemplo o lipopolissacarídeo, e/ou de mediadores inflamatórios como IFN- γ ; ou ainda classificados como alternativamente ativados ou M2, induzidos pela presença de IL-4, IL-13 ou IL-10 no meio, caracterizados por uma resposta anti-inflamatória e imunomodulatória (JETTEN *et al.*, 2014).

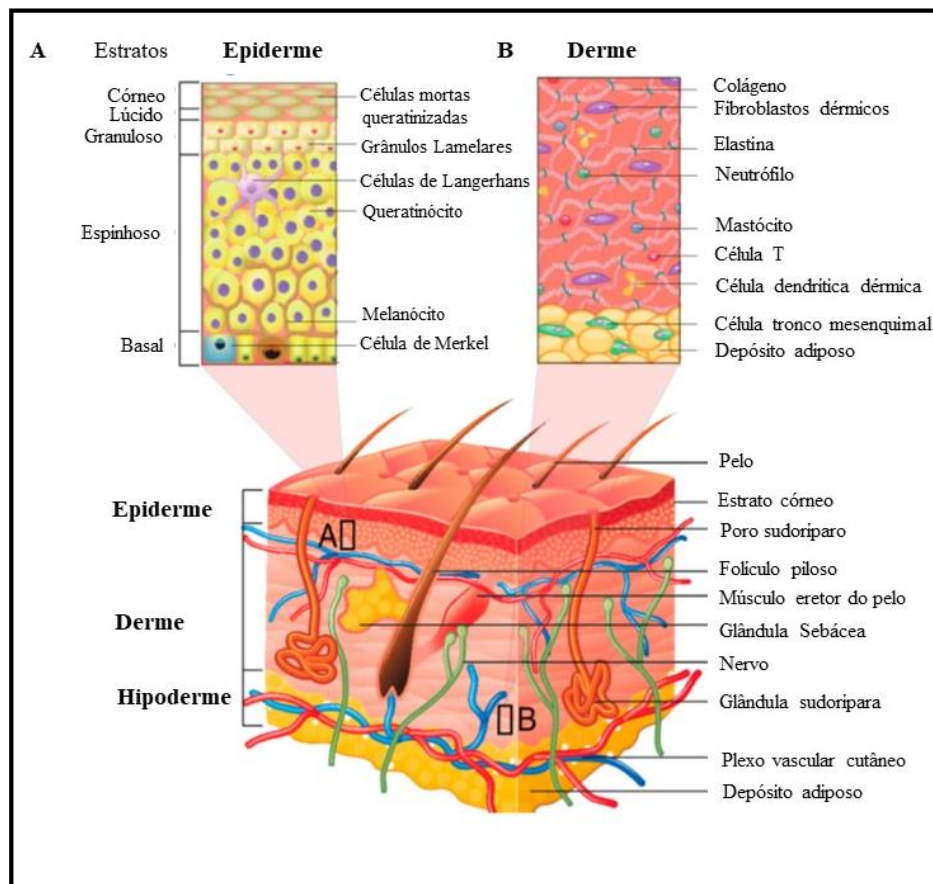
Lipopolissacarídeo (LPS), um componente presente na membrana celular de bactérias Gram negativas, é uma importante molécula ativadora de macrófagos M1 e, através da sinalização celular mediada pela ativação do receptor Toll-like 4, leva a célula a produzir diversos mediadores inflamatórios, dentre eles, por exemplo, TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE2, bem como os radicais livres óxido nítrico (NO), ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (YANG *et al.*, 2012).

É comum a utilização de LPS no estabelecimento de modelos inflamatórios em cultura de macrófagos para se avaliar, por exemplo, efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes de produtos naturais (DONG *et al.*, 2017). Nos últimos anos, tem aumentado o número de estudos que visam avaliar a relação existente entre o estresse oxidativo e a inflamação, e alguns autores evidenciaram o papel chave que esse processo pode desempenhar na imunopatogenicidade de algumas doenças inflamatórias crônicas, por exemplo (LUGRIN *et al.*, 2014). Neste sentido, vem ganhando destaque pesquisas *in vitro* e *in vivo* de substâncias derivadas de produtos naturais, com propriedades antioxidantes, tais como os compostos polifenólicos (HUSSAIN *et al.*, 2016).

1.2 Pele

A pele representa o maior órgão do corpo humano, que além de constituir a primeira barreira de defesa contra agentes químicos, físicos e biológicos é responsável também pela termorregulação e pelo equilíbrio de fluidos, desempenhando assim funções importantes para a manutenção da homeostasia (BARTHEL; ABERDAM, 2005). Esse tecido é composto por três camadas bem definidas (Figura 2) com base nas características histológicas de cada uma: a epiderme, a derme e a hipoderme (FUCHS; RAGHAVAN, 2002). A perda da integridade da pele, especialmente a perda de grandes extensões e/ou profundidade, acarreta diversas complicações para o indivíduo, estando associada à morbidade e a mortalidade devido à perda de fluidos, proteínas e eletrólitos e ao aumento da susceptibilidade às infecções (GURTNER *et al.*, 2008).

Figura 2: Camadas e anexos da pele.



Secção transversal da pele representando as três camadas: Epiderme, derme e hipoderme. Em (A) é detalhado as camadas que compõe a epiderme e em (B) a composição celular e estrutura dérmica. **Fonte:** Adaptada de GAUR *et al.* (2017).

A epiderme apresenta-se como um epitélio escamoso estratificado pavimentoso queratinizado, disposta em camadas, as quais se classificam em estratos córneo, granuloso, espinhoso e basal ou germinativo, sendo o estrato córneo a região mais externa (PÉREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2018). Visualizado somente na pele espessa, como por exemplo nas regiões palmoplantares, têm-se ainda o estrato lúcido, localizado logo abaixo da camada córnea, o qual se consiste de uma fina camada translúcida de células eosinofílicas extremamente achatadas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Composta por um tecido constantemente auto-renovável, a epiderme é dinâmica, onde a perda das células da superfície do estrato córneo (por descamação) é equilibrada pelo crescimento celular nas camadas inferiores da epiderme. Sendo originários do estrato germinativo, camada mais profunda da epiderme, os queratinócitos começam a se diferenciar e, durante a migração através das camadas superiores, passam por diversas mudanças em sua estrutura e composição, sintetizando e expressando várias proteínas estruturais e lipídios. No estrato basal ainda se encontram as células de Merkel e os melanócitos, células responsáveis pela sensibilidade tátil (mecanorreceptores) e pela produção de melanina, respectivamente (COSTIN; HEARING, 2007).

O estrato espinhoso é composto por queratinócitos com formato de poliedros, tendo núcleo central com nucléolo e citoplasma produzindo ativamente filamentos de queratina. Além disso, nesta camada são encontradas as células de Langerhans, originárias da medula óssea e que migram para o epitélio escamoso da epiderme para desempenhar importante função de reconhecimento e apresentação de antígenos (JAITLEY; SARASWATHI, 2012).

A camada granulosa é composta por 3 a 5 camadas de células achatadas, com citoplasma preenchido por grânulos intensamente basofílicos, chamados de grânulos de queratohialina. Outra característica dessas células se dá pela presença de grânulos lamelares, de estrutura ovoide, compostos por lipídios, os quais são essenciais contra a perda cutânea de água (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme, composto por células pavimentosas, queratinizadas e anucleadas, denominadas de corneócitos, com espessura aproximada de 10 a 30µm, possuindo importante função protetora contra agentes nocivos e contra a perda de líquidos (PÉREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2018).

Localizada entre a epiderme e o tecido subcutâneo, a derme é uma estrutura de tecido conjuntivo de origem mesenquimal, onde estão localizadas terminações nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos, glândulas, folículos pilosos, além de fibras colágenas e elásticas. Entre os componentes fibrosos encontra-se a substância fundamental, que contém substâncias tais

como ácido hialurônico, proteoglicanos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos e água. Os fibroblastos são as principais células da derme, sintetizando os componentes da matriz extracelular. Além dos fibroblastos, também são encontradas células do sistema imune, tais como os macrófagos e os mastócitos, os quais desempenham importante papel através da liberação de citocinas pró-inflamatórias e aminas vasoativas, participando da resposta inflamatória, remodelamento do colágeno e cicatrização de feridas (COSTIN; HEARING, 2007).

A derme divide-se em duas camadas: a) derme papilar, mais superficial, localizada logo abaixo da epiderme e possui tecido conjuntivo mais frouxo; b) derme reticular, mais profunda, representando a maior parte da derme, constituída de tecido conjuntivo de maior densidade. O colágeno representa cerca de 70% do peso seco da derme e o do tipo I é o principal encontrado nessa região. Na pele adulta normal, sem ferimentos, a proporção de colágeno tipo I para colágeno tipo III é de aproximadamente 4:1, enquanto a proporção de colágeno III é de aproximadamente 1:1 na pele neonatal. O colágeno tipo III pode ser encontrado em maior quantidade na ocorrência de lesão tecidual, quando uma neoderme é formada (WOODLEY, 2017).

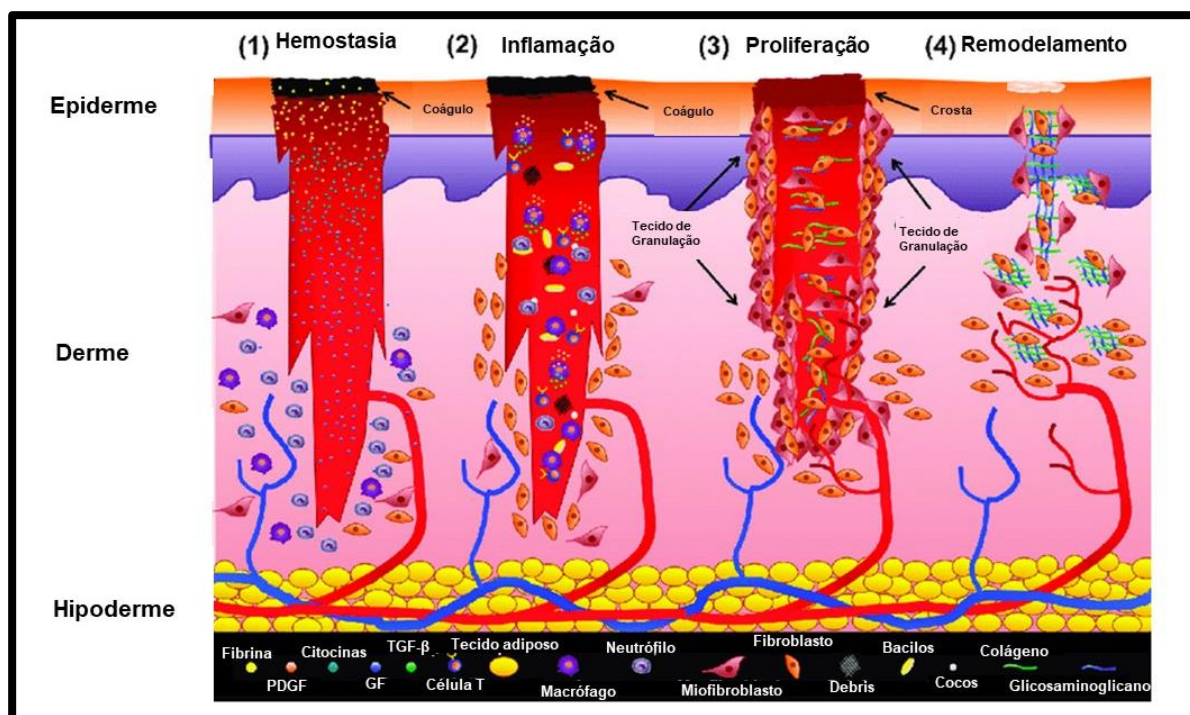
Logo abaixo da derme, encontra-se o tecido subcutâneo ou hipoderme, a última camada da pele, onde são encontradas células adiposas, células tronco mesenquimais, vasos sanguíneos e linfáticos, por exemplo. Vários estudos demonstram que o tecido adiposo da hipoderme desempenha uma importante influência no microambiente devido à sua capacidade de sintetizar e secretar vários compostos bioativos, apresentando um conjunto diversificado de funções, tais como influenciar no metabolismo lipídico, no balanço energético e na sensibilidade à insulina. Além disso, estas substâncias parecem ter relação com a regulação da angiogênese, imunomodulação e resposta inflamatória (GAUR *et al.*, 2017).

1.3 Aspectos gerais da cicatrização

Feridas cutâneas podem ser caracterizadas por uma lesão da pele em consequência de trauma, ruptura, corte ou contusão (PAZYAR *et al.*, 2014). Podem ser definidas como um rompimento da integridade anatômica do revestimento epitelial da pele ou mucosa. A lesão resultante leva à destruição do tecido, ruptura dos vasos sanguíneos e extravasamento de constituintes do sangue, além de hipóxia. A cicatrização é um processo fisiológico que visa restaurar a integridade de tecidos danificados, sendo o resultado da interação de citocinas,

fatores de crescimento, elementos e células do sangue, bem como de componentes da matriz extracelular (MEC) (DORAI, 2012).

Figura 3: Fases da Cicatrização.



Fonte: Adaptado de MELLOTT *et al.* (2016).

O processo de cicatrização de feridas cutâneas pode ser dividido em quatro etapas contínuas e sobrepostas, que incluem hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (figura 3) (MELLOTT *et al.*, 2016). A hemostasia resulta da ativação de plaquetas após lesão do endotélio, as quais iniciam a cascata de coagulação. As plaquetas também liberam substâncias que iniciam e influenciam a cicatrização, dentre elas mediadores lipídicos, quimiocinas e fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas/PDGF; fator transformador do crescimento beta/TGF-β e fator de crescimento epidérmico/EGF). Esses fatores iniciam a cascata de cicatrização atraindo fibroblastos, células endoteliais e macrófagos para o ambiente da lesão. As plaquetas também possuem corpos densos preenchidos com aminas vasoativas, tais como serotonina e histamina, que induzem aumento da permeabilidade vascular local, favorecendo a chegada de mais células inflamatórias ao local. A deposição de fibrina também é crítica para se alcançar a hemostasia, sendo o produto final das vias intrínseca e extrínseca da coagulação (BEANES *et al.*, 2003).

A inflamação inicia após a formação do coágulo de fibrina e liberação de mediadores quimiotáticos produzidos pelas plaquetas agregadas e mastócitos. As células inflamatórias secretam enzimas e vários mediadores que resultam nas características clássicas de inflamação: dor, rubor, calor e edema. Embora diversas células estejam envolvidas no processo inflamatório, os neutrófilos, macrófagos e linfócitos T são essenciais no processo de cicatrização tecidual (BAUM; ARPEY, 2005). Os neutrófilos são as primeiras células a responderem aos estímulos liberados pelas plaquetas e rapidamente alcançam a área afetada. Atuam fagocitando e eliminando os microrganismos através de enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos, bem como pela produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) e do nitrogênio (ERNs). Produz ainda algumas citocinas, tais como fator de necrose tumoral alfa/TNF- α e IL-1 β que recrutam fibroblastos e células epiteliais. Em seguida, monócitos chegam ao sítio de lesão e se diferenciam em macrófagos que irão auxiliar no processo de fagocitose, removendo os restos celulares e componentes degradados da matriz extracelular. Além disso, produzem diversas citocinas e fatores de crescimento (PDGF, TGF- β , fator de crescimento de fibroblastos/FGF, TNF- α , IL-1 β e IL-6) que auxiliarão na etapa de proliferação celular. Os linfócitos são as últimas células a alcançar o ambiente da lesão. Por meio da secreção de fatores solúveis (IL-1 β , IL-2, TNF- α , EGF e TGF- β), aumentam o recrutamento de monócitos para o leito da ferida, potencializando as funções microbicidas dos macrófagos e auxiliando no recrutamento de fibroblastos (SHAH *et al.*, 2012).

A etapa de proliferação celular compreende a fibroplasia, angiogênese e re-epitelização (SHAH *et al.*, 2012). A fibroplasia é caracterizada pela migração e proliferação de fibroblastos e síntese de novos componentes da MEC (glicosaminoglicanas e colágeno tipo III), por essas células. Os fatores FGF, fator de crescimento endotelial vascular/VEGF e TGF- β produzidos por células epidérmicas, fibroblastos, células endoteliais vasculares e macrófagos são considerados os principais agentes angiogênicos (HONRADO; MURAKAMI, 2005). Células progenitoras endoteliais são mobilizadas da medula óssea para a circulação sanguínea, sendo um processo dependente da sinalização da quimiocina CXCL12 (FENG *et al.*, 2014). Os vasos sanguíneos recém-formados são característicos do tecido de granulação, cuja finalidade é nutrir e oxigenar os tecidos em crescimento. Com o passar do tempo, uma parcela dos fibroblastos altera seu fenótipo migratório e diferenciam-se em miofibroblastos que conduzirão à contração do leito, reduzindo a área exposta da ferida (HONRADO; MURAKAMI, 2005). A re-epitelização ocorre por meio da migração (a partir da borda da ferida) e diferenciação dos queratinócitos e reestruturação da membrana basal. Células-tronco presentes nos bulbos dos

folículos pilosos e nas glândulas apócrinas começam a se diferenciar em queratinócitos, repovoando o estrato basal da epiderme (GANTWERKER; HOM, 2012).

Uma vez que houve o fechamento da ferida, inicia-se o remodelamento tecidual, com diminuição progressiva da vascularização e do conteúdo celular no tecido cicatricial, aumento da força tensora e reorientação das fibras colágenas. A matriz provisória, composta por colágeno tipo III, proteoglicanos e fibronectina, é substituída por uma matriz mais espessa, resistente e organizada, composta por colágeno tipo I. O TGF- β , integrinas e metaloproteinases (MMP) são reguladores imprescindíveis para o processo de remodelamento tecidual (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010).

As feridas são uma das principais causas de morbidade e de prejuízos na qualidade de vida, além de demandar elevados recursos de cuidados a saúde nos países desenvolvidos (CHABY *et al.*, 2007). Podem ser classificadas em feridas agudas e crônicas, dependendo da sua etiologia. Feridas agudas ocorrem mais comumente devido a acidentes, como traumas ou queimaduras, e cicatrizam em um curto período de tempo após tratamento adequado. Por outro lado, as feridas crônicas demoram mais tempo para curar e podem, muitas vezes, reaparecer devido à doença subjacente (DORAI, 2012). Dentre as causas mais comuns para desenvolvimento de cronicidade, estão: insuficiência venosa crônica dos membros inferiores, alterações vasculares e neuropáticas periféricas associadas ao diabetes mellitus, lesões relacionadas com mecanismos de pressão, deficiências nutricionais e idade avançada. Assim, o envelhecimento populacional, bem como o aumento da incidência de patologias associadas a esse processo, tem sido associado ao aumento da incidência de feridas crônicas na população (CLINTON; CARTER, 2015; FONDER *et al.*, 2008).

A fisiopatologia das feridas crônicas ainda não está totalmente esclarecida, podendo incluir vários fatores, como: diminuição do influxo de células para a lesão, envelhecimento precoce dos fibroblastos, maior atividade das metaloproteinases da matriz (MMPs) e maior degradação da matriz extracelular, mecanismos inflamatórios persistentes, presença de biofilmes abrigando vários microrganismos, falha na produção de fatores de crescimento ou neovascularização ineficiente (FALANGA, 2005; GARY; WOO, 2008; LAUREANO; RODRIGUES, 2011). De forma geral, as úlceras crônicas, independente da etiologia, são dolorosas para os pacientes, estando associadas à alta desabilidade, morbidade e mortalidade, além de demandarem altos custos (FONDER *et al.*, 2008). Dados demonstram que os custos globais dos sistemas de saúde destinados ao tratamento dessas úlceras chegam a 25 bilhões de dólares por ano, com o número de pacientes afetados crescendo anualmente, dado a elevada

prevalência de diabetes e outras doenças crônicas que podem afetar a cicatrização de feridas (HAN; CEILLEY, 2017).

Pesquisas envolvendo o tratamento de feridas vêm ganhando destaque nos últimos anos. Em virtude disso, observa-se uma ampliação no desenvolvimento de produtos e tecnologias voltadas para a promoção da cicatrização e da regeneração tecidual. Alguns desses produtos são atualizações e melhoramento de tratamentos já existentes, enquanto outros são o resultado de novos campos de estudo. Como acontece rotineiramente com qualquer novo produto, muitas vezes a corrida para introdução no uso clínico precede um adequado estudo controlado, e a eficácia é então definida por experiência clínica da utilização do produto, o que pode levar em consideração dúvidas sobre o uso apropriado e indicações específicas (MURPHY; EVANS, 2012).

Algumas opções existentes para o tratamento de feridas incluem: curativos impregnados com prata, antimicrobianos e antissépticos locais, espumas, alginatos, hidrocolóides, hidrofibras, hidrogéis e filmes transparentes. Além disso, debridamento enzimático, terapia de pressão negativa, fatores de crescimento, colágeno e antioxidantes tópicos também estão disponíveis para o tratamento de feridas. O melhor entendimento dos eventos biológicos das feridas tem levado a uma ampliação do arsenal terapêutico existente (SARABAHI, 2012).

Produtos oriundos da natureza têm sido usados há muito tempo para a promoção da regeneração tecidual, mas a investigação científica dessas terapias ainda precisa ser melhor avaliada, para uma melhor compreensão dos mecanismos farmacológicos envolvidos e indicações clínicas. Esses produtos apresentam várias vantagens, em comparação com as terapias convencionais, como por exemplo, alguns extratos de plantas possuem diversos compostos químicos que podem agir em sinergismo e atuarem como antioxidantes, antimicrobianos, adstringentes, agentes anti-inflamatórios e intensificadores para a reepitelização e para a formação de colágeno. Dessa maneira, tais características favorecem um ambiente adequado para uma eficaz e acelerada cicatrização de feridas. De qualquer modo, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas para se avaliar melhor as propriedades de tais substâncias, uma vez que não estão livres de efeitos adversos (SIVAMANI *et al.*, 2012).

1.4 Plantas Medicinais

A cultura da utilização de produtos naturais como agentes a serem utilizados para o restabelecimento da saúde é uma característica que acompanha o homem desde as primeiras civilizações (PETROVSKA, 2012). Há milhares de anos diversas populações ao redor do mundo fazem uso de produtos naturais com o intuito de curar diversas doenças. Apesar dos avanços observados na medicina moderna, as plantas medicinais ainda possuem um papel importante na saúde da população mundial, vista a sua ampla utilização. Além disso, existe uma estimativa de que cerca de 25% a 30% de todos os fármacos avaliados como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (SOUSA *et al.*, 2008).

No Brasil, a prática da utilização de plantas medicinais para o tratamento de morbidades apresenta forte influência da cultura dos povos indígena, europeu e africano. Tal miscigenação de culturas integrou diversas práticas em um conjunto de princípios que visam a cura de doenças, restituindo ao homem a vida natural. Estima-se que o território brasileiro possui aproximadamente 50 mil espécies de plantas, porém, grande parte é totalmente desconhecida e apenas uma pequena parcela tem sido analisada e explorada para verificação de seu potencial medicinal (SILVA; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2008).

A Organização Mundial da Saúde estima que as plantas medicinais são responsáveis pelo cuidado primário à saúde de aproximadamente 3,5 a 4 bilhões de pessoas, e que cerca de 85% da medicina tradicional utilize extratos derivados de plantas (PAN *et al.*, 2013). Neste sentido, vários aspectos podem ser relacionados ao aumento da utilização de fitoterápicos ao redor do mundo, os quais podem incluir a evolução de metodologias científicas para a validação das propriedades farmacológicas, bem como o desenvolvimento de métodos analíticos a serem empregados no controle de qualidade destes medicamentos, por exemplo (MELO *et al.*, 2007).

Dessa maneira, existe um crescente interesse da comunidade científica pelos estudos com plantas medicinais e pela fitoterapia, sobretudo devido a fatores como falta de acesso de parte da população aos medicamentos industrializados convencionais, necessidade de pesquisas com plantas medicinais em busca de novos medicamentos, uso alternativo à terapêutica habitual, resistência bacteriana, bem como por apresentarem potenciais terapêuticos importantes e economicamente visados, especialmente, pela indústria farmacêutica, que realiza a prospecção de novos produtos, com menos efeitos indesejáveis do que os fármacos já existentes (COSTA *et al.*, 2010).

1.5 Plantas medicinais e cicatrização

No contexto da cicatrização de feridas, o uso de plantas medicinais tem sido amplamente reconhecido como prática alternativa na medicina desde os tempos antigos. Muitas civilizações antigas utilizavam plantas para estimular a cicatrização tecidual. Por exemplo, os antigos egípcios usavam *Aloe barbadensis* Mill para tratar feridas já no ano de 1500 a.C. Desde então, diversas espécies de plantas e diferentes partes delas (caule, casca, folhas, raiz) têm sido empregadas para promover/acelerar a cicatrização em vários tipos de úlceras e muitos estudos científicos têm sido realizados na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos nesse tipo de terapia (BUDOVSKY; YARMOLINSKY; BEN-SHABAT, 2015). Vários compostos oriundos de plantas, incluindo flavonoides, quinonas, fenilpropanoides, terpenos e taninos, apresentam propriedades cicatrizantes uma vez que podem exibir atividade antimicrobiana, propriedades antioxidantes, induzem proliferação celular, estimulam a produção de colágeno e a síntese do DNA (GHOSH; GABA, 2013).

Neste sentido, diversos extratos e frações, além de substâncias de origem natural isoladas, já foram testadas no tratamento de feridas cutâneas (tabela 1), tais como: extratos de *Strychnos pseudoquina* (quina) (SARANDY *et al.*, 2017), *Calendula officinalis* (calêndula), *Symphytum officinale* (confrei) e *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) (BALLABEN; CRISCI; JORGE, 2013).

Tabela 1: Exemplos de plantas medicinais com atividade cicatrizante

Espécie	Nome comum	Família	Componentes	Mecanismo de ação	Referências
<i>Aloe barbadensis</i> Mill	Babosa	Xanthorrhoeaceae	Polissacarídeos extraídos das folhas	Promovem a proliferação de fibroblastos, estímulo à produção de ácido hialurônico e de hidroxiprolina.	RADHA; LAXMIPRIYA, 2014
<i>Strychnos pseudoquina</i>	Quina do cerrado	Loganiaceae	Extrato hidroetanólico da entrecasca, rico em compostos fenólicos	Estímulo da celularidade, elevação dos níveis de TGF- β e redução do estresse oxidativo	SARANDY, 2017
<i>Calendula officinalis</i>	Calêndula	Asteraceae	Extrato etanólico das flores	Atividade anti-inflamatória e antibacteriana, bem como aumento da atividade angiogênica e fibroblástica.	PARENTE, 2012
<i>Symphytum officinale</i>	Confrei	Boraginaceae	Extrato glicólico das folhas	Modulação do processo inflamatório e estimulação da produção de colágeno	ARAÚJO, 2012
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Barbatimão	Fabaceae	Extrato da casca rico em compostos fenólicos	Ação antimicrobiana, antioxidante e adstringente	RODRIGUES, 2017
<i>Cynodon dactylon</i>	Gramma bermuda	Poaceae	Fração rica em flavonoides oriundas das folhas frescas	Redução da peroxidação lipídica e aumento da deposição de colágeno no tecido de granulação	SAROJA; SANTHI; ANNAPOORAN I, 2012
<i>Ipomoea carnea</i>	Algodão-bravo	Convolvulaceae	Taninos, polifenóis e alcaloides oriundos das folhas	Eliminação de radicais livres, proliferação de fibroblastos e de queratinócitos.	AMBIKA; NAIR, 2019

Com relação a *Stryphnodendron adstringens*, diversos estudos apontam seus efeitos benéficos na regeneração tecidual de feridas cutâneas. Pinto *et al.* (2015) avaliaram os efeitos do extrato bruto de barbatimão em um modelo de úlcera diabética em ratos. Os pesquisadores encontraram que a planta foi eficaz na reparação tecidual das feridas, estimulando a produção de fibras de colágeno e favorecendo a formação de uma matriz extracelular mais organizada,

além de regular a produção de ciclooxigenase-2 (COX-2) e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), essenciais para esse processo.

Em virtude dos resultados obtidos com os estudos sobre o potencial cicatrizante de *Stryphnodendron adstringens*, um produto (pomada) contendo extrato seco desta planta encontra-se atualmente no comércio, sob o nome de FITOSCAR[®] (Apsen Farmacêutica, Brasil). Suas propriedades farmacológicas são atribuídas à elevada concentração de polifenóis presentes, especificamente taninos, devido, por exemplo, à sua capacidade de precipitação de proteínas, efeitos anti-inflamatório, antimicrobiano e antioxidante (HERNANDES *et al.*, 2010).

1.6 Compostos fenólicos

O estresse oxidativo pode ser evidenciado pelo desequilíbrio entre os agentes oxidantes e reservas antioxidantes presentes no organismo, levando a efeitos deletérios sobre tecidos e células. Vários estudos já evidenciaram associação direta entre níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com doenças crônicas, tais como câncer, diabetes, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e outros processos inflamatórios exacerbados, como observados em feridas crônicas, por exemplo (ALFADDA; SALLAM, 2012). Em condições normais, os agentes oxidantes são eliminados através de mecanismos de proteção endógenos, tais como glutathione reduzida e catalase, por exemplo. Porém, sob condições patológicas, a superprodução de radicais livres sobrecarrega os sistemas de proteção do organismo. Neste sentido, é fundamental a necessidade de pesquisa sobre novos agentes capazes de ajudar a contrabalancear a produção aumentada destes compostos, prevenindo e tratando o status inflamatório antes que se torne crônico (AMBRIZ-PÉREZ *et al.*, 2016).

Compostos polifenólicos são oriundos do metabolismo secundário das plantas, envolvidos no sistema defensivo destas, incluindo proteção contra radiação ultravioleta, patógenos e processos oxidativos. Exemplos deste grupo de substâncias incluem os flavonoides, taninos, lignanas e ácidos fenólicos. A atividade antioxidante desempenhada pelos polifenóis depende diretamente da estrutura de seus grupos funcionais. O número de grupos hidroxila possui importante influência neste aspecto, como a eliminação de radicais e capacidade de quelatação de íons metálicos, por exemplo. Os mecanismos envolvidos na capacidade antioxidante destas moléculas incluem a supressão de formação de EROs por inibição de enzimas envolvidas na sua produção, eliminação de EROs, ou aumento da produção das defesas antioxidantes do organismo (HUSSAIN *et al.*, 2016).

Diversos estudos têm encontrado uma correlação inversa entre o consumo de dietas ricas em polifenóis e o risco de doenças relacionadas com a idade. Tal associação é frequentemente atribuída à importante atividade antioxidante apresentada por flavonoides e outros compostos polifenólicos, tais como os taninos, fato demonstrado através de modelos *in vitro* e *in vivo*, onde estas substâncias são capazes de eliminar uma ampla variedade de radicais livres. Assim sendo, os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que retardam, previnem ou removem o dano oxidativo a uma molécula alvo e, dessa maneira, estes compostos podem servir para o controle dos níveis de radicais livres, e conseqüente redução do dano oxidativo em vários tecidos. Os efeitos protetores muitas vezes evidenciados pelas plantas medicinais podem estar relacionados diretamente com concentrações elevadas de polifenóis que, além de sua ação antioxidante, podem exercer atividades anti-inflamatória e imunossupressora, por exemplo (TANG; HALLIWELL, 2010).

Alguns estudos têm evidenciado que compostos fenólicos antioxidantes presentes em diversas plantas podem promover um melhor processo de regeneração tecidual e, ao mesmo tempo, prevenir o dano tecidual oxidativo (DZIAŁO *et al.*, 2016; GEETHALAKSHMI *et al.*, 2013). Dentre os polifenóis estudados, os flavonoides e os taninos merecem destaque (KUMAR; PANDEY, 2013). Estas substâncias podem proporcionar efeito cicatrizante pela inibição da peroxidação lipídica e dessa forma, prevenir a lesão tecidual exacerbada (RENDA *et al.*, 2013). Özay *et al.* (2019) demonstraram atividade cicatrizante da aplicação tópica do kaempferol, flavonoide com comprovada ação antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana, em modelos de feridas cutâneas em ratos diabéticos e não diabéticos. Os autores observaram efeitos significativos sobre o aumento da quantidade depositada de colágeno e da aceleração da re-epitelização das lesões, por exemplo.

Fração rica em flavonoides e luteolina, obtida de *Martynia annua* Linn, também demonstraram importante atividade no processo de cicatrização em modelo de ferida cutânea em ratos. Os pesquisadores atribuíram aos flavonoides presentes na planta o potencial de regeneração tecidual, por promover aumentos significativos nos índices de contração das lesões e de re-epitelização. Além disso, os efeitos farmacológicos exercidos pelos flavonoides foram correlacionados ao controle dos níveis de radicais livres presentes na lesão (LODHI; SINGHAI, 2013).

1.7 Espécies do gênero *Bauhinia*

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencente à família Fabaceae, que compreende aproximadamente 300 espécies. Elas são popularmente conhecidas como “pata-de-vaca”, devido à forma de suas folhas. Sua distribuição é ampla na maioria dos países tropicais, incluindo África, Ásia e América do Sul. A utilização das folhas e caule (casca) é bastante difundida pela medicina popular e são empregadas no tratamento de diversas enfermidades, particularmente diabetes, infecções, dor e processos inflamatórios (SILVA; FILHO, 2002).

Nos últimos anos, o interesse nas plantas do gênero *Bauhinia* aumentou consideravelmente em todo o mundo, especialmente no Brasil, uma vez que alguns estudos em modelos *in vitro* e *in vivo* têm confirmado muitas de suas propriedades terapêuticas relatadas (CAMPOS *et al.*, 2016; JIAN *et al.*, 2016).

Carvalho *et al.* (1999) avaliaram a atividade anti-inflamatória de extratos obtidos da casca do caule de *Bauhinia guianensis* e observaram que estes exerceram importante atividade em modelos de edema na pata de ratos induzido pela carragenina, dextrana e histamina, bem como atividade analgésica no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Em outro trabalho, realizado na Índia, extratos metanólicos obtidos da casca de *Bauhinia racemosa* exerceram importante atividade anti-inflamatória contra as fases agudas e crônicas da inflamação, além de produzir ação analgésica, tanto central como periférica, e propriedades antipiréticas em camundongos e ratos (GUPTA *et al.*, 2005).

Outros estudos avaliaram também os constituintes de extratos de algumas espécies de *Bauhinia*, com ênfase no possível mecanismo de ação exercido por eles que explicassem seus efeitos biológicos. Avanços nesse sentido foram encontrados para *Bauhinia malabarica*, onde os polifenóis racemosol e 10-O-dimetilracemosol apresentaram potente atividade anti-inflamatória *in vitro* contra as enzimas COX-1 e COX-2 (SONGARSA *et al.*, 2005). Além disso, estes metabólitos foram utilizados como modelos para a síntese de vários derivados moleculares, onde se realizaram estudos para avaliar a relação estrutura-atividade (CECHINEL FILHO, 2009).

O potencial antimicrobiano de diferentes espécies de plantas do gênero *Bauhinia* foi avaliado por diversos estudos que acabaram confirmando a capacidade de algumas espécies em inibirem o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (AHMED *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2014).

Em modelos experimentais de úlceras, a administração de *B. variegata* ou *B. purpurea*

promoveu melhora na cicatrização por meio da modulação da resposta inflamatória, da síntese de colágeno e da produção de citocinas e fatores de crescimento (ANANTH *et al.*, 2010; NETO *et al.*, 2011). No contexto do diabetes, a administração de *Bauhinia forficata* em modelos de animais hiperglicêmicos promoveu a diminuição da glicemia e de outros parâmetros metabólicos, caracterizando um potencial antidiabético dessa espécie (LINO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2002).

Em geral, muitas das propriedades terapêuticas das plantas do gênero *Bauhinia* tem-se atribuído à presença de flavonoides. Outros componentes com potenciais efeitos biológicos encontrados nestas plantas incluem terpenos, esteroides, ácidos aromáticos, quinonas, lactonas, alcaloides, entre outros (CECHINEL FILHO, 2009).

1.8 *Bauhinia unguolata* L.

Bauhinia unguolata L., conhecida popularmente como “mororó vermelho” e “pata de vaca”, é uma espécie nativa do Brasil, apresentando-se como arbusto, subarbusto ou arvoreta com tamanho que pode variar em média entre 2 a 4 metros de altura, alcançando até aproximadamente 10 metros (PAULA *et al.*, 2015).

Apresenta-se distribuída pelas regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste do país, onde a sua principal utilização pela medicina popular é atribuída a sua propriedade hipoglicemiante para o tratamento do diabetes por índios Tapebas e por parte da população do Ceará (PAULA *et al.*, 2014).

A espécie *Bauhinia unguolata* Linnaeus, segundo Vaz e Tozzi (2003), apresenta-se como:

Arbusto ou arvoreta ou subarbusto. Entenó distal 0,5-3 cm de comprimento. Folhas bilobadas, lâmina (1,1-)2,6-13(-18)x(1,2-)3-8(- 9,5-12,5) cm, tênue cartácea a subcoriácea, base subtruncada a cordada, 7-9-sub 11-nérvea, nervura marginal inconspícua, lobos concrescidos em 1/2 a 2/3, raramente menos de 1/3 ou mais de 2/3 do comprimento total, ovado-oblongos a oblongo-triangulares, retos e no ápice paralelos ou um pouco convergentes ou ainda um pouco divergentes, até elípticos ou suborbiculados, ápice longamente acuminado ou agudo a obtuso ou arredondado; face superior glabra, não impressas, face inferior cano- ou ferrugíneo- ou fusco-pubescente a tomentela em toda a superfície, em maior ou menor grau a ferrugíneo-pubescente, especialmente nas nervuras, tricomas glandulares presentes, abundantes ou não, nervuras primárias mais ou menos proeminentes, secundárias pouco proeminentes a imersas e terciárias imersas; pecíolo 0,9-3 cm compr., delgado, cano- ou ferrugíneo ou fuscotomentelo. Estípulas ovado-lanceoladas a oblanceoladas ou falcado-oblongas, 3-25x2-8 mm, quebradiças até rudimentares, sub-milimétricas; nectários extraflorais rudimentares, raramente ovóides (Rio Aripuanã), 1 mm comprimento, em geral totalmente encobertos pelas estípulas até rudimentares, submilimétricos. Inflorescência até 37 cm compr., curto-pedunculada; pedúnculo 0,2-3 cm compr.; eixo racemiforme, delgado, cano- ou ferrugíneo- ou fusco-tomentela, às vezes 1-2 ou mais eixos simultâneos; inflorescências parciais 2-floras; folhas opositifloras/ alternifloras ausentes, brácteas foliáceas falcado-oblongas a rudimentares, submilimétricas,

mucron às vezes presentes. Botões 4,5-5x0,4 cm na antese, subclavados, ápice obtuso a reentrante-espessado, fusco- ou ferrugíneo- ou fulvo-tomentelos e lisos ou canoestriados e, então, desde obscuramente 5- estriado até multiestriados, com tricomas glandulares. Flores, pedicelo (0,3-0,4-)0,5-1,1 cm compr., bractéolas oblongo-lanceoladas a ovadas, hipanto cilíndrico a suburceolado, 0,5- 1,5x(0,3-)0,4-0,7 cm, internamente glabro; cálice fendido na antese em 3-5 lobos reflexos, ondulados a retorcidos, 1,7-3,5 cm compr.; pétalas linear-lanceolada, caudada, ca. 1,6-3x0,1-0,2 cm, externamente glabras; estaminódios 0, estames 10, anteras iguais, lineares, não loceladas, filetes (1,3-1,7-) 2,5-3 cm compr., filetes alternipétalos pilosos externamente; coluna estaminal rudimentar, até ca. 1 mm altura máxima, apêndices rudimentares, internamente com tufo de tricomas, externamente pilosa; gineceu (2-4,2-)4,5 cm compr., estigma oblíquo-clavado, ovário tomentoso, estipe 1,5-2 cm compr., tomentoso a quase glabro. Legume deiscente, valvas 11,5- 20x0,9-1,2 cm, tomentelas a glabrescentes, estipe 2-3 cm compr.; lobos funiculares uncinado-lobados. Sementes 5-7x5-6 mm.

A planta foi pouco estudada com relação a sua constituição química e propriedades biológicas (PAULA *et al.*, 2015). Um estudo realizado por Neto *et al.* (2008), utilizando as folhas de *Bauhinia unguolata* L., resultou no isolamento e identificação de alguns compostos químicos, dentre eles os flavonoides quercetina, quercetina arabinofuranosídeo e quercitrina; além dos alcaloides harmano e eleagnina. Recentemente, De Sousa *et al* (2016) realizaram investigação química dos constituintes químicos presentes no caule, casca e raiz de *Bauhinia unguolata* L., onde isolaram e identificaram diversos compostos, dentre eles, bibenzis, flavonoides, triterpenoides e derivados oxepínicos. Além disso, os autores demonstraram que um bibenzil extraído desta planta apresentou atividade citotóxica contra as células cancerígenas HEP-2 (carcinoma de laringe) e HL-60 (leucemia promielocítica).

A Figura 4 representa a parte aérea de um espécime de *Bauhinia unguolata* repleta de folhas e caules.

Figura 4: Fotografia de um espécime de *Bauhinia unguolata* L.



Fonte: SOUSA, L. M (2016)

2 JUSTIFICATIVA

A perda da integridade da pele, especialmente a perda de grandes extensões e/ou profundidade, acarreta diversas complicações para o indivíduo, estando associada com morbidade e mortalidade devido à perda de fluidos, proteínas e eletrólitos e ao aumento da susceptibilidade às infecções (GURTNER *et al.*, 2008). Embora o processo de cicatrização seja iniciado logo após o dano tecidual e objetivo restaurar a integridade de tecidos danificados, falhas nos mecanismos reparadores podem ocorrer, tais como os decorrentes de processos inflamatórios exacerbados, o que poderia acarretar na cronicidade das lesões. Tal fato constitui um importante problema de saúde pública que afeta milhões de pacientes em todo o mundo.

Apesar dos avanços observados quanto ao desenvolvimento de fármacos sintéticos e terapias cicatrizantes adjuvantes, tais como as terapias por pressão negativa em feridas complexas, há necessidade de pesquisas por novas terapias, que levem a uma rápida resolução das lesões com mínimos efeitos adversos. Neste sentido, os produtos derivados de plantas medicinais vêm ganhando destaque.

Diversos estudos apontam que vários constituintes de plantas, incluindo os compostos fenólicos, possuem potencial cicatrizante em virtude de suas capacidades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, associadas a um efeito benéfico sobre o processo de cicatrização (EZZAT; CHOUCRY; KANDIL, 2016). Um exemplo disso pode ser representado pelo barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), onde vários estudos apontam seus efeitos positivos no processo de regeneração tecidual, atribuído principalmente à elevada concentração de polifenóis (PINTO *et al.*, 2015).

Em um estudo da caracterização química da *Bauhinia unguolata*, realizado por De Sousa *et al.* (2016), foram isolados e identificados alguns constituintes químicos da fração acetato de etila do caule de *Bauhinia unguolata*. Dentre os vários constituintes, flavonoides foram majoritariamente identificados nesta fração. Dessa maneira, em virtude da elevada concentração de compostos fenólicos encontrados, decidimos avaliar o potencial biológico desta fração através da análise de parâmetros antioxidantes, anti-inflamatórios e antimicrobianos *in vitro*, bem como estudar a sua capacidade em poder modular o processo de cicatrização em feridas cirúrgicas em camundongos.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório e cicatrizante da fração acetato de etila do caule de *Bauhinia unguolata*.

Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade antioxidante total da fração acetato de etila do caule de *Bauhinia unguolata*;
- Estudar os efeitos antioxidantes e imunomodulatórios da fração sobre macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados com LPS;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da fração acetato de etila do caule de *Bauhinia unguolata* contra as cepas de *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina ATCC® 6538P, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina® ATCC 65398, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027 e *Candida albicans* ATCC® 10231;
- Estudar a atividade da fração sobre o processo de migração celular em modelo de ferida *in vitro* utilizando células epiteliais A549;
- Estabelecer um modelo de ferida cirúrgica em camundongos C57BL/6;
- Verificar o efeito de uma formulação contendo a fração de *Bauhinia unguolata* na irritabilidade dérmica em pele íntegra;
- Observar o efeito antioxidante da formulação contendo a fração de *Bauhinia unguolata* através da inibição da peroxidação lipídica no local das lesões;
- Avaliar o papel imunomodulatório da formulação sobre as feridas através da análise da expressão gênica dos mediadores inflamatórios IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, TGF- β e VEGF-a;
- Analisar macroscopicamente o efeito da formulação contendo a fração de *Bauhinia unguolata* nas etapas iniciais do processo de cicatrização tecidual, por meio da redução da área inicial da lesão;
- Investigar a atividade da formulação por meio das alterações histológicas das lesões.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

O material vegetal utilizado no estudo foi o caule de *Bauhinia unguolata* L. A planta foi coletada no município de Caucaia, Ceará, Brasil, sendo suas identificações botânicas realizadas pelo professor Edson P. Nunes e exsicata depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o número 54609. O caule da planta foi submetido a secagem e trituração, para posteriormente ser obtida uma fração rica em flavonoides, cedida pela professora Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago, Laboratório de Síntese Orgânica, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

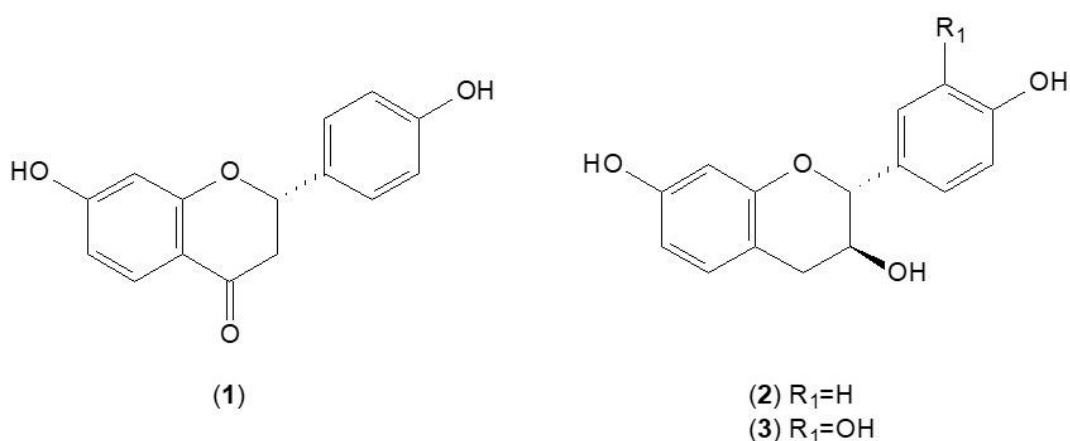
4.2 Fração rica em flavonoides

Uma fração rica em flavonoides foi obtida como descrito no trabalho publicado por De Sousa *et al* (2016). Resumidamente, 3,4 kg do caule de *Bauhinia unguolata*, após submetido a secagem e trituração, foi extraído sucessivamente com hexano (4 x 10 L) e etanol (4 x 10 L) em temperatura ambiente por 48 h. Em seguida, a solução etanólica foi concentrada sob pressão reduzida para obtenção do extrato etanólico de *Bauhinia unguolata* (EEBU, 51,7 g), com rendimento aproximado de 1,52%. Uma porção de EEBU (20,0 g) foi suspensa em água destilada e extraída com acetato de etila (4 x 200 mL) para obtenção da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* (FABU, 16 g), com rendimento de 80%.

Para a investigação fitoquímica de FABU, uma massa de aproximadamente 4,78g deste produto foi submetida a uma coluna cromatográfica contendo sílica gel (79,9 g) e a amostra foi separada por eluição com uma mistura de CH₂Cl₂/MeOH (95/5, 9/1) e metanol para produzir 75 frações (30 mL cada). Estas foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada (CCD) e depois reunidas em 8 frações (F1-F8). Das frações F3 [0,1404 g, CH₂Cl₂/MeOH (95/5)] e F4 (0,2677 g, CH₂Cl₂), foram isoladas liquiritigenina [**1**; 6,6 mg (0,14%)] e guibourtinidol [**2**; 24,5 mg (0,51%)], respectivamente, através de cromatografia em gel de sílica utilizando uma mistura de CH₂Cl₂/MeOH (95/5) como eluente. Além disso, a fração F6 [2,0880 g, CH₂Cl₂/MeOH (9/1)] foi submetida a uma coluna cromatográfica utilizando-se uma mistura de CH₂Cl₂/MeOH (9/1) para se obter fisetinidol [**3**; 1,62 g (33,89%)]. As estruturas dos compostos isolados estão representadas na Figura 5 e a elucidação estrutural

destes compostos foi realizada por análise espectroscópica, utilizando-se principalmente espectros uni (-1D) e bi (-2D) dimensionais de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , além de comparações com dados da literatura (DE SOUSA, 2016).

Figura 5: Estruturas de compostos isolados da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* L.



(1) liquiritigenina, (2) guibourtinidol e (3) fisetinidol.

Fonte: Própria

4.3 Quantificação do teor de compostos fenólicos totais e de taninos totais

Para a determinação dos níveis de fenóis totais e taninos totais presentes em FABU, utilizou-se o método de Folin-Denis, conforme Galvão *et al.* (2018) e Sartori, Castro e Mori (2014), com modificações. Uma curva de calibração foi preparada através de uma solução alcoólica de ácido gálico, nas concentrações de 1,69 a 13,56 $\mu\text{g/mL}$. Para a quantificação de fenóis totais na amostra, FABU foi inicialmente dissolvida em etanol e, em seguida, foram pipetados 120 μL desta solução acrescidos de 60 μL do reagente de Folin-Denis, 600 μL de água e 720 μL de carbonato de sódio a 29% (p/v). Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro a 760 nm para a determinação das absorbâncias. O resultado foi expresso como porcentagem equivalente de ácido gálico por amostra.

A determinação do teor de taninos presente na fração foi realizada de maneira indireta, conforme o doseamento de polifenóis não adsorvidos na amostra de FABU. A uma alíquota da fração dissolvida em etanol foi adicionado o agente complexante crospovidona e

então a mistura foi submetida a agitação por 5 min e, em seguida centrifugada a 7000 rpm (UniSpin, Uniscience, Brasil) por 5 min. Logo após, uma alíquota de 120 μ L do sobrenadante foi removida e submetida a reação de Folin-Denis, conforme anteriormente descrito. O resultado foi expresso como porcentagem equivalente de ácido gálico por amostra. Dessa forma, a concentração de taninos na amostra foi estimada pela diferença entre os teores de fenóis totais e fenóis não adsorvidos com crospovidona, também expressos como ácido gálico.

4.4 Perfil cromatográfico de FABU e determinação do teor de fisetinidol

O perfil cromatográfico de FABU e a determinação do teor de fisetinidol na fração foi estimada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), realizada em sistema Varian ProStar HPLC System UV-VIS, equipado com bombas Rainin Dynamax, modelo SD-200. Amostras de FABU e do padrão fisetinidol (isolado de FABU) foram injetados em uma coluna de fase reversa Phenomenex C18 (4,6 mm x 150 mm) com partículas de diâmetro de 5 μ m. A fase móvel A e B foram constituídas de solução de ácido acético a 0,1% e 5% de metanol e solução hidrometanólica a 95% com ácido acético a 0,1%, respectivamente. O gradiente de solvente usado foi: 0 min, 100% de A; 0-30 min, mudança em gradiente de 100% de A para 100% de B ao longo do intervalo; 30-40 min, 100% de B. A taxa de fluxo foi de 1,0 mL/min e o volume das amostras injetadas foi de 20 μ L. FABU e a solução padrão de fisetinidol foram preparadas na concentração de 500 μ g/mL, utilizando etanol como solvente. A quantificação de fisetinidol presente em FABU foi expressa como % de fisetinidol por amostra, realizada de acordo com os respectivos tempos de retenção (tR) e da área total do pico obtido nos cromatogramas. As amostras foram analisadas no comprimento de onda de 281nm.

4.5 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total foi analisada, conforme método descrito por Prieto *et al.* (1999), com modificações. A reação baseia-se na redução do Mo (VI) para Mo (V) por substâncias antioxidantes, e resulta na formação de um composto colorido verde em pH ácido, com leitura em espectrofotômetro no comprimento de 700nm. Uma alíquota de 100 μ L da solução da amostra teste solubilizada em etanol foi adicionada a um tubo de polipropileno contendo 1 mL da solução reagente, que continha ácido sulfúrico a 0,6 M, fosfato de sódio a 28 mM e molibdato de amônio a 4mM. Em seguida, a mistura foi incubada em banho seco por 90 min a 95°C. Após o resfriamento da mesma até temperatura ambiente, as densidades ópticas

foram mensuradas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 700nm. Uma curva de calibração foi obtida com uma solução etanólica de hidroxitolueno butilado (BHT) (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol), nas concentrações de 12,5µg/mL a 50 µg/mL. A capacidade antioxidante total da fração foi expressa como equivalentes de BHT (mg de equivalente de BHT por mg da fração).

4.6 Teste de sensibilidade microbiológica

4.6.1 Avaliação da atividade antifúngica de *Bauhinia unguolata*

Utilizou-se cepa de *Candida albicans* ATCC® 10231, proveniente da micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas da Universidade Federal do Ceará (LABIMAN), sob coordenação do Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior. Esta cepa foi semeada em ágar Sabouraud dextrose e incubada a 37°C por 24h.

Realizou-se a técnica de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,0 ± 0,1), tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) 0,165M (Sigma, EUA). A fração FABU foi testada no intervalo de concentração de 0,9765 a 500 µg/mL e o diluente da fração, Tween 80 a 1,5% (v/v), também foi testado no experimento. Após cultivo de 24h da levedura em ágar Sabouraud dextrose, foi preparada uma suspensão de inóculo inicial ajustada de acordo com a escala 0,5 McFarland (aproximadamente 1×10^6 células/mL). Em seguida, a suspensão foi diluída em meio RPMI 1640 para se obter uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. As microplacas foram incubadas por um período de 24 h a uma temperatura de 35°C (± 2°C). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento do microrganismo, em comparação ao poço controle (CLSI, 2008).

4.6.2 Avaliação da atividade antibacteriana de *Bauhinia unguolata*

Cepas de *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA) ATCC® 6538P, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) ATCC® 65398 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027, provenientes da bacterioteca do LABIMAN-UFC foram semeadas

em ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37°C por 24h.

As CIMs da FABU contra estas cepas foram determinadas através do método de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M07 - A10 (CLSI, 2015), utilizando o caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (CAMHB) (pH 7,2 – 7,4). Várias concentrações da fração foram testadas, no intervalo de concentração correspondente a 0,9765 a 500 µg/mL. O diluente da fração, Tween 80 a 1,5%, também foi testado no experimento.

A partir de um cultivo de 24h das bactérias em ágar Mueller – Hinton, foi preparada uma suspensão de inóculo inicial ajustado de acordo com a escala 0,5 McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL) e realizadas diluições em CAMHB para obtenção de inóculo final contendo aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. As microplacas foram incubadas por um período de 20 h para *P. aeruginosa* e 24 h para MSSA e MRSA a uma temperatura de 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

A CIM foi determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo, em comparação com ao poço controle, por leitura visual (CLSI, 2015).

4.7 Testes *in vitro* com macrófagos RAW 264.7

Células RAW 264.7, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brazil), foram utilizadas para se avaliar os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios *in vitro* da fração FABU do caule de *B. unguolata*. As células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular contendo meio Eagle modificado por Dubecco, com glicose, (DMEM) (Gibco®, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (previamente inativado por aquecimento), e gentamicina a 5 µg/mL; e mantidas em atmosfera úmida em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

4.7.1 Teste de viabilidade celular

Células RAW 264.7, semeadas em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^5 células/poço, foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 16h. Em seguida, elas foram tratadas com diferentes concentrações da fração FABU (7,82 a 500 µg/mL) e incubadas por 24 h. Após esse período, os sobrenadantes contendo os tratamentos foram removidos e as células aderidas foram lavadas duas vezes com PBS. Logo em seguida, novo meio DMEM suplementado com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT,

Sigma, EUA) na concentração de 500 µg/mL foi adicionado aos poços. Após incubação por 4 h em 37°C e CO₂ a 5%, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, USA) foram adicionados aos poços. As placas foram agitadas vigorosamente por 15 min e a viabilidade celular, indicada pela produção do sal de formazan, foi mensurada pela leitura da suspensão final em leitora de placas no comprimento de onda de 570 nm. Também foi avaliada a viabilidade celular destes macrófagos quando tratados com diferentes concentrações (0,78 a 100 µg/mL) de fisetinidol isolado de FABU, constituinte majoritário da fração estudada.

4.7.2 Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Células RAW 264.7 foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 células/mL (200µL/poço) em placas de 96 poços e incubadas em atmosfera úmida em 37°C e 5% de CO₂ durante 16h. Em seguida, as células foram pré-tratadas com várias concentrações da fração FABU (62,5 µg/mL – 15,63 µg/mL) ou controles (0,06% de DMSO e 10µM Dexametasona) por 1 h, e então estimuladas com lipopolissacáride de *Escherichia coli* (LPS, SIGMA/EUA) na concentração de 1µg/mL por 24 h. Após esse período, o sobrenadante da cultura foi descartado e adicionado novo meio DMEM contendo 2,7-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) na concentração de 10µM. Após a clivagem por esterases intracelulares e oxidação por EROs, a forma não fluorescente H₂DCFDA é convertida para a molécula de 2,7-diclorofluoresceína, altamente fluorescente. As células foram novamente incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 1 h e, logo após, o sobrenadante foi removido e as células lavadas 2 vezes com solução tampão de fosfato de sódio (PBS). Em seguida, mensurou-se a fluorescência em uma leitora de placas Synergy™ H1 (BioTek, EUA), nos comprimentos de onda de 485nm para excitação e 535nm para emissão.

4.7.3 Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio

A determinação da dosagem de peróxido de hidrogênio foi realizada baseado no protocolo descrito por Pick e Mizel (1981). Células RAW 264.7 foram semeadas na população de 2×10^6 /mL em placas de 96 poços, e incubadas a 37°C por 24 h. O meio foi removido e as células foram pré-tratadas com várias concentrações da fração FABU (62,5 µg/mL – 15,63 µg/mL) ou controles por 1 h, e então estimuladas com LPS na concentração de 1µg/mL por 24 h. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com solução de PBS e 100µL da solução

reagente, contendo NaCl 140 mM, fosfato de potássio 10 mM, dextrose 5,5 mM, vermelho de fenol 0,56 mM e peroxidase do tipo II 0,01 mg/mL em pH 7,0, foi adicionado, deixando-se incubar por 1 h a 37°C. Em seguida, foram adicionados 10µL da solução de NaOH 1N e a absorbância foi lida em 600nm com o auxílio de uma leitora de placas.

4.7.4 Atividade da fração acetato de etila sobre células RAW 264.7 estimuladas com LPS

Células RAW 264.7 plaqueadas na concentração de 5×10^5 células/mL em placas de 24 poços foram incubadas em atmosfera úmida em 37°C e 5% de CO₂ durante 16h. Logo após, as células foram pré-tratadas com várias concentrações da fração (62,5 µg/mL – 15,63 µg/mL) ou controles (0,06% DMSO ou 4µM Dexametasona) por 1 h, e então estimuladas com LPS na concentração de 1µg/mL por 24 h. Após esse período, o sobrenadante da cultura ou as células foram coletados para a análise dos marcadores.

4.7.5 Determinação da concentração de nitrito

A dosagem de nitrito indica a produção de NO associado aos macrófagos. Após o estímulo com LPS, a concentração de nitrito no sobrenadante da cultura foi determinada pelo método da Reação de Griess. Um volume de 100µL do sobrenadante foi adicionado a 150µL do reagente de Griess (1% de ácido sulfanílico em 5% de ácido fosfórico e 0,1% de dicloridrato de naftil-1-N-etilenodiamina). Uma curva padrão foi obtida usando diferentes concentrações de uma solução de nitrito de sódio (Sigma, USA). De maneira semelhante foram verificados os níveis de nitrito no sobrenadante da cultura após o tratamento das células com diferentes concentrações (3,125 a 12,5 µg/mL) de fisetinidol isolado de FABU antes de seu estímulo com LPS.

4.7.6 Níveis de citocinas TNF- α , TGF- β e IL-10

Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante da cultura foi coletada para a quantificação dos níveis de TNF- α , TGF- β e IL-10 utilizando o método imunoenzimático em fase sólida (ELISA) do tipo sanduíche, de acordo com as recomendações do fabricante (Novex®, Invitrogen, USA).

4.7.7 Determinação da peroxidação lipídica

A ação de radicais livres sobre lipídeos insaturados de membranas celulares resulta na formação de produtos de peroxidação lipídica, como o malonaldeído (MDA). A determinação de MDA foi realizada a partir da reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma, EUA) (LONDERO; LO GRECO, 1996). Células RAW 264.7 foram plaqueadas na concentração de 5×10^6 células/poço em placas de 24 poços e incubadas até que a aderência fosse observada. As células foram pré-tratadas com FABU (15,63–62,5 $\mu\text{g/mL}$) por 1h e estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) durante 12 h. Após esse período, as células foram ressuspensas com o auxílio de um *cell scraper* e lisadas após 3 ciclos de congelamento e banho ultrassônico. As amostras foram centrifugadas a 13,000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi reservado. Foram adicionados 60 μL de ácido perclórico, seguido de centrifugação, para precipitação das proteínas. Após, 200 μL de sobrenadante foram transferidos para novo tubo de reação. Um volume de 600 μL de TBA (em 0,5% de ácido acético) foi adicionado ao sobrenadante e incubado a 95°C por 60 min. Um volume de 300 μL de 1-butanol e 100 μL de NaCl 5M foi adicionado aos tubos de reação e centrifugados por 3 min 16,000 x g. Após a centrifugação, a camada superior foi coletada e incubada em banho-seco a 55°C até a total evaporação do 1-butanol. O precipitado resultante foi solubilizado em 200 μL de água ultrapura e transferido para uma placa de 96 poços. Leitura espectrofotométrica foi realizada em comprimento de onda 532 nm com auxílio de um leitor de placas (Asys UVM 340, Biochrom, USA). Os resultados foram expressos em $\mu\text{M/mg}$ de proteína. Para a curva padrão, o MDA foi obtido a partir da hidrólise ácida de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France).

4.8 Teste de migração de células epiteliais

4.8.1 Citotoxicidade da fração FABU sobre células epiteliais A549

Células epiteliais humanas A549 (BCRJ, Brasil), originárias de adenocarcinoma alveolar, foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/poço, e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 durante 16h. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações da fração FABU (0,78 $\mu\text{g/mL}$ a 100,0 $\mu\text{g/mL}$) ou controle de diluição (Tween 80 a 0,1%) e incubadas por 24 h. Após esse período, os sobrenadantes contendo

os tratamentos foram removidos e as células aderidas foram lavadas duas vezes com PBS. Logo em seguida, novo meio DMEM suplementado com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, Sigma, EUA) na concentração de 500 µg/mL foi adicionado aos poços. Após incubação por 4 h em 37°C e CO₂ a 5%, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, USA) foram adicionados aos poços. As placas foram agitadas vigorosamente por 15 min e a viabilidade celular, indicada pela produção do sal de formazan, foi mensurada pela leitura da solução final em leitora de placas com filtro de 570 nm.

4.8.2 Ensaio de migração celular *in vitro*

Células epiteliais humanas A549 (2 x 10⁵ células/poço) foram distribuídas em placas de 24 poços em meio DMEM High glicose com SFB 10% e 1% de antibióticos (Penicilina-estreptomicina, Sigma, EUA), mantidas em estufa, conforme método descrito por Ameeramja *et al.* (2016). As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ até a formação de uma monocamada com aproximadamente 90% de confluência. Em seguida, as células foram cultivadas em meio carente de fatores de crescimento, através da adição de meio suplementado apenas com soro fetal bovino (SFB, GIBCO, BRASIL) a 0,5% por 24 h, o que permite a sincronização das células em fase G0 do ciclo celular. Uma fenda foi realizada no meio do poço, dividindo a monocamada, com o auxílio de uma ponteira de 200 µL, apoiada em uma pipeta de vidro de 1 mL. Os poços foram lavados duas vezes com meio DMEM para retirada das células desprendidas da monocamada durante a produção da fenda. As células foram então tratadas com SFB a 0,5% (controle negativo), SFB a 10% (controle positivo) ou FABU nas concentrações de 1, 10, 100 µg/mL. O fechamento da fenda foi acompanhado por fotografias obtidas em microscópio invertido com câmera acoplada, com aumento de 400x, em intervalos de tempo de 0, 6 e 24 h após o tratamento. As fotos foram analisadas pelo programa *ImageJ* (NIH, EUA) e os resultados foram expressos como porcentagem de fechamento da fenda.

4.9 Testes *in vivo*

4.9.1 Preparação de gel contendo a fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata*

Gel de carbômero 940 (Carbopol®) foi utilizado como veículo para o tratamento tópico das feridas cirúrgicas com a fração acetato de etila de *B. unguolata*. A fração FABU foi

inicialmente solubilizada em tubo de polipropileno contendo 1mL de dipropilenoglicol, sob banho ultrassônico constante, durante 15 min. A mistura obtida foi retirada do tubo com o auxílio de uma seringa do tipo *luer lock* e, em seguida, conectado a um dispositivo do tipo torneira de três vias. Logo após, com o auxílio de uma outra seringa contendo carbopol a 5% p/v, adaptada ao mesmo dispositivo, o conteúdo das seringas foi misturado através da força aplicada aos êmbolos. Em seguida, adicionou-se aminometilpropanol (AMP-95) com o intuito de se corrigir o pH da mistura para 7, com o auxílio de fitas indicadoras de pH. Posteriormente, completou-se o volume da mistura com água ultrapura (q.s.p. 10mL) para obtenção do gel de carbopol a 1% contendo a fração de *B. unguolata* nas concentrações de 0,50% (p/v) (5 mg/mL) e 0,25% (p/v) (2,5 mg/mL), os quais foram utilizados para o tratamento das feridas cirúrgicas.

4.9.2 Animais

Camundongos machos C57BL/6, saudáveis, com 8 semanas de idade e peso entre 20-30g, foram obtidos do biotério do Núcleo de Biologia Experimental da Universidade de Fortaleza – NUBEX/UNIFOR. Os animais foram mantidos em temperatura controlada de 26°C, com ciclos claro e escuro de 12h e com água e comida *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Fortaleza, 018/2016.

4.9.3 Teste de irritabilidade cutânea em pele íntegra

Teste de irritabilidade cutânea em pele íntegra foi realizado baseado no trabalho descrito por JIA; ZHAO; JIA (2008), com modificações. Os camundongos foram inicialmente anestesiados com a aplicação intraperitoneal de uma solução de cetamina e xilazina (cetamina, 100 mg/kg; xilazina, 10mg/kg) e tricotomizados na superfície dorsal. Após o procedimento, os animais (n=5) foram tratados topicamente com o gel de FABU a 0,5% (p/v) e separados individualmente em cada gaiola. O tratamento foi realizado uma vez ao dia, a partir do dia do procedimento (dia 0), durante cinco dias, com volume de 200µL do gel. A administração foi realizada diretamente sobre a área da pele íntegra. Parâmetros macroscópicos e microscópicos foram avaliados, tais como a presença de reações cutâneas do tipo irritação, eritema, formação de pústula, exsudato, crosta ou quaisquer outros sinais de inflamação presentes na área depilada. Após a coleta dos dados, os animais foram eutanasiados e uma amostra de pele foi removida para análise histopatológica, com a finalidade de se observar alguma possível alteração nos tecidos.

4.9.4 Modelo de ferida cutânea

O modelo de ferida cutânea foi realizado de acordo com protocolo descrito por Naito *et al.*, (2014). Os animais foram inicialmente anestesiados com a aplicação intraperitoneal de cetamina e xilazina (cetamina, 100 mg/kg; xilazina, 10mg/kg). Em seguida, foi realizada a tricotomia do dorso do animal, assepsia da pele com etanol a 70% e, com o auxílio de um *punch* de biópsia de 8mm, uma única ferida foi realizada na região depilada de cada animal. Para evitar a contração inicial da ferida, um *splint* de silicone de aproximadamente 10,0 mm de diâmetro foi suturado na região periférica à lesão (WANG *et al.*, 2013). Os camundongos foram subdivididos em cinco grupos experimentais, cada grupo contendo seis animais:

Grupo Sham - camundongos que foram submetidos ao procedimento cirúrgico, mas que não receberam nenhum tratamento;

Grupo veículo - camundongos que foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com o gel sem a incorporação de FABU

Grupo tratamento padrão - camundongos que foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que foram tratados com FITOSCAR[®], produto comercial composto por extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville,

Grupo FABU 0,50% (p/v) - camundongos que foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que receberam o tratamento com o gel contendo FABU a 0,5% (p/v)

Grupo FABU 0,25% (p/v) - camundongos que foram submetidos ao procedimento cirúrgico e que receberam o tratamento com o gel contendo FABU a 0,25% (p/v)

Os animais foram tratados topicamente uma vez ao dia, com volume de 200 µL, pelo período de 5 dias, começando no dia 0 (logo após o procedimento cirúrgico). Logo após o tratamento, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais durante todo o período de experimento.

4.9.5 Estimativa da atividade antioxidante *in vivo*

A ação de radicais livres contra os lipídios de membranas celulares resulta na formação de produtos de peroxidação lipídica, como o malonaldeído, por exemplo. A peroxidação lipídica no local da lesão foi avaliada através da mensuração dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), baseado no protocolo descrito por OHKAWA; OHISHI; YAGI, (1979). Amostras do tecido da ferida foram coletadas 5 dias após a cirurgia. Um homogenato a 10% foi preparado em banho de gelo com auxílio de um homogeneizador

polytron em 50 mM de PBS (pH 7,8) e centrifugado a 11,000×g for 15min em 4°C. Depois da centrifugação, 30 µL de ácido perclórico foram adicionados ao sobrenadante e as proteínas foram removidas por centrifugação. Um volume de 300 µL TBA (em 0,5% de ácido acético) foi adicionado a um tubo de reação contendo 100 µL do sobrenadante final e incubado por 60 minutos a 95°C. Volumes de 150 µL de n-butanol e 50 µL de NaCl a 5M foram adicionados aos tubos e centrifugados por 3 min a 16,000 x g. Depois da centrifugação a camada superior foi coletada e adicionado de 100 µL de água ultrapura e transferido para uma placa de 96 poços. Em seguida, leitura das absorbâncias foi realizada em 532 nm (Asys UVM 340, Biochrom, USA). Os resultados foram expressos como µM/g de tecido. Para a curva padrão, MDA foi obtido a partir da hidrólise de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France).

4.9.6 Extração de RNA e expressão relativa de TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-1 β , COX-2 e VEGF-a

No 5º dia após o procedimento cirúrgico, amostras de tecido das lesões foram coletadas. RNA total foi extraído dos tecidos utilizando o reagente Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi solubilizado com água ultrapura contendo dicarbonato de dietila (DEPC) e mantido em freezer a -80°C até o momento do uso. Aproximadamente 1,5 µg de RNA total foram reversamente transcritos para obtenção de DNA complementar (cDNA) com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Para a realização da RT-PCR, *primers* foram desenhados utilizando o software OligoPerfect™ Designer Software (Invitrogen, USA), baseado nas sequências gênicas obtidas do *Genbank™* (NCBI Reference Sequence). Os seguintes *primers* foram empregados: COX-2 (NM_011198.4), F: 5'-AGAAGGAAATGGCTGCAGAA-3' e R: 5'-GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3'; VEGF-a (NM_001025250.3), F: 5'-CCAGGAGGACCTTGTGTGAT-3' e R: 5'-GGGAAGGGAAGATGAGGAAG-3'; TNF- α (NM_013693.3), F: 5'-CTGGGACAGTGACCTGGACT-3' e R: 5'-GCACCTCAGGGAAGAGTCTG-3'; TGF- β (NM_011577.2), F: 5'-TTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3' e R: 5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3'; IL-1 β (NM_008361.4), F: 5'-GGGCCTCAAAGGAAAGAATC-3' e R: 5'-TACCAGTTGGGGAAGTCTGC-3'; IL-6 (NM_031168.2), F: 5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3' e R: 5'-TCCACGATTTCCAGAGAAC-3'; TBP (NM_013684.3) (*housekeeping* gene): F: 5'-

AAGAGAGCCACGGACAACACTG-3' e R: 5'-TTCACATCACAGCTCCCCAC-3'. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 µL. A mistura da reação foi composta por aproximadamente 20 ng de cDNA, *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, USA), bem como *primers* na concentração de 300 nM. A RT-PCR foi desenvolvida em um termociclador *C1000 Touch Thermal Cycler CFX96 Real Time System* (Bio-Rad, USA). A programação da amplificação foi realizada através de incubação inicial de 50°C por 2 min, seguida de outra incubação de 95°C por 2 min e 40 ciclos de 95° por 15s e 60°C por 60s. Após amplificação do material, realizou-se análise da curva de dissociação (*melting curve*) para se observar a especificidade das reações. A expressão gênica relativa (*fold change*) foi normalizada com o gene constitutivo *TBP* (*TATA box binding protein*), utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O motivo de selecionarmos *TBP*, baseou-se no estudo realizado por Turabelidze *et al* (2010), onde os autores avaliaram vários genes utilizados como *housekeeping genes* em modelos de cicatrização e observaram que *TBP* apresentou expressão mais consistente e estável e poderia ser utilizado como gene de referência para a normalização e quantificação relativa em tais modelos.

4.9.7 Monitoramento da redução inicial da área da lesão

Os camundongos foram acompanhados diariamente e observadas características como: alterações da massa corporal, estabilidade do *splint*, exsudação através da ferida, presença de infecção e inflamação e formação de tecido de granulação. Foram realizados registros fotográficos das lesões nos dias 0 (antes do tratamento), 2 e 5. Com base nas análises das imagens obtidas, foi realizado o cálculo do fechamento da ferida durante este período, com auxílio do programa *Image J*[®] (Bethesda, MD, EUA). As imagens foram capturadas com câmera fotográfica digital com resolução de 10,0 megapixels. A porcentagem do tamanho da ferida (*P*) foi calculada para os diferentes períodos, a partir das áreas final e inicial das lesões, aplicando-se a equação:

$$P = \frac{A_f}{A_i} \times 100,$$

onde A_f é a área final da lesão no dia avaliado e A_i a área inicial da lesão.

4.9.8 Avaliação histológica

Uma amostra de tecido cutâneo da região da ferida foi removida 5 dias após o procedimento cirúrgico. O material biológico foi fixado em formalina tamponada a 10% para avaliação histológica. Os tecidos foram montados em blocos de parafina, seccionados a 5 μm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica. Os resultados da análise dos grupos foram expressos de forma descritiva.

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e utilizou-se os testes de análise de variância (*one-way* ANOVA ou *two-way* ANOVA) seguido dos pós-testes de Tukey ou de Bonferroni como método de comparações múltiplas, para verificação de possíveis diferenças existentes entre os grupos experimentais. A análise dos dados foi realizada com o auxílio do programa estatístico *GraphPad Prism* versão 5.00 para Windows (GraphPad Prism, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor ou equivalente a 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Teor de compostos fenólicos e taninos totais

Através do método da Folin-Denis, estimou-se o teor de fenóis totais e taninos totais da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* (FABU). Uma curva de calibração foi obtida através de uma solução etanólica de ácido gálico, nas concentrações de 1,69 µg/mL a 13,56 µg/mL, conforme a seguinte equação:

$$A = 0,0632C + 0,0791$$
$$R^2 = 0,98$$

Onde, **A** é a absorvância obtida com a amostra teste e **C** a concentração de equivalentes de ácido gálico

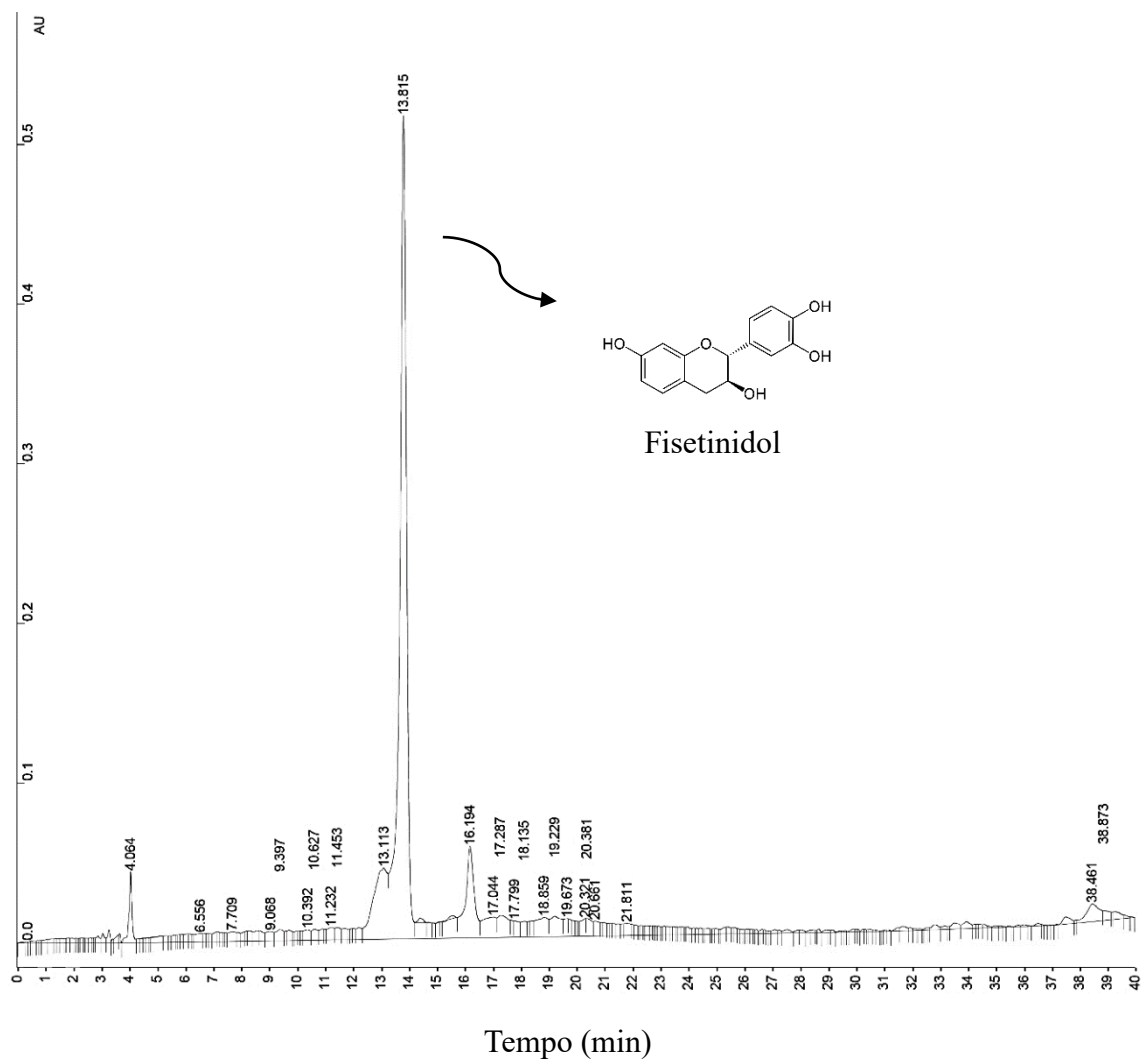
Dessa forma, foi observado que a fração apresentou um teor de 46,04% de polifenóis totais, expressos como ácido gálico. Além disso, a concentração daqueles não precipitáveis com crosprovidona correspondeu a aproximadamente 6,95%, podendo-se afirmar que a concentração de taninos na amostra foi de $(46,04 - 6,95) = 39,09\%$, expressos também na forma de ácido gálico.

5.2 Determinação do teor de fisetinidol

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada para verificar o perfil cromatográfico da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata*, bem como para estimar, de forma semi-quantitativa, o teor de fisetinidol contido em FABU, expresso como % de fisetinidol por amostra da fração. Uma solução de fisetinidol, isolado da FABU, foi preparada na concentração de 500µg/mL e submetido a CLAE. Como observado na figura 6, o composto apresentou tempo de retenção (tR) de 13,54 min. De forma semelhante, uma solução de 500 µg/mL da fração, foi submetida a CLAE nas mesmas condições (Figura 7). A análise da área do pico majoritário no cromatograma de FABU, correspondente ao fisetinidol, revelou uma concentração de aproximadamente 36,42% deste flavonoide. De maneira análoga, partindo-se da massa inicial de FABU utilizada para o isolamento dos flavonoides anteriormente descritos (4,78g) e da massa obtida do fisetinidol isolado desta fração (1,62g), verifica-se um teor de aproximadamente 33,89% deste flavonoide, o que corrobora diretamente com os resultados

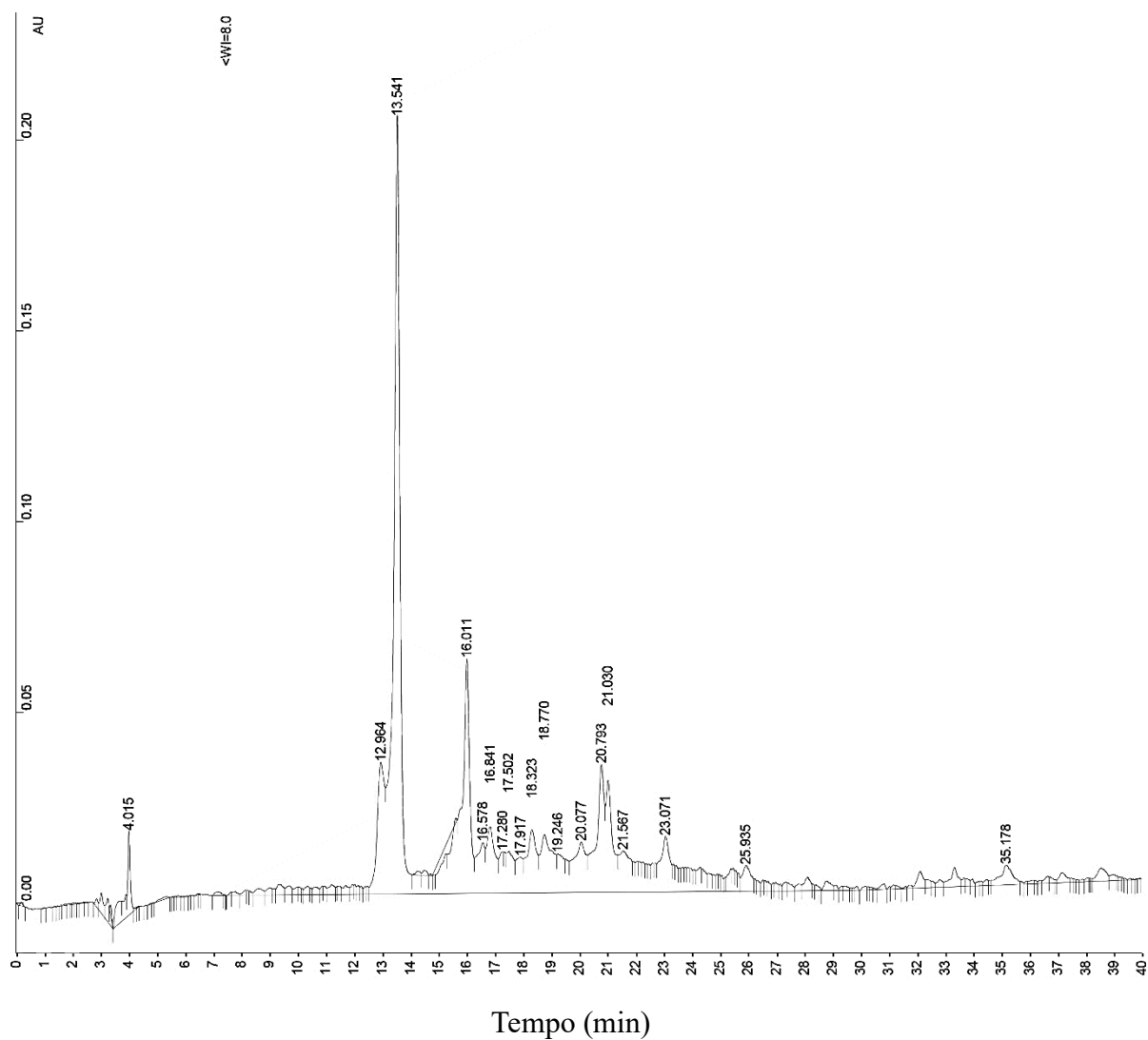
obtidos através da análise cromatográfica.

Figura 6: Cromatograma do padrão fisetinidol, isolado da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata*, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).



CLAE realizada em sistema Varian ProStar HPLC System UV-VIS, equipado com bombas Rainin Dynamax, modelo SD-200.

Figura 7: Cromatograma da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).



CLAE realizada em sistema Varian ProStar HPLC System UV-VIS, equipado com bombas Rainin Dynamax, modelo SD-200.

5.3 Capacidade antioxidante total

Determinou-se a capacidade antioxidante total da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* (FABU) através do método da redução do fosfomolibdênio. Inicialmente, uma curva de calibração foi obtida com uma solução etanólica de hidroxitolueno butilado (BHT), nas concentrações de 12,5 µg/mL a 50 µg/mL, obtendo-se a seguinte equação:

$$A = 0,01C - 0,0118$$
$$R^2 = 0,998$$

Onde, **A** é a absorvância obtida com a amostra teste e **C** a concentração de equivalentes de BHT

Através do método da redução do fosfomolibdênio, foi observado que a atividade antioxidante da fração correspondeu a 1,70 mg equivalente de BHT por mg de FABU, indicando que a capacidade antioxidante desempenhada por 1mg de FABU correspondeu à mesma atividade apresentada por 1,70 mg de BHT. Os dados demonstraram que FABU apresentou maior capacidade antioxidante do que o controle positivo.

5.4 Atividade antimicrobiana

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de FABU foi avaliada frente as cepas de *Staphylococcus aureus* sensível a metilina ATCC® 6538P, *Staphylococcus aureus* resistente a metilina ATCC® 65398, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027, bem como contra a cepa de *Candida albicans* ATCC® 22019. Conforme verificado nas tabelas 2 e 3, o tratamento com as diferentes concentrações da fração utilizadas no teste não demonstrou atividade significativa em inibir o crescimento microbiano. Dessa maneira, os resultados indicaram que a CIM de FABU contra todas as cepas de microrganismos testados foi > 500µg/mL, o que demonstrou baixa efetividade da fração contra estes patógenos.

Tabela 2: Avaliação da atividade antibacteriana de FABU contra as cepas de *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa*.

	^b CIM		
^a Cepas Amostra Teste	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® #9027)	MSSA (ATCC® #6538P)	MRSA (ATCC® #65398)
FABU (µg/mL)	>500	>500	>500
Controle Tween 80 (%)	>1,5%	>1,5%	>1,5%

^aCepas de bactérias da coleção ATCC. ^bCIM (Concentração Inibitória Mínima) foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano depois do período de incubação. Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo M07-A10 (CLSI, 2015). O intervalo de concentração dos compostos testados variou de 0,9765 a 500 µg/mL da fração e de 0,0029% a 1,5% (v/v) de Tween 80, utilizado como veículo.

Tabela 3: Avaliação do efeito antifúngico de FABU contra *Candida albicans*.

	^b CIM
^a Cepa Amostra Teste	<i>C. albicans</i> (ATCC® #22019)
FABU (µg/mL)	>500
Controle Tween 80 (%)	>1,5%

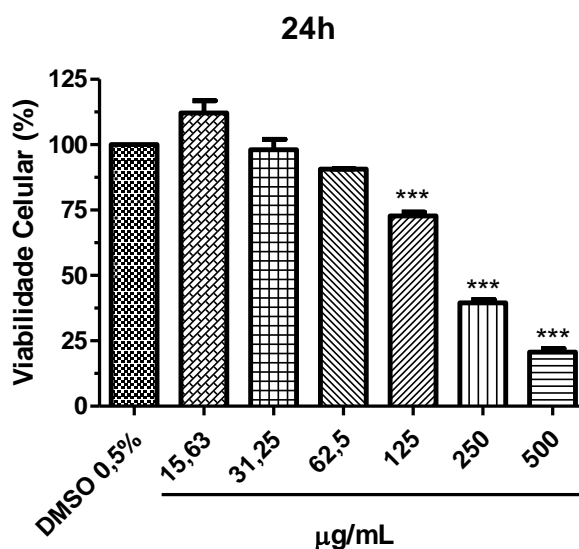
^aCepa de leveduras da coleção ATCC. ^bCIM (Concentração Inibitória Mínima) foi definida como a menor concentração que produziu 50% de redução do crescimento celular em comparação com o controle depois do período de incubação de 24h. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27- A3 (CLSI, 2008). O intervalo de concentração dos compostos testados variou de 0,9765 a 500 µg/mL de FABU e de 0,0029% a 1,5% de Tween

80, utilizado como veículo.

5.5 Toxicidade celular de FABU contra macrófagos murinos RAW 264.7

A toxicidade celular de FABU em macrófagos RAW 264.7 foi avaliada pelo método do MTT. Conforme demonstrado na figura 8, foi possível observar que FABU apresentou citotoxicidade sobre os macrófagos RAW 264.7 em concentrações equivalentes ou superiores a 125 µg/mL. Concentrações de FABU abaixo desse valor foram utilizadas nos testes de avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória.

Figura 8: Citotoxicidade da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* em células RAW 264.7 através da técnica do MTT.



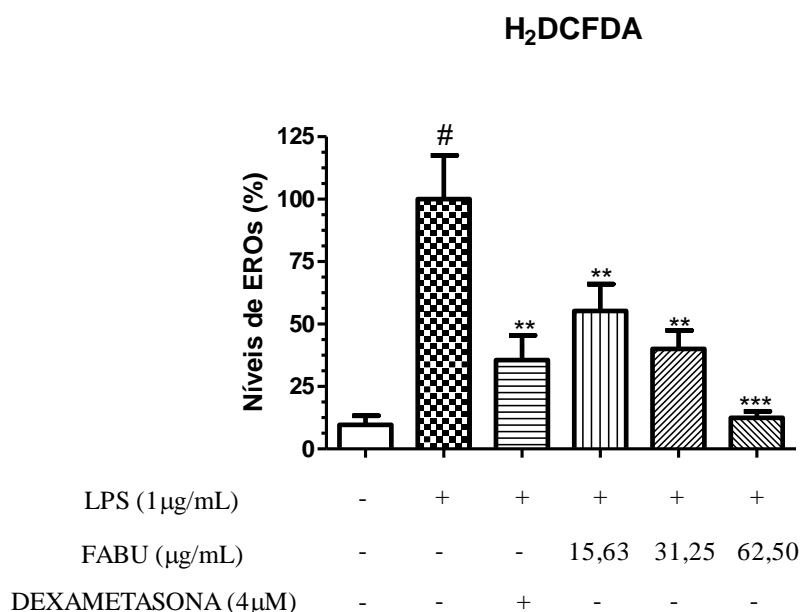
***p < 0,001 vs grupo controle (Teste de Tukey).

5.6 Detecção de espécies reativas de oxigênio usando 2,7-diclorofluoresceína diacetato

Para se avaliar a capacidade de FABU em reduzir os níveis de EROs em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, os macrófagos foram incubados com diversas concentrações da fração na presença de LPS por um período de 24 horas. As células foram então expostas ao composto H₂DCFDA, amplamente utilizado para detectar EROs. Conforme observado pela figura 9, o tratamento com FABU nas concentrações de 15,63, 31,25 e 62,5 µg/mL resultou na redução significativa dos níveis de espécies reativas de oxigênio, indicado pela redução do sinal

da fluorescência, quando comparado ao grupo controle estimulado com LPS e sem tratamento ($p < 0,01$ para 15,63 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0,001$ para 62,5 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 9: Capacidade da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* em reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio em células RAW 264.7 estimuladas por LPS



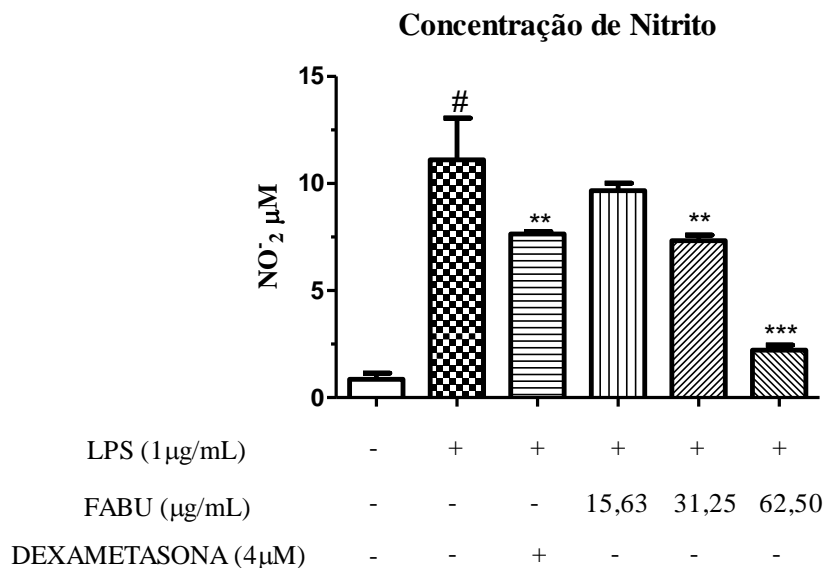
A determinação de EROs presentes nas células foi avaliada através da análise do sinal de fluorescência, utilizando o método de 2,7-diclorofluoresceína diacetato. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ vs grupo de células estimuladas com LPS e sem tratamento (teste de Tukey). # $p < 0,001$ vs Grupo Controle (teste de Tukey). EROs: Espécies reativas de oxigênio

5.7 Avaliação dos níveis de óxido nítrico em células RAW 264.7 estimuladas com LPS

Foi investigada a capacidade do tratamento com a fração de *B. unguolata* reduzir os níveis de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. As células foram previamente tratadas com diferentes concentrações de FABU e em seguida estimulados com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS por 24h. A produção de NO foi mensurada através da dosagem de nitrito presente no sobrenadante da cultura, como medida indireta da produção de óxido nítrico. Como observado na figura 10, os resultados demonstram que quando comparado ao grupo não tratado e estimulado com LPS, a fração FABU, nas concentrações de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, foi

capaz de diminuir significativamente os níveis de NO mensurados no sobrenadante da cultura ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Figura 10: Capacidade da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* em reduzir os níveis de óxido nítrico em células RAW 264.7 estimuladas por LPS.

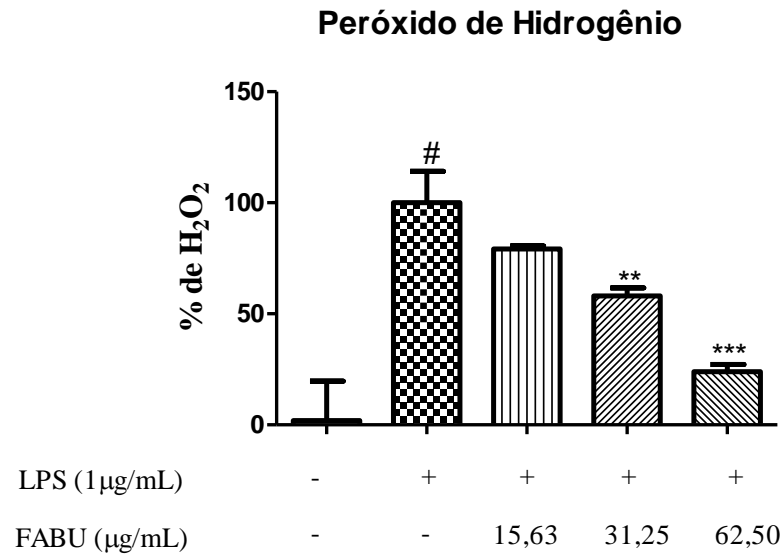


Nitrito foi dosado no sobrenadante da cultura após 24h do tratamento, como medida indireta da concentração de NO. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ vs grupo de células estimuladas com LPS e sem tratamento (teste de Tukey). # $p < 0,001$ vs Grupo controle (teste de Tukey).

5.8 Redução dos níveis de peróxido de hidrogênio em macrófagos estimulados com LPS

A fim de se investigar se a fração acetato de etila de *B. unguolata* seria capaz de inibir o estresse oxidativo através da redução dos níveis de peróxido de hidrogênio, macrófagos tratados com diferentes concentrações de FABU foram estimulados com LPS e em seguida foram mensurados os níveis de peróxido de hidrogênio entre os diferentes grupos. Como observado na figura 11, a produção de H_2O_2 pelos macrófagos foi significativamente aumentada pela ação do LPS e reduzida de maneira dose dependente pelo tratamento com a fração nas concentrações de 31,25 μg/mL e 62,5 μg/mL ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Figura 11: Capacidade de fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* em reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio em células RAW 264.7 estimuladas por LPS

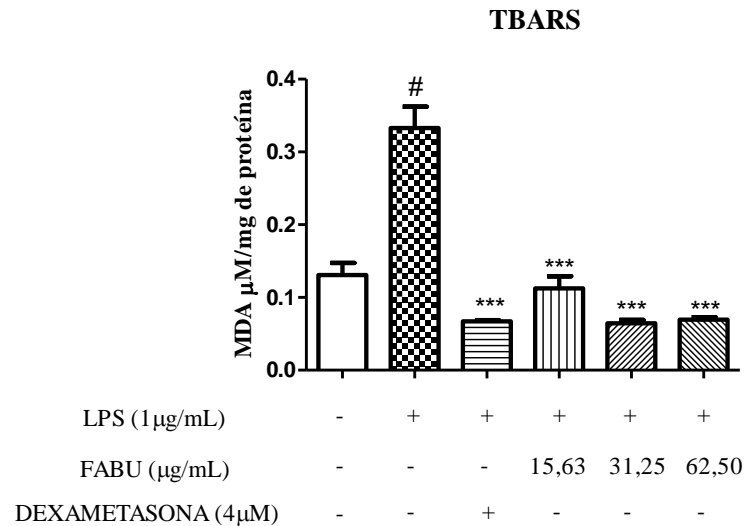


Peróxido de hidrogênio determinado após o tratamento com diferentes concentrações de FABU. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ vs grupo de células estimuladas com LPS; # $p < 0,001$ vs grupo controle.

5.9 Efeito de FABU sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Avaliou-se o grau de peroxidação lipídica através da dosagem de TBARS nos macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. Conforme verificado na figura 12, quando comparado ao grupo estimulado com LPS, os níveis de TBARS nas células foram significativamente reduzidos pelo tratamento com a fração em todas as concentrações testadas ($p < 0,001$), indicando que FABU demonstra-se eficaz em reduzir a peroxidação lipídica pelo modelo avaliado.

Figura 12: Capacidade da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* em reduzir os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS

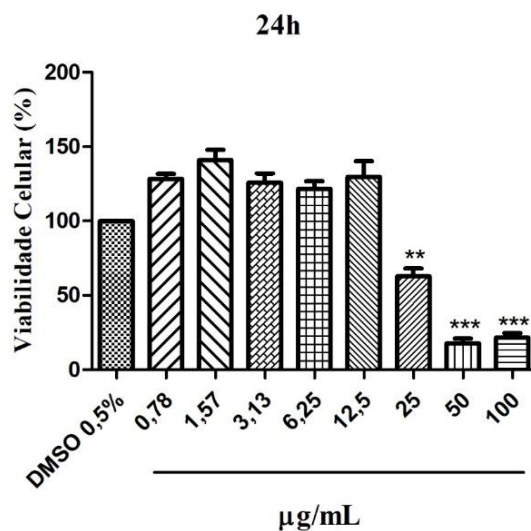


Os níveis de peroxidação lipídica induzido por radicais livres nos macrófagos estimulados com LPS foram mensurados através da dosagem de TBARS após 24h do tratamento. *** p <0,001 vs Grupo de células estimulado com LPS e sem tratamento; # p <0,001 vs Grupo controle.

5.10 Citotoxicidade e avaliação do potencial antioxidante de Fisetinidol

Em virtude do flavonoide fisetinidol ser o composto majoritário presente na fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata*, foi verificado se o tratamento com o constituinte isolado seria capaz de modular a resposta de macrófagos estimulados com LPS. A figura 13 apresenta a viabilidade de macrófagos, avaliada pelo método do MTT, após o tratamento com diferentes concentrações de fisetinidol. Concentrações superiores ou igual a 25µg/mL de fisetinidol foram consideradas citotóxicas e, portanto, não foram utilizadas para avaliação do potencial antioxidante deste flavonoide contra células RAW 264.7 estimuladas com LPS.

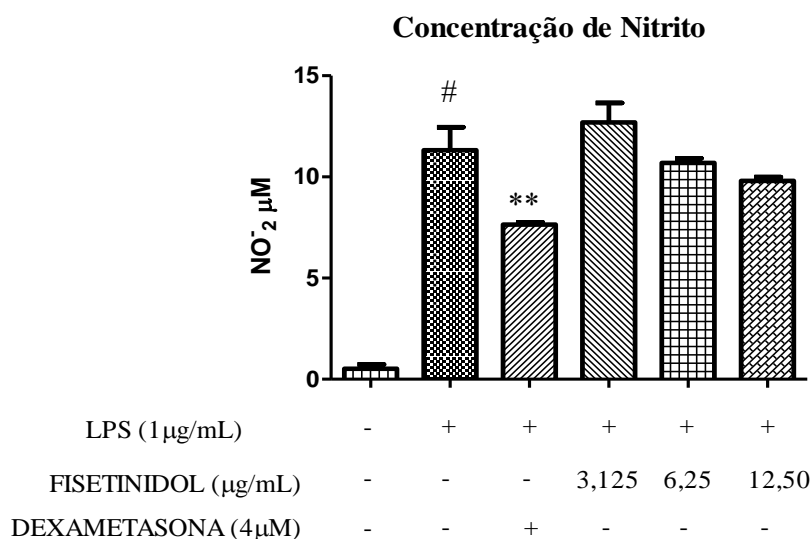
Figura 13: Citotoxicidade de fisetinidol isolado da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* em células RAW 264.7



A citotoxicidade foi avaliada utilizando o método do MTT por período de 24h. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ vs grupo controle DMSO (Teste de Tukey).

Foi investigada a capacidade de fisetinidol em modular os níveis de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. As células foram previamente tratadas com as concentrações de (3,13 – 12,50 µg/mL) e em seguida estimulados com 1µg/mL de LPS por 24h. A produção de NO foi mensurada através da dosagem de nitrito presente no sobrenadante da cultura, como medida indireta da produção de óxido nítrico. Como observado na figura 14, os resultados demonstram que quando comparado ao grupo não tratado e estimulado com LPS, fisetinidol, nas condições testadas, não foi capaz de diminuir significativamente os níveis de NO mensurados no sobrenadante da cultura.

Figura 14: Capacidade de fisetidinol isolado da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* em reduzir as concentrações de nitrito em células RAW 264.7 estimuladas por LPS.



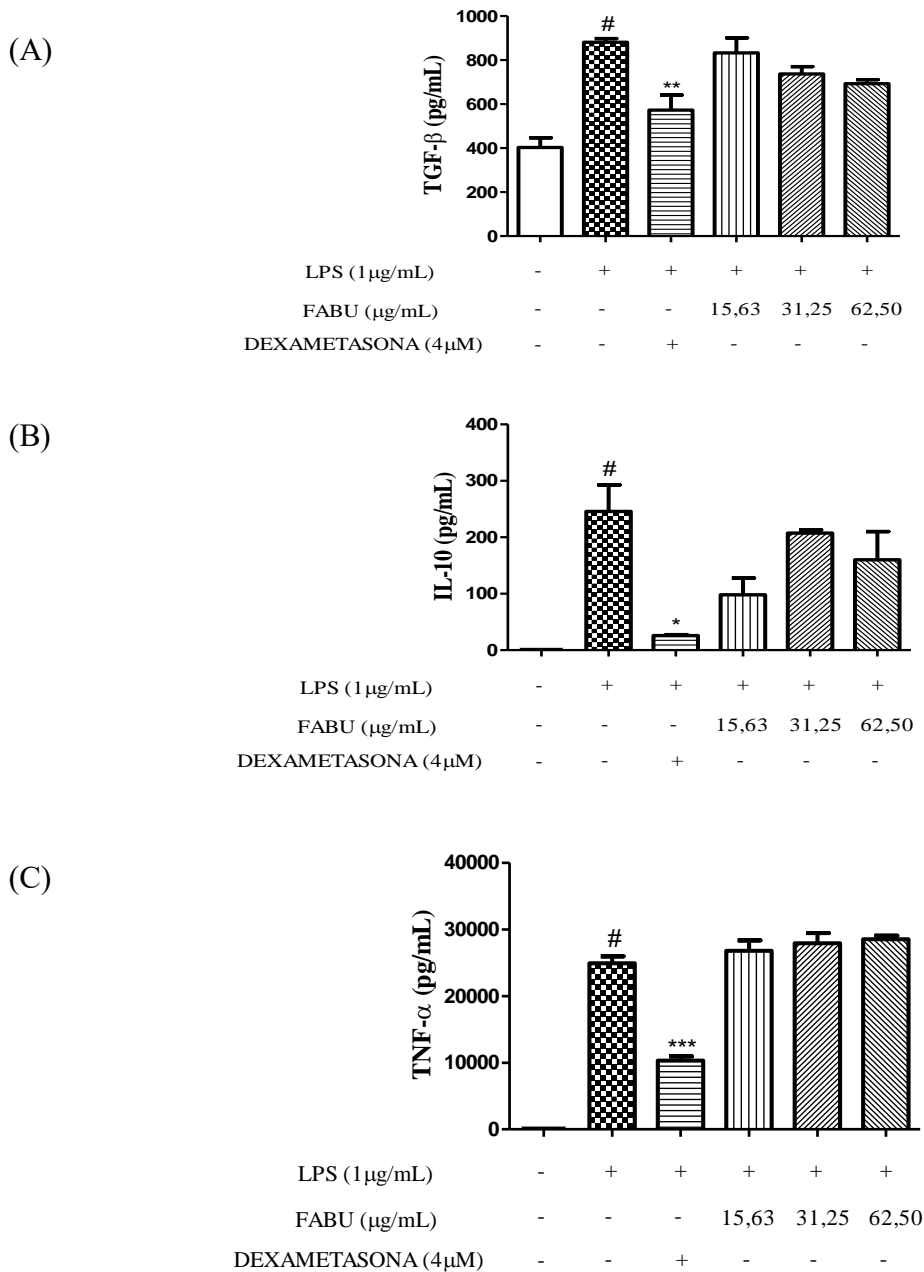
Nitrito foi dosado no sobrenadante da cultura após 24h do tratamento, como medida indireta da concentração de NO. ** p <0,01 vs grupo de células estimuladas com LPS e sem tratamento (teste de Tukey). # p <0,001 vs Grupo controle (teste de Tukey).

Os dados obtidos auxiliaram na compreensão que a atividade antioxidante encontrada após o tratamento com a fração FABU deveria ser decorrente de sinergismo entre os vários componentes da mesma e não do composto isolado, no caso, fisetidinol. Assim sendo, os experimentos seguintes foram realizados apenas com a fração FABU.

5.11 Quantificação dos níveis de citocinas após tratamento com FABU

Como observado na figura 15, as concentrações de TGF- β (15A) e IL-10 (15B) TNF- α (15C) foram significativamente aumentadas no grupo estimulado com LPS, quando comparada ao grupo controle sem tratamento. Entretanto, o tratamento com as diferentes concentrações de FABU não foi capaz de alterar os níveis destas citocinas, sugerindo que a fração não apresentou atividade imunomodulatória significativa pelo modelo estudado.

FIGURA 15: Capacidade da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* em modular os níveis das citocinas TGF- β , IL-10 e TNF- α em macrófagos estimulados com LPS



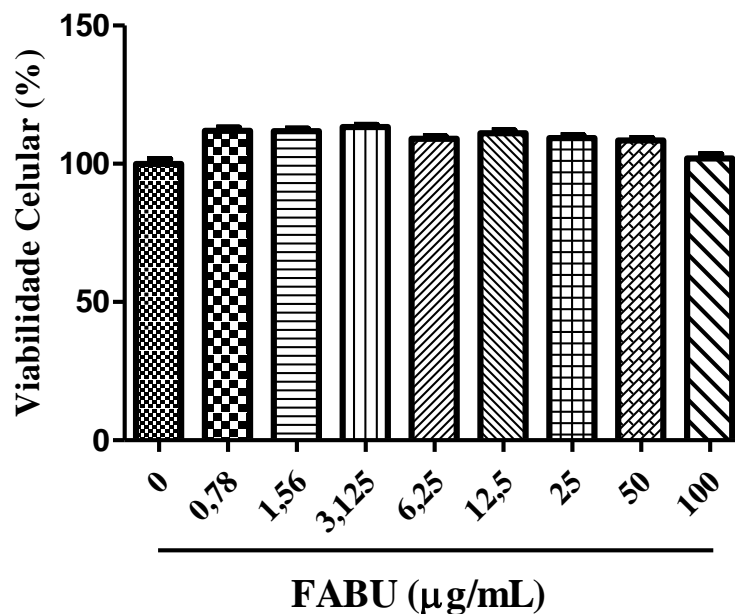
Após 24h do tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado e procedeu-se a determinação dos níveis de citocinas através de técnica de ELISA. (A) Determinação dos níveis de TGF- β . **p < 0,01 vs grupo de células estimuladas por LPS e sem tratamento (teste de Tukey); #p < 0,001 vs grupo controle. (B) Determinação dos níveis de IL-10. * p < 0,05 vs grupo de células estimuladas com LPS e sem tratamento; #p < 0,01 vs controle. (C) Determinação dos níveis de TNF- α . ***p < 0,001 vs grupo de células estimuladas por LPS e sem tratamento; #p < 0,001 vs Grupo controle.

5.12 Avaliação da atividade cicatrizante *in vitro*

5.12.1 Toxicidade Celular em células A549

Para se avaliar a citotoxicidade de FABU contra as células A549 pelo método do MTT, estas foram incubadas com diversas concentrações da fração por um período de 24 h. Observou-se que o tratamento com as concentrações testadas não levou à redução da viabilidade celular (figura 16). Dessa forma, doses $\leq 100\mu\text{g/mL}$ foram utilizadas para a avaliação da atividade cicatrizante *in vitro* de *B. unguolata*.

Figura 16: Viabilidade celular de células A549 após incubação na presença de várias concentrações de FABU por 24 h.



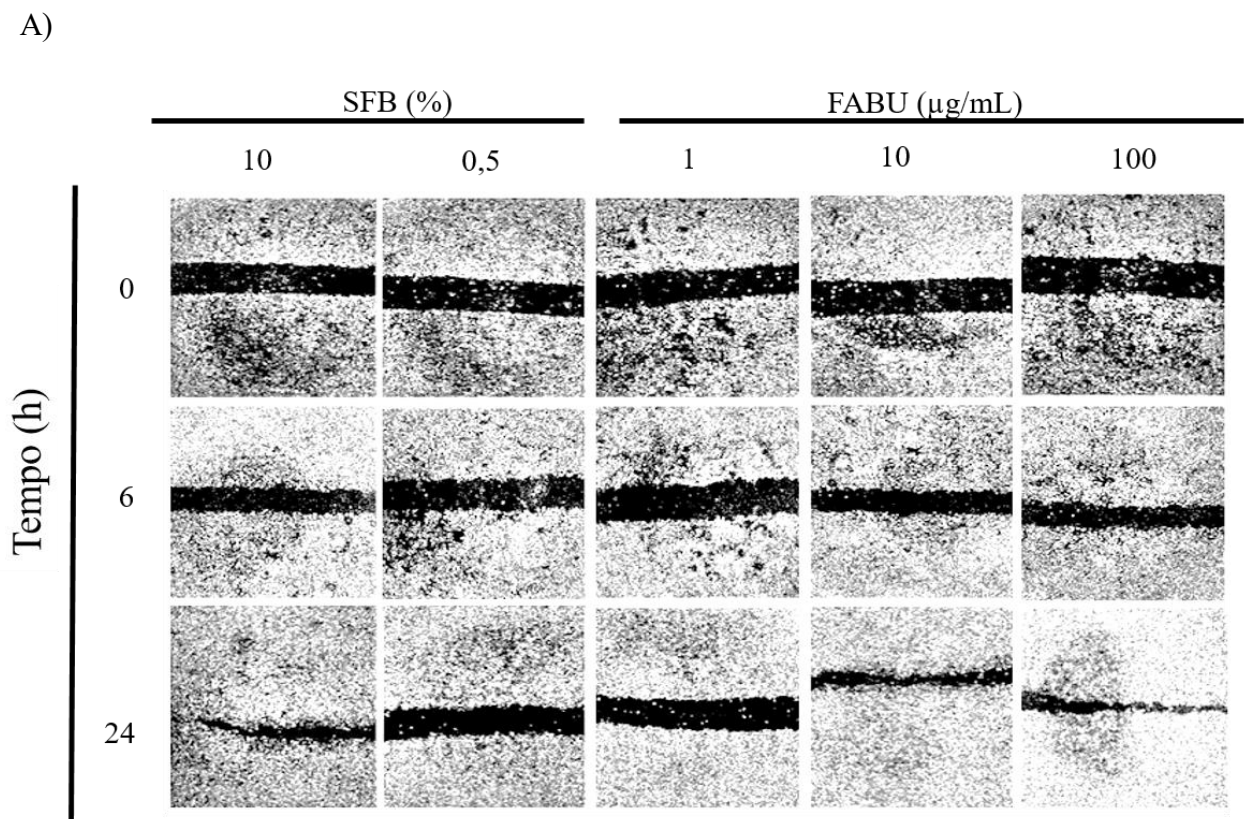
A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. O tratamento com as diferentes concentrações da fração não evidenciou qualquer redução significativa sobre a viabilidade celular em células epiteliais A549.

5.12.2 Efeito cicatrizante *in vitro* de FABU contra células epiteliais A549

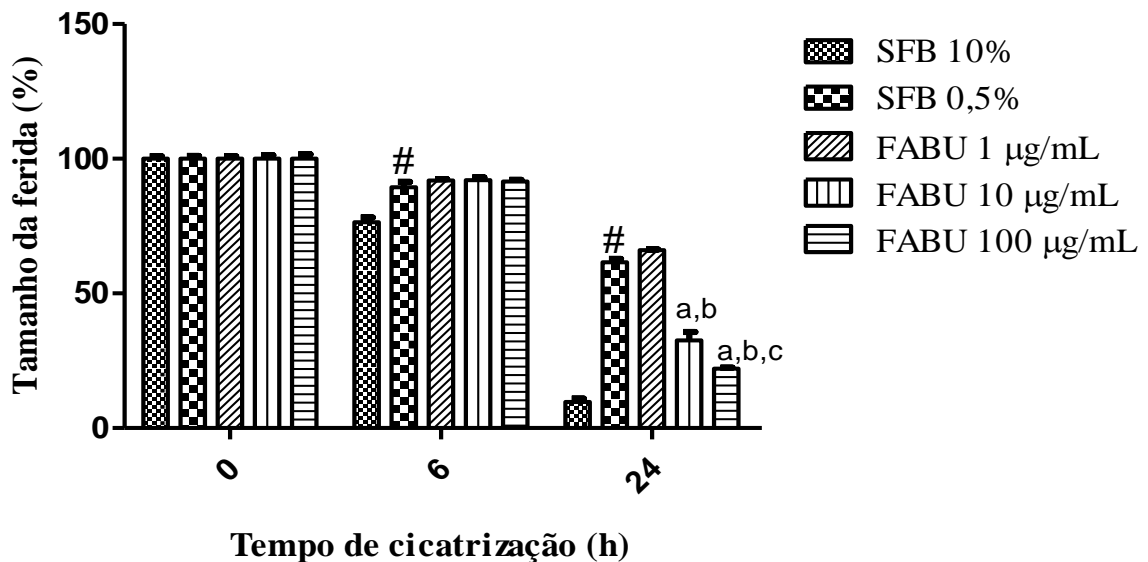
O efeito da FABU sobre o processo de migração celular foi estimado através do modelo de cicatrização *in vitro*. Como observado na figura 17, o tratamento com a fração nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ reduziu significativamente ($p < 0,001$), de maneira dose

dependente, o tamanho da fenda produzida no poço contendo as células, em comparação ao grupo controle, tratado apenas com soro fetal bovino a 0,5%. Isto indica que a FABU estimulou efetivamente o processo de migração celular pelo modelo apresentado. A figura 17B mostra que após 24h de incubação, células A549 tratadas com 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de FABU reduziram, respectivamente, a área inicial da lesão para aproximadamente 32,6% e 22,0%. A análise realizada após 6h de incubação com FABU não demonstrou diferenças na área da lesão em comparação ao grupo controle.

FIGURA 17: Ensaio de avaliação da migração celular *in vitro* promovida por FABU sobre células epiteliais A549.



B)



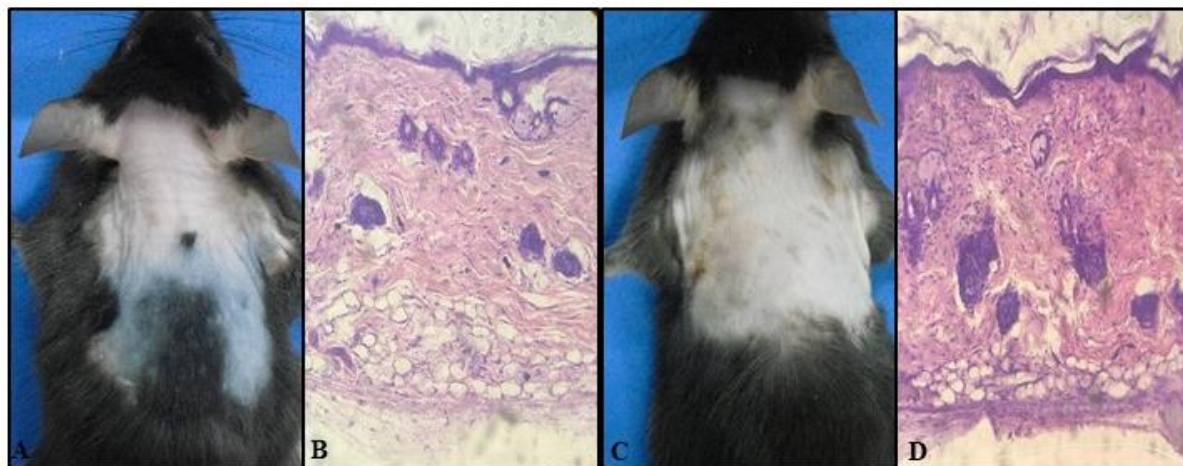
Fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* induziu migração celular, utilizando-se como modelo células epiteliais A549. (A): As feridas foram fotografadas nos períodos 0, 6 e 24 horas. (B) Medida da área da ferida. ^ap < 0,001 vs grupo controle tratado apenas com SFB a 0,5%; ^bp < 0,001 vs grupo tratado com FABU 1 µg/mL e ^cp < 0,001 vs FABU 10 µg/mL. [#]p < 0,001 vs Tratamento com 10% de SFB. Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni foram usados para a análise. SFB: Soro fetal bovino.

5.13 Modelo *in vivo* de ferida cirúrgica

5.13.1 Teste de irritabilidade cutânea

O tratamento tópico com o gel contendo 0,5% de FABU não promoveu qualquer sinal de alteração no local da aplicação da pele em comparação ao grupo que não recebeu tratamento, não tendo sido observado irritação, eritema, exsudato ou quaisquer outros sinais de inflamação presentes na área depilada. Além disso, a análise microscópica da pele tampouco evidenciou qualquer sinal de inflamação ou alteração morfológica com o tratamento tópico (Figura 18).

Figura 18: Teste de irritabilidade cutânea do gel contendo fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* a 0,5%.

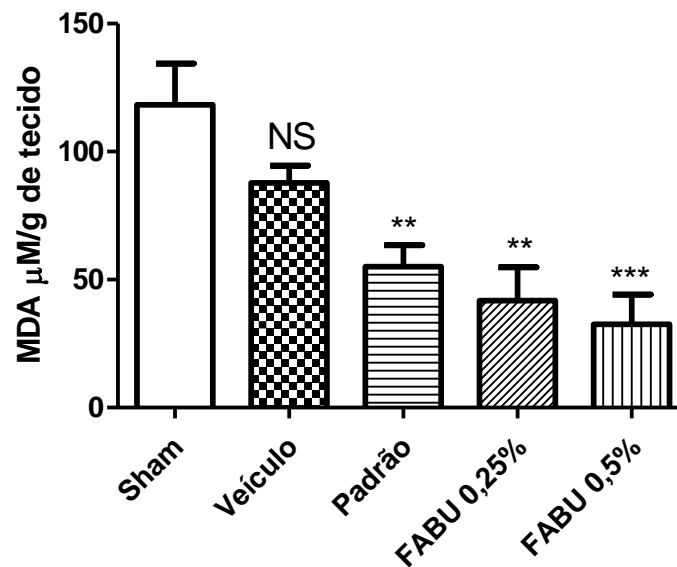


Lado esquerdo: Imagem macroscópica (A) e microscópica (B) da pele íntegra, de animal controle que não recebeu tratamento (dia 5). Lado direito: Análise macroscópica (C) e microscópica (D) da pele íntegra, de animal tratado com gel a 0,5% de FABU (dia 5). Em ambos os grupos foram evidenciadas secções histológicas revestidas por epitélio pavimentoso estratificado paracaterinizado atrófico, sob o qual há tecido conjuntivo fibroso denso. Não há sinais de inflamação. Magnificação: 100x

5.13.2 Estimativa da atividade antioxidante *in vivo*

Foi avaliado o grau de peroxidação lipídica através da dosagem dos níveis de MDA nas lesões, com o intuito de se estimar, *in vivo*, o efeito antioxidante e o potencial cicatrizante do gel contendo FABU. Conforme verificado na figura 19, quando comparado ao grupo Sham (sem tratamento), os níveis de TBARS nos tecidos foram significativamente reduzidos pelo tratamento com a fração de *B. unguolata* nas concentrações testadas de 0,25% e 0,5% ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), indicando que FABU foi eficaz em reduzir a peroxidação lipídica no modelo testado. O tratamento padrão também apresentou redução significativa dos níveis de MDA ($p < 0,01$), sugerindo que os polifenóis presentes em ambas preparações podem contribuir com a redução do dano celular promovido por radicais livres.

Figura 19: Capacidade da FABU em reduzir os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na área da lesão.

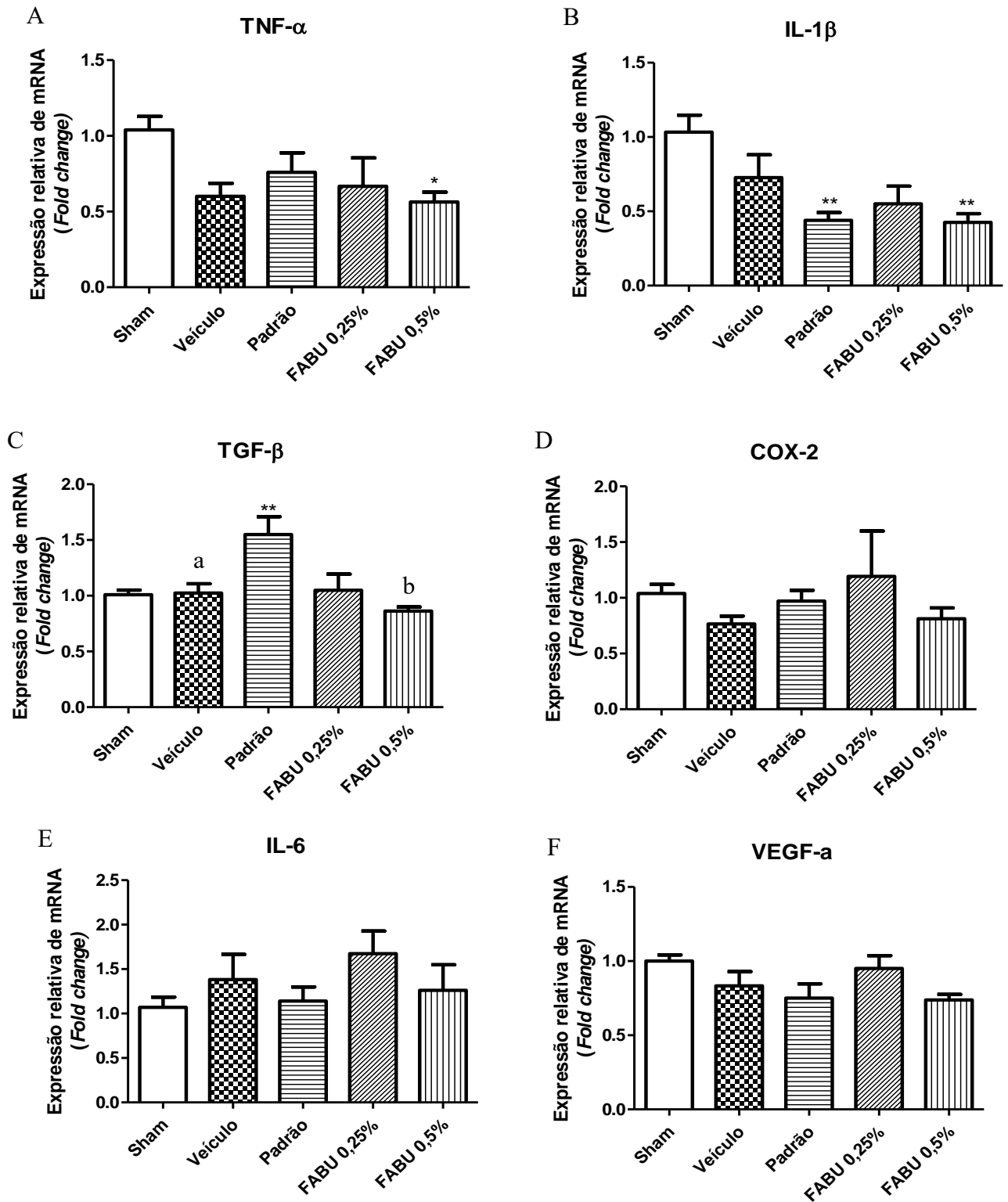


Amostras de tecido da área da ferida foram coletadas 5 dias após a cirurgia para se avaliar os níveis de peroxidação lipídica presente nas lesões entre os diferentes grupos estudados. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ vs grupo Sham (sem tratamento) (teste de Tukey). NS: Não significativo. Tratamento padrão: Fitoscar®

5.13.3 Avaliação dos níveis de expressão relativa de TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-1 β , COX-2 e VEGF-a no tecido lesionado.

Conforme observado na figura 20, os níveis das expressões relativas de alguns genes na área lesionada foram mensurados 5 dias após a ferida cirúrgica. O tratamento com a fração acetato de etila de *B. unguolata* na concentração de 0,5% foi capaz de reduzir significativamente os níveis da expressão relativa de TNF α (5A) e IL-1 β (5B) no ambiente inflamatório ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Entretanto, o mesmo tratamento com a fração não foi capaz de modular de forma significativa os níveis de expressão relativa de TGF- β no local da lesão (5C), o que foi observado apenas com o tratamento padrão ($p < 0,01$). Os níveis de expressão relativa de IL-6 (5D), COX-2 (5E) e VEGF-a (5F) no modelo estudado não foram alterados significativamente nem com o tratamento com FABU nem com o medicamento padrão.

FIGURA 20: Análise da expressão relativa de genes de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios na área da ferida cirúrgica em camundongos C57BL/6 tratados com fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata*



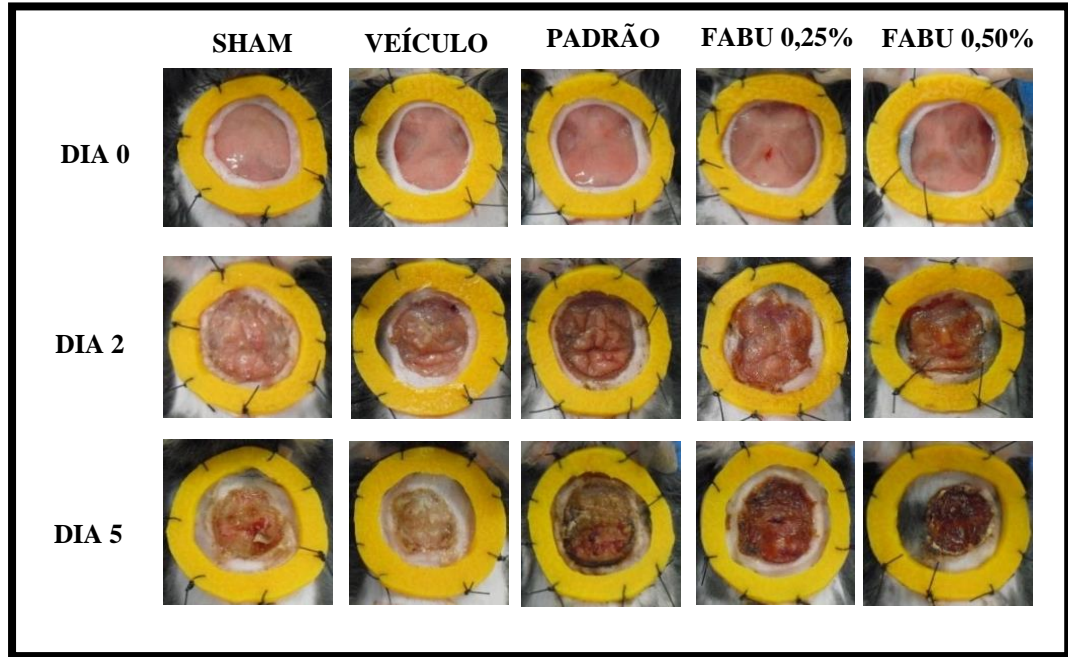
Análise da expressão gênica relativa por RT-PCR dos biomarcadores TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-1 β , COX-2 e VEGF-a no local da lesão 5 dias após a cirurgia. (A) Expressão relativa de TNF- α . * $p < 0,05$ vs grupo Sham (Teste de Tukey). (B) Expressão relativa de IL-1 β . ** $p < 0,01$ vs grupo Sham (Teste de Tukey). (C) Expressão relativa de TGF- β . ** $p < 0,01$ vs grupo Sham, ^a $p < 0,01$ e ^b $p < 0,001$ vs grupo padrão (Teste de Tukey). (D, E e F): Não foram observadas alterações significativas dos níveis de expressão relativa de COX-2, IL-6 ou VEGF-a (respectivamente), quando os grupos tratados com FABU ou medicamento padrão foram comparados ao grupo Sham. Os resultados foram obtidos com a aplicação do teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Tratamento padrão: Fitoscar®

5.13.4 Monitoramento da taxa de fechamento da lesão e análise histopatológica

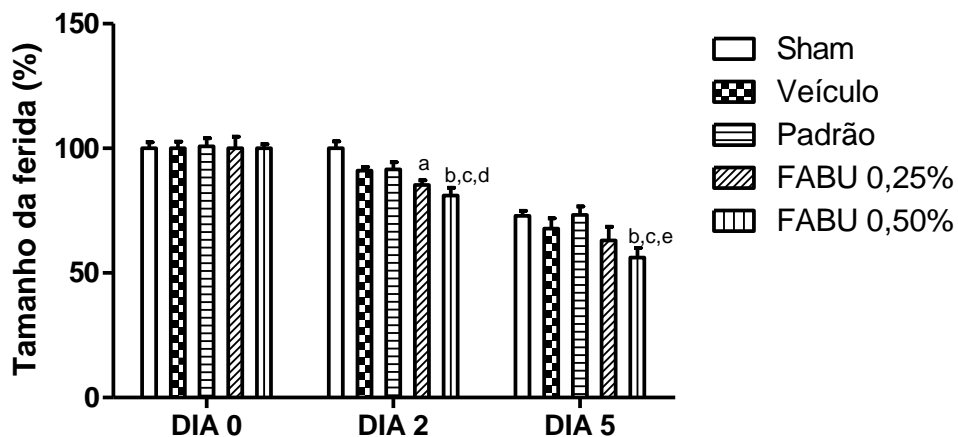
Conforme apresentado na figura 21, as imagens representam a progressão inicial das feridas nos dias 0, 2 e 5 de lesão tecidual. Durante o período avaliado, não foi observado nenhum indicativo de proliferação bacteriana no local da ferida. A diminuição da área das lesões ocorreu de maneira progressiva ao longo do tempo em todos os grupos. As fotografias demonstram que no grupo tratado com a fração de *B. unguolata*, especialmente na concentração de 0,50%, formou-se uma espessa camada protetora sobre a área da lesão, semelhantemente a observada no grupo tratado com FITOSCAR®, porém apresentando-se de maneira mais pronunciada no grupo tratado com FABU. Como demonstrado na figura 21B, no dia 2, observou-se uma redução estaticamente significativa na área das feridas dos grupos tratados com FABU nas concentrações de 0,25% e 0,50% ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) quando comparado ao grupo Sham. Além disso, também foi observada redução significativa do tamanho da lesão no grupo tratado com FABU a 0,50% quando comparado ao grupo veículo e ao grupo tratado com o medicamento padrão ($p < 0,05$ em ambos os casos). A análise realizada 5 dias após a cirurgia, demonstrou que o grupo tratado com a fração acetato de etila de *B. unguolata* a 0,50% apresentou redução significativa da área inicial da lesão quando comparado ao grupo Sham ($p < 0.001$), ao grupo veículo ($p < 0.05$) e ao grupo tratado com FITOSCAR ($p < 0.001$). Estes dados sugerem uma relativa eficácia do tratamento com a fração de *B. unguolata* no modelo apresentado.

FIGURA 21: Avaliação macroscópica da progressão inicial da cicatrização de feridas cirúrgicas em camundongos C57BL/6 tratados topicamente com gel contendo fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata*.

A)



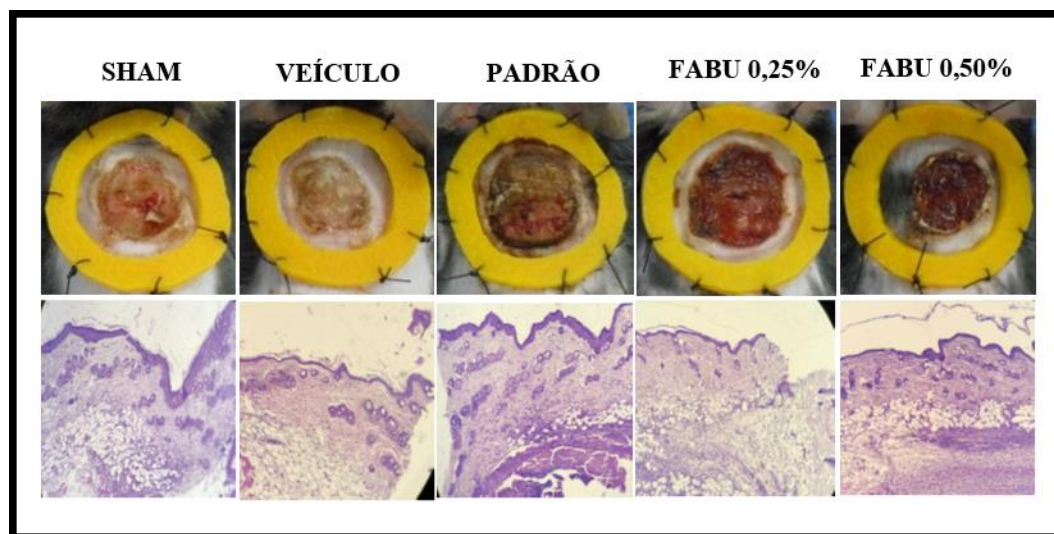
B)



Foi realizada a tricotomia do dorso do animal, assepsia da pele com etanol a 70% e, com o auxílio de um *punch* de biópsia de 8mm, uma ferida cirúrgica foi realizada em cada animal. Logo após a ferida, procedeu-se o tratamento das lesões, realizado uma vez ao dia, durante 5 dias. **(A):** Acompanhamento fotográfico das feridas durante os dias 0, 2 e 5, seguindo os estágios iniciais do processo de cicatrização. **(B):** Medida do fechamento da área da lesão. ^ap < 0,05 e ^bp < 0,001 vs o grupo Sham. ^cp < 0,05 vs o grupo de veículo. ^dp < 0,05 e ^ep < 0,001 vs o grupo padrão tratado com FITOSCAR[®]. Os resultados foram obtidos com a aplicação do teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Foi realizada também a análise histopatológica da região da ferida 5 dias após o procedimento cirúrgico (Figura 22). Os parâmetros avaliados nos cortes histológicos incluíram a presença de processo inflamatório com infiltrado de células leucocitárias e angiogênese. Em todos os grupos avaliados observou-se a presença de células polimorfonucleares e mononucleares, não sendo encontrada diferença significativa entre os grupos que receberam ou não os diferentes tratamentos. Todos grupos também apresentaram membrana fibrinogranulócita. Assim sendo, a análise histopatológica não evidenciou diferença significativa entre os diferentes grupos.

FIGURA 22: Avaliação macroscópica e histopatológica da lesão 5 dias após a cirurgia.



A análise histopatológica não evidenciou diferença significativa entre os grupos 5 dias após a cirurgia.

6. DISCUSSÃO

Macrófagos são células que desempenham importante papel na inflamação, produzindo várias moléculas pró-inflamatórias, como por exemplo, citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, em resposta à fagocitose ou ao estímulo por agentes indutores da resposta inflamatória, tal como o LPS (FORMAN; TORRES, 2001). Vários estudos demonstram que em condições patológicas, altas concentrações de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) podem ser responsáveis por danos ao DNA, proteínas e lipídios em virtude do estresse oxidativo, causando, por exemplo, danos à membrana fosfolipídica através da lipoperoxidação. Em virtude disso, os radicais livres gerados em altas quantidades podem sobrecarregar os sistemas de proteção endógeno contra agentes oxidantes, como a glutathiona reduzida (GSH), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). Dessa maneira, antioxidantes externos podem ajudar a contrabalancear essa produção aumentada de radicais livres e, dessa forma, retardar ou inibir os danos oxidativos causados por estas substâncias (KWAK *et al.*, 2015; UPADHYAY *et al.*, 2014).

Diversas pesquisas demonstraram que algumas plantas medicinais contêm altas concentrações de moléculas capazes de eliminar os radicais livres e, dessa forma, podem exercer importante propriedade antioxidante em várias doenças crônicas como a aterosclerose, o câncer e as doenças neurodegenerativas. Dentre essas moléculas destacam-se os compostos fenólicos, como os flavonoides e os taninos, cujo potencial antioxidante pode ser devido a uma ação direta sobre ERONs, eliminando os radicais livres por doar um elétron ou um átomo de hidrogênio a eles (SADEGHI *et al.*, 2015; UPADHYAY *et al.*, 2014).

No presente estudo foi avaliada, inicialmente, a atividade antioxidante da fração acetato de etila do caule de *Bauhinia unguolata* através do ensaio da capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio, onde foi observado que FABU mostrou-se mais eficiente em reduzir Mo (VI) para Mo (V) quando comparado ao controle BHT. Paula *et al.* (2014) realizaram um estudo para verificar o potencial antioxidante do extrato etanólico e das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila das folhas de *Bauhinia unguolata*, através do potencial de redução do radical DPPH, da redução do complexo fosfomolibdênio e da inibição da lipoperoxidação avaliada pelo método de TBARS. Por todos os métodos avaliados, a fração acetato de etila demonstrou a melhor atividade antioxidante, com resultados semelhantes aos padrões utilizados, onde os autores relacionaram aos flavonoides encontrados nesta fração à ação antioxidante exercida pela planta.

RAW 264.7 é uma linhagem celular de macrófagos murinos amplamente utilizada

para o estudo *in vitro* de potenciais substâncias anti-inflamatórias (JOO *et al.*, 2014). No presente trabalho, utilizando-se como modelo de avaliação do estresse oxidativo o método do H₂DCFDA, a fração acetato de etila do caule de *B. unguolata* apresentou efeitos significativos sobre a redução dos níveis de radicais livres induzidos pelo estímulo com LPS, demonstrado pela redução do sinal da fluorescência em todas as concentrações utilizadas, diminuindo assim, o acúmulo de EROs nas células pré-tratadas com a fração.

H₂DCFDA é um fluorocromo bastante utilizado para se avaliar o estresse oxidativo. Possui propriedade de ser permeável às membranas celulares e é hidrolisado no citosol para formar o ânion carboxilado H₂DCF. A oxidação deste composto intermediário resulta na formação do produto fluorescente diclorofluoresceína (DCF), que pode ser detectado por vários equipamentos, tais como citômetro de fluxo, microscópio de fluorescência, bem como leitoras de placas de fluorescência (KALYANARAMAN *et al.*, 2012). Embora alguns estudos utilizem H₂DCFDA para se mensurar especificamente H₂O₂, a oxidação de H₂DCF para DCF pode ser induzida por vários EROs, os quais incluem dióxido de nitrogênio e o radical hidroxila, por exemplo. Além disso, ânion superóxido pode ser convertido a peróxido de hidrogênio, pela ação da superóxido dismutase, e o H₂O₂ gerado pode contribuir para a amplificação do sinal de fluorescência de DCF (OPARKA *et al.*, 2016).

Além dos níveis de EROs, determinados pelo método de H₂DCFDA, foi realizada também a mensuração da concentração de peróxido de hidrogênio produzido após o tratamento com a fração, baseado no método descrito por Pick e Mizel (1981). De forma semelhante, foi demonstrado que o tratamento com FABU reduziu de maneira significativa os níveis desta molécula no sobrenadante da cultura. Peróxido de hidrogênio participa da imunidade inata e seu principal papel fisiológico é atribuído à sua capacidade de induzir a morte de patógenos dentro de fagócitos. As NADPH oxidases (NOX) são importantes enzimas responsáveis por desencadear a “explosão respiratória”, que leva à produção de radicais livres, mais especificamente à produção de ânion superóxido, em vários tipos de células, tais como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, bem como em células endoteliais, por exemplo. O ânion superóxido produzido por NOX é posteriormente convertido a H₂O₂ por um processo facilitado pela atividade catalítica da enzima superóxido dismutase. Dessa forma, o peróxido de hidrogênio formado participa sozinho ou em conjunto com o ácido hipocloroso, produzido pela enzima mieloperoxidase, para exercer funções microbicidas (WITTMANN *et al.*, 2012). Além disso, H₂O₂ parece também estar envolvido em vias de ativação da sinalização celular durante a inflamação, como a ativação do Fator Nuclear kappa B (NFκB) (XU *et al.*, 2016).

A ativação de macrófagos por LPS estimula a expressão da enzima óxido nítrico

sintase induzível (iNOS), que converte L-arginina em L-citrulina e óxido nítrico, contribuindo com a produção de radicais livres no microambiente inflamatório. O NO, produzido por iNOS, em conjunto com o ânion superóxido, produzido pelo complexo NADPH oxidase, reagem prontamente para produzir um potente agente oxidante biológico, o peroxinitrito, o qual em altas concentrações pode levar ao dano tecidual no local da inflamação, principalmente por sua ação indutora da lipoperoxidação (TAKAHASHI *et al.*, 2000).

Sayago *et al* (2013) avaliaram a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos hidroetanólicos de folhas secas e frescas de *Bauhinia variegata* em modelo de peroxidação lipídica, através da análise dos níveis de TBARS. Os autores encontraram que os dois tipos de extratos foram capazes de inibir significativamente a produção de TBARS induzida por Fe²⁺ em um modelo que utilizava homogenato de gema de ovo como substrato rico em fosfolípidios. Além disso, os autores também demonstraram que o extrato de folhas frescas de *Bauhinia variegata* foi capaz de inibir significativamente a peroxidação lipídica no modelo que utilizava homogenato de cérebro de camundongos. Neste sentido, os autores puderam correlacionar a elevada concentração de flavonoides presentes na planta com seu efeito inibitório contra a lipoperoxidação.

No presente trabalho, os resultados demonstraram que a fração de *B. unguolata* inibiu significativamente a formação de TBARS em macrófagos induzida por LPS em todas as concentrações testadas. Como a peroxidação lipídica está envolvida em várias doenças como aterosclerose, artrite reumatoide, câncer, doença de Alzheimer, bem como em várias outras desordens imunológicas com status inflamatório exacerbado, a pesquisa por compostos que inibam os efeitos deletérios dos radicais livres, prevenindo ou retardando a toxicidade provocada por eles, se faz importante. Nesse aspecto, diversos estudos têm buscado identificar agentes que possam interferir nas vias de sinalização celular envolvidas na peroxidação lipídica, no intuito de se obter novos alvos terapêuticos para essas doenças, limitando assim os efeitos deletérios dos radicais livres sobre as membranas biológicas (RAMANA *et al.*, 2017).

Os testes de avaliação da atividade antimicrobiana de FABU, não demonstraram ação contra as cepas de *MSSA* ATCC[®] 6538P, *MRSA* ATCC[®] 65398 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 9027 testadas pelo método de microdiluição em caldo, bem como também não foi observada atividade contra a cepa de *Candida albicans* ATCC[®] 22019, com CIMs estimadas maiores que 500 µg/mL. Paula *et al* (2015) estudaram a atividade antimicrobiana do extrato bruto das folhas de *Bauhinia unguolata* bem como de suas frações hexano, clorofórmio e acetato de etila frente as cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 5922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212. Os autores tampouco observaram atividade antimicrobiana

sobre as cepas analisadas, com CIMs maiores que 1000 µg/mL para o extrato bruto e maiores que 200 µg/mL para as frações, as quais foram também as maiores concentrações testadas.

O presente trabalho também avaliou os níveis das citocinas TNF- α , TGF- β e IL-10 no sobrenadante de cultura após o tratamento dos macrófagos com as diferentes concentrações da FABU por 24 horas, entretanto os resultados não demonstraram nenhum efeito significativo na produção dessas moléculas. Possivelmente, FABU exerce sua atividade biológica principalmente devido a suas características antioxidantes. Kim *et al.* (2008) avaliaram os efeitos de liquiritigenina, um dos flavonoides também presentes em FABU, na inibição de iNOS e de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos estimulados com LPS. Os pesquisadores demonstraram que nas concentrações testadas, as quais variaram entre 3, 10 e 30µM, o tratamento com liquiritigenina causou inibição da produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 pelos macrófagos, além de também inibir a expressão de iNOS. Tais propriedades são justificadas pelos autores pela ação que liquiritigenina exerce em inibir a ativação de NF- κ B em macrófagos, demonstrada também por eles no mesmo estudo. Embora também presente em FABU, a concentração de liquiritigenina na fração encontrava-se relativamente baixa nas condições testadas, o que poderia justificar não ter sido observada modulação significativa em TNF- α . Por exemplo, FABU a 62,5 µg/mL, utilizada nos nossos testes em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, continha concentração estimada de 0,086 µg/mL de liquiritigenina, se levarmos em consideração o cálculo do rendimento obtido pelo isolamento da substância a partir da massa inicial da fração.

Sabe-se que níveis exacerbados de citocinas pró-inflamatórias, principalmente nas fases iniciais do processo de cicatrização, têm sido correlacionados com um lento processo de regeneração tecidual, bem como com a cronicidade de feridas. Essa elevada concentração de mediadores inflamatórios na lesão, tais como enzimas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, podem por sua vez facilitar a manutenção do ambiente inflamatório e exacerbar o dano tecidual (NGUYEN *et al.*, 2017).

Neste contexto, alguns autores evidenciam que o processo de cicatrização de feridas poderia ser beneficiado pela utilização de flavonoides, por modularem as concentrações de radicais livres produzidos nos locais de lesão, em virtude dos eventos imunológicos relacionados à ativação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, por exemplo (GHOSH; GABA, 2013).

No modelo de ferida cirúrgica apresentado, nossos resultados demonstraram que o tratamento com a FABU, em ambas concentrações testadas, foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TBARS e, dessa maneira, a aplicação tópica de FABU parece

induzir um importante efeito antioxidante no local da lesão, inibindo a peroxidação lipídica. Elevados níveis de radicais livres podem induzir a lipoperoxidação tecidual. Com isso, os efeitos destrutivos da peroxidação lipídica sobre as membranas celulares parecem estar diretamente relacionadas a prejuízos na resposta desempenhada por células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos, por exemplo (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015). Esses achados corroboram diretamente com dados previamente encontrados nos testes *in vitro*, onde a mesma fração foi capaz de inibir a formação de TBARS no modelo de cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS, confirmando assim sua propriedade antioxidante.

Alguns autores sustentam que a cicatrização possa ser favorecida pela produção de citocinas pró-inflamatórias no local da lesão, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6, devido a suas propriedades de estimulação de queratinócitos, proliferação e quimiotaxia de fibroblastos, por exemplo. Entretanto, sabe-se também que a expressão destes mediadores inflamatórios deve ser devidamente regulada, pois elevação de seus níveis podem levar ao dano tecidual exacerbado, o que dificultaria o processo de cicatrização (WERNER; GROSE, 2003). Em nosso modelo, foi observado que o tratamento com a fração de *B. unguolata*, induziu redução significativa nos níveis da expressão relativa de TNF- α e IL-1 β na lesão, comparando-se ao grupo controle sem tratamento. Além disso, de forma similar, verificou-se também que o tratamento padrão com FITOSCAR reduziu de maneira significativa a expressão de IL-1 β . Alguns achados de que IL-1 β pode estar superexpressa em feridas que curam lentamente questionam sobre o papel positivo desta citocina no processo de cicatrização (GRAVES *et al.*, 2001). Dessa maneira, entende-se que é necessário um ambiente inflamatório bem regulado para que o processo de regeneração tecidual ocorra normalmente.

Embora não se tenha observado atividade imunomodulatória significativa sobre a produção de TNF- α no teste *in vitro* com macrófagos estimulados com LPS, após 24h de tratamento, no modelo de cicatrização *in vivo* observamos que FABU foi capaz de regular negativamente a expressão relativa dessa citocina. Extrapolando esse dado para uma realidade clínica, podemos inferir que a produção de TNF- α é requerida em um primeiro momento da inflamação, porém no decorrer do processo de regeneração tecidual, se faz necessária a regulação de sua síntese.

Ergene Öz *et al.* (2018) relatam que medicamentos que possuem atividades anti-inflamatórias e antioxidantes podem contribuir com o processo de cicatrização tecidual. Dessa forma, o presente estudo focou em demonstrar os efeitos do gel contendo FABU em um modelo de ferida cirúrgica, principalmente através da capacidade da fração em modular o estresse oxidativo e o ambiente inflamatório nas fases iniciais do processo de cicatrização, de forma a

complementar os achados encontrados nos estudos *in vitro*.

Segundo BISWAS *et al.* (2017) o processo ideal de cicatrização poderia ser caracterizado pelo fechamento bem-sucedido da área lesionada, em um curto espaço de tempo, associado também com ausência de efeitos colaterais. Nosso modelo de avaliação do fechamento da área da lesão focou principalmente nos primeiros dias após a cirurgia, buscando observar os efeitos da FABU em acelerar a redução da área inicial da ferida em associação com sua atividade regulatória sobre os mediadores inflamatórios produzidos nesta fase. O estudo demonstrou que o tratamento com a fração de *B. unguolata* acelerou significativamente o fechamento da ferida durante o período avaliado, sendo a concentração de 0,5% mais efetiva. O grupo tratado com esta formulação foi capaz de reduzir de forma significativa a área da lesão quando comparado aos grupos sham, controle veículo e tratamento padrão, nos dias 2 e 5, conforme apresentado. Além disso, vale destacar, que a ação de FABU foi avaliada em um modelo de ferida com *splint*, em que um anel de silicone foi aderido à pele ao redor da lesão e, dessa forma, como relatam alguns autores, impede-se que o fechamento da ferida seja decorrente da contração da pele, permitindo que as feridas curem através da granulação e re-epitelização, semelhantemente ao que ocorre em humanos (WANG *et al.*, 2013).

O acompanhamento macroscópico das lesões evidenciou a formação de uma camada protetora (crosta) mais espessa na região da ferida nos animais que receberam o tratamento com a fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata*. Sabe-se que no contexto de cicatrização de feridas, alguns compostos fenólicos, principalmente taninos, possuem a capacidade de precipitar proteínas, e com isso ocorre a formação de um complexo de baixa solubilidade em água, o qual se forma e acumula sobre a área lesionada, criando uma camada protetora contra agentes nocivos e inibindo a formação de exsudato, promovendo assim o reparo tecidual (HERNANDES *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2013). Esta característica é comumente observada, quando se trata feridas com *Stryphnodendron adstringens*. Além dessa propriedade biológica alguns estudos têm também relatado benefícios de *S. adstringens* sobre a proliferação de queratinócitos, a migração celular e produção de colágeno em feridas (HERNANDES *et al.*, 2010).

No presente estudo foi avaliado o efeito cicatrizante de um gel contendo a fração de *Bauhinia unguolata* sobre ferida cirúrgica, avaliando as primeiras etapas do processo de cicatrização. Vários estudos demonstram que o tratamento de feridas em um ambiente úmido é um fator promotor da re-epitelização, facilitando assim o processo de cicatrização, em comparação a um ambiente seco. Além disso, é observado que a reação inflamatória é reduzida com esse tipo de tratamento, limitando assim a progressão da lesão (JUNKER *et al.*, 2013).

Sabe-se que géis possuem a característica de manter a umectação na região da ferida e, dessa maneira, promover a aceleração do processo de regeneração tecidual (KAMOUN *et al.*, 2017). Tal característica pode ter contribuído com um ambiente mais favorável a uma melhor resolução das lesões, observado através do tratamento com formulação contendo FABU, além disso, as propriedades modulatórias de FABU sobre a peroxidação lipídica e sobre a expressão gênica de marcadores inflamatórios, parecem ter sido essenciais para o resultado obtido.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste sentido, os dados apresentados pelo presente estudo demonstraram a significativa atividade da fração acetato de etila do extrato etanólico do caule de *Bauhinia unguolata* (FABU) sobre a modulação das EROs e ERNs em macrófagos estimulados com LPS, reduzindo os níveis destes compostos, bem como prevenindo a lipoperoxidação. Além disso, em modelo de ferida cutânea em camundongos, gel de carbopol contendo FABU apresentou importante atividade ao modular significativamente a fase inflamatória do processo de cicatrização, reduzindo os níveis de peroxidação lipídica na área lesionada, bem como regulando a expressão gênica das citocinas TNF- α e IL-1 β , modulando a resposta inflamatória, através da regulação dos níveis de mediadores pró-inflamatórios no local da injúria. Ademais, a fração também foi capaz de acelerar significativamente o fechamento da área lesionada durante o período estudado. Em modelo experimental para a avaliação da taxa de migração celular, FABU mostrou-se eficaz em reduzir, de forma significativa, a área da fenda promovida nos poços contendo células epiteliais humanas A549. Esses resultados sugerem uma nova aplicabilidade farmacológica de compostos oriundos de *Bauhinia unguolata*, entretanto mais estudos são necessários para investigar por quais mecanismos de ação a FABU exerce seus efeitos biológicos.

Dessa maneira, os resultados obtidos neste estudo apontam o promissor potencial de FABU como um complexo antioxidante natural que pode interferir na cascata de dano celular provocada por EROs e ERNs, nesse aspecto, outros estudos também são necessários para avaliar seu potencial benefício em modelos de doenças crônicas associadas com resposta inflamatória exacerbada.

8. CONCLUSÃO

A avaliação da capacidade antioxidante total da fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* demonstrou elevado índice de atividade antioxidante através da redução do complexo de fosfomolibdênio, onde foi observado que a fração apresentou atividade superior ao controle hidroxitolueno butilado utilizado no teste.

No modelo de cultura celular, através da utilização de macrófagos estimulados com LPS, notou-se redução significativa da quantidade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio mensuradas. Demonstrou-se que o tratamento com FABU promoveu redução nos níveis de radicais livres presentes nas células, revelado pelo método que utilizou diacetato de diclorofluoresceína, bem como reduziu também as concentrações de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. Além disso, observou-se que a fração inibiu a peroxidação lipídica, através da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Com base na mensuração dos níveis de TNF- α , TGF- β e IL-10 no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com LPS, o tratamento com FABU não apresentou atividade imunomodulatória significativa sobre estas citocinas no modelo testado.

Nenhuma atividade antimicrobiana contra as cepas testadas de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* sensível e resistente a meticilina e *Pseudomonas aeruginosa* foi observada no tratamento com a fração acetato de etila de *Bauhinia unguolata* nas condições testadas.

Os efeitos da FABU sobre o processo de migração celular, utilizando-se células epiteliais A549, demonstrou que a fração acelerou significativamente a redução da área da lesão promovida nos poços contendo as células, o que sugere que FABU poderia facilitar a migração celular pelo modelo avaliado.

O tratamento tópico com o gel contendo 0,5% de FABU não promoveu qualquer sinal de irritabilidade no local da aplicação na pele íntegra em comparação ao grupo que não recebeu tratamento.

No modelo de ferida cirúrgica estabelecido para avaliar os efeitos benéficos de FABU nas etapas iniciais da cicatrização, por meio de seu potencial antioxidante, demonstrou-se que o tratamento tópico com a formulação contendo a fração foi eficaz em reduzir significativamente o nível de peroxidação lipídica nas lesões, complementando os achados antioxidantes *in vitro* e demonstrando que a fração pode contribuir com a redução do dano celular promovido pelas espécies reativas de oxigênio no modelo apresentado.

Observou-se também que a FABU promoveu redução significativa nos níveis da

expressão gênica relativa de IL-1 β e TNF- α na região da ferida, contribuindo significativamente para a manutenção de um ambiente inflamatório regulado, evitando a presença de elevadas concentrações dessas citocinas pró-inflamatórias no microambiente.

A análise do acompanhamento fotográfico do fechamento da área inicial da ferida demonstrou que o grupo tratado com a fração aceto de etila de *Bauhinia unguolata* apresentou redução significativa no tamanho da lesão, no período avaliado, quando comparado aos outros grupos, sugerindo que a fração seja eficaz em promover a aceleração do processo de regeneração tecidual pelo modelo estudado.

A análise histopatológica das lesões não demonstrou diferença significativa nos achados microscópicos dos tecidos cutâneos entre os grupos estudados.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S.J. *et al.* Study of comparison of antimicrobial potencies of *Bauhinia variegata* leave extracts with antibiotics against selected bacteria. **IOSR J Pharm Biol Sci**, v. 4, n. 3, p. 44-46, 2012.
- ALFADDA, A. A.; SALLAM, R. M. Reactive oxygen species in health and disease. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 1-14, 2012.
- AMBIKA, A.P.; NAIR, S.N. Wound Healing Activity of Plants from the Convolvulaceae Family. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 8, n. 1, p. 28-37, 2019.
- AMBRIZ-PÉREZ, D.L. *et al.* Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 2016.
- AMEERAMJA, J. *et al.* Tamarind seed coat ameliorates fluoride induced cytotoxicity, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis in A549 cells. **J Hazard Mater**, v. 301, p. 554-565, 2016.
- ANANTH, K. V. *et al.* Evaluation of Wound Healing Potential of *Bauhinia purpurea* Leaf Extracts in Rats. **Indian J Pharm Sci**, v. 72, n. 1, p. 122-7, 2010.
- ARAÚJO, L. U. *et al.* In vivo wound healing effects of *Symphytum officinale* L. leaves extract in different topical formulations. **Pharmazie**, v. 67, p. 355–360, 2012.
- ARULSELVAN, P. *et al.* Anti-Inflammatory Potential of Ethyl Acetate Fraction of *Moringa oleifera* in Downregulating the NF- κ B Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages. **Molecules**, v. 21, n. 11. p. 1-13, 2016.
- ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annu Rev Ecol Evol Syst**, v. 43, n. 1, p. 385-406, 2012

BALLABEN, A.S.; CRISCI, A.R.; JORGE, M.H.S. Efeito da pomada de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Martius) associado ao ultrassom de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. **Revista Uniara**, v.16, n.1, p. 159 – 172, 2013.

BARTHEL, R.; ABERDAM, D. Epidermal stem cells. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 19, n. 4, p. 405-13, 2005.

BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatol Surg**, v. 31, n. 6, p. 674-86, 2005.

BEANES, S. R. *et al.* Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. **Expert Rev Mol Med**, v. 5, n. 8, p. 1-22, Mar 2003.

BISWAS, T. K. *et al.* Evaluation of *Cynodon dactylon* for wound healing activity. **J Ethnopharmacol**, v. 197, p. 128-137, Feb 2017.

BUDOVSKY, A.; YARMOLINSKY, L.; BEN-SHABAT, S. Effect of medicinal plants on wound healing. **Wound Repair Regen**, v. 23, n. 2, p. 171-83, 2015.

CARVALHO, J.C.T. *et al.* Anti-inflammatory and Analgesic Activities of the Crude Extracts from Stem Bark of *Bauhinia Guianensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n. 4, 281-284, 1999.

CAMPOS, J. K. L. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. **Biochim Open**, v. 2, p. 62-68, Jun 2016.

CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. **Phytother Res**, v. 23, n. 10, p. 1347-54, 2009.

CHABY, G. *et al.* Dressings for acute and chronic wounds: a systematic review. **Arch Dermatol**, v. 143, n. 10, p. 1297-304, 2007.

COSTA, E.M.M.B., *et al.* Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2010

COSTIN, G. E.; HEARING, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **FASEB J**, v. 21, n. 4, p. 976-94, Apr 2007.

CLINTON, A.; CARTER, T. Chronic Wound Biofilms: Pathogenesis and Potential Therapies. **Lab Med**, v. 46, n. 4, p. 277-84, 2015.

CLSI. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Approved Standard M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CLSI. 2015. Reference Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

DE SOUSA, L. M. *et al.* New Cytotoxic Bibenzyl and Other Constituents from *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae). **Chem Biodivers**, v. 13, n. 12, p. 1630-1635, 2016.

DONG, L. *et al.* Anti-inflammatory effects of ononin on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Mol Immunol**, v. 83, p. 46-51, 2017.

DORAI, A. A. Wound care with traditional, complementary and alternative medicine. **Indian J Plast Surg**, v. 45, n. 2, p. 418-24, 2012.

DZIAŁO, M. *et al.* The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 2, p. 160, 2016

ERGENE ÖZ, B. *et al.* Isoflavonoids as wound healing agents from *Ononidis Radix*. **J Ethnopharmacol**, v. 211, p. 384-393, 2018.

EZZAT, S. M.; CHOUCRY, M. A.; KANDIL, Z. A. Antibacterial, antioxidant, and topical anti-inflammatory activities of *Bergia ammannioides*: A wound-healing plant. **Pharm Biol**, v. 54, n. 2, p. 215-24, 2016.

FALANGA, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **Lancet**, v. 366, n. 9498, p. 1736-43, 2005.

FENG, G.; HAO, D.; CHAI, J. Processing of CXCL12 impedes the recruitment of endothelial progenitor cells in diabetic wound healing. **FEBS J**, v. 281, n. 22, p. 5054-62, 2014.

FONDER, M. A. *et al.* Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **J Am Acad Dermatol**, v. 58, n. 2, p. 185-206, 2008.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Mol Aspects Med**, v. 22, n. 4-5, p. 189-216, 2001.

FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 3, p. 199-209, 2002.

FUKATA, M.; VAMADEVAN, A. S.; ABREU, M. T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Semin Immunol**, v. 21, n. 4, p. 242-53, 2009

GALVÃO, M. A. M. *et al.* Evaluation of the Folin-Ciocalteu Method and Quantification of Total Tannins in Stem Barks and Pods from *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) L. P. Queiroz. **Braz Arch Biol Technol**, v. 61, e18170586, 2018.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Clin Plast Surg**, v. 39, n. 1, p. 85-97, Jan 2012.

GARY SIBBALD, R.; WOO, K. Y. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 24 Suppl 1, p. S25-30, 2008 May-Jun 2008.

GAUR, M.; DOBKE, M.; LUNYAK, V. V. Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue in Clinical Applications for Dermatological Indications and Skin Aging. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 1, 2017.

GEETHALAKSHMI, R. *et al.* Evaluation of antioxidant and wound healing potentials of *Sphaeranthus amaranthoides* Burm.f. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

GOLDBERG, S. R.; DIEGELMANN, R. F. Wound healing primer. **Surg Clin North Am**, v. 90, n. 6, p. 1133-46, 2010.

GHOSH, P. K.; GABA, A. Phyto-extracts in wound healing. **J Pharm Pharm Sci**, v. 16, n. 5, p. 760-820, 2013.

GRAVES, D. T. *et al.* IL-1 plays a critical role in oral, but not dermal, wound healing. **J Immunol**, v. 167, n. 9, p. 5316-20, Nov 2001.

GUPTA, M. *et al.* Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models. **J Ethnopharmacol**, v. 98, n. 3, p. 267-273, 2005

GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-21, 2008.

HAN, F.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Adv Ther**, v. 34, n. 3, p. 599-610, 2017

HERNANDES, L. *et al.* Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. **Braz J Pharm Sci**, v. 46, n. 3, p. 431-436, 2010.

HONRADO, C. P.; MURAKAMI, C. S. Wound healing and physiology of skin flaps. **Facial Plast Surg Clin North Am**, v. 13, n. 2, p. 203-14, 2005.

HUSSAIN, T. *et al.* Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

JAITLEY, S.; SARASWATHI, T. Pathophysiology of Langerhans cells. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 16, n. 2, p. 239-44, 2012.

JETTEN, N. *et al.* Wound administration of M2-polarized macrophages does not improve murine cutaneous healing responses. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102994, 2014.

JIA, Y.; ZHAO, G.; JIA, J. Preliminary evaluation: The effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. **J Ethnopharmacol**, v. 120, p. 181–189, 2008.

JIAN, J. *et al.* The Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Activities of the *Bauhinia Championii* Flavone are Connected with Protection Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. **Cell Physiol Biochem**, v. 38, n. 4, p. 1365-75, 2016.

JOO, T. *et al.* Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L. **Saudi J Biol Sci**, v. 21, n. 5, p. 427-35, 2014.

JUNKER, J. P. *et al.* Clinical Impact Upon Wound Healing and Inflammation in Moist, Wet, and Dry Environments. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 2, n. 7, p. 348-356, Sep 2013.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J.C. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KALYANARAMAN, B. *et al.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 1, p. 1-6, 2012.

KAMOUN, E. A.; KENAWY, E. S.; CHEN, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **J Adv Res**, v. 8, n. 3, p. 217-233, 2017.

KIM, Y. W. *et al.* Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 1, p. 165-73, 2008.

KUMAR *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, p. 1015-1024, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Basic Pathology**. 9 ed. Philadelphia, PA. Elsevier Saunders, 2013, p. 30

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **Scientific World Journal**, v. 2013, p. 162750, 2013.

KWAK, C. S. *et al.* Antioxidant activity and anti-inflammatory activity of ethanol extract and fractions of Doenjang in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Nutr Res Pract**, v. 9, n. 6, p. 569-78, 2015.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A.M. Cicatrização de Feridas. **Revista da SPDV**, v. 69, n. 3, p. 355 – 367, 2011.

LINO, C. E. S. *et al.* Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biol Pharm Bull**, v. 27, n. 1, p. 125-7, 2004.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LODHI, S.; SINGHAI, A. K. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pac J Trop Med**, v. 6, n. 4, p. 253-9, 2013.

LONDERO, D.; LO GRECO, P. Automated high-performance liquid chromatographic separation with spectrofluorometric detection of a malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in plasma. **J Chromatogr A**, v. 729, n. 1-2, p. 207-10, 1996.

LUGRIN, J. *et al.* The role of oxidative stress during inflammatory processes. **Biol Chem**, v. 395, n. 2, p. 203-30, 2014.

MELO *et al.* Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Bot Bras**, v. 21, p. 27 – 36, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.

MELLOTT, A. J.; ZAMIEROWSKI, D. S.; ANDREWS, B. T. Negative Pressure Wound Therapy in Maxillofacial Applications. **Dent J (Basel)**, v. 4, n. 3, 2016.

MITTAL, M. *et al.* Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n.7, p. 1126-67, 2014.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. *et al.* *Annona muricata* leaves accelerate wound healing in rats via involvement of Hsp70 and antioxidant defence. **Int J Surg**, v. 18, p. 110-7, 2015.

MURPHY, P. S.; EVANS, G. R. Advances in wound healing: a review of current wound healing products. **Plast Surg Int**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

NAITO, R. *et al.* Edaravone, a free radical scavenger, accelerates wound healing in diabetic mice. **Wounds**, v. 26, n. 6, p. 163-171, 2014.

NETO, L. G. *et al.* Effect of the lectin of *Bauhinia variegata* and its recombinant isoform on surgically induced skin wounds in a murine model. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9298-315, 2011.

NETO M. M., *et al.* Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. **Biochem Syst Ecol**, v.36, p.227-9, 2008

NGUYEN, M. C. *et al.* Wound healing activity of *Streptocaulon juvenas* root ethanolic extract. **Wound Repair Regen**, v. 25, n. 6, p. 956-963, 2017.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, p. 351-358, 1979

OPARKA, M. *et al.* Quantifying ROS levels using CM-H. **Methods**, v. 109, p. 3-11, 2016.

ÖZAY, Y. *et al.* Wound Healing Effect of Kaempferol in Diabetic and Nondiabetic Rats. **J Surg Res**, v. 233, p. 284-296, 2019.

PAN S. Y., *et al.* New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 1-25, 2013.

PARENTE L. M. L., *et al.* Wound Healing and Anti-Inflammatory Effect in Animal Models of *Calendula officinalis* L. Growing in Brazil. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

PAULA C. S., *et al.* Potencial antioxidante in vitro das folhas da *Bauhinia unguolata* L. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 35, n. 2, p.217-22, 2014

PAULA C. S., *et al.* Estudo do potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia unguolata* L. sobre a divisão celular e atividade enzimática em plântulas de alface. **Rev Bras Pl Med**, v.17, n. 4, p. 577-584, 2015.

PAZYAR, N. *et al.* Skin wound healing and phytomedicine: a review. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 27, n. 6, p. 303-10, 2014.

PEREIRA, A.C.S.I *et al.* Atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* Link sobre *Herpetomonas samuelpeessoai* (Galvão.) **Rev bras plantas med**, v. 16, n. 3, p. 585-592, 2014

PÉREZ-SÁNCHEZ, A. *et al.* Nutraceuticals for Skin Care: A Comprehensive Review of Human Clinical Studies. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 1-22, 2018.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacogn Rev**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J Immunol Methods**, v. 46, n. 2, p. 211-26, 1981.

PINTO, S. C. *et al.* *Stryphnodendron adstringens*: Clarifying Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Planta Med**, v. 81, n. 12-13, p. 1090-1096, 2015.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem**, v. 269, n. 2, p. 337-41, 1999

RADHA, M.H.; LAXMIPRIYA, N.P. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: A systematic review. **J Tradit Complement Med**, v. 5, n. 1, p. 21-26, 2014.

RAMANA, K. V.; SRIVASTAVA, S.; SINGHAL, S. S. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease 2016. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2017, p. 1-2, 2017

RENDA, G. *et al.* Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various *Trifolium* L. extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients. **J Ethnopharmacol**, v. 148, n. 2, p. 423-32, 2013.

RIBEIRO, G. *et al.* Associação fitoterápica no tratamento de feridas cutâneas induzidas em equinos. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 65, n. 5, p. 1427-1433, 2013.

RIBEIRO *et al.* Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 155, n. 3, p. 1522-1533, 2014.

RODRIGUES *et al.* Tratamento de feridas excisionais de coelhos com extrato de barbatimão associado a células mononucleares autólogas da medula óssea. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 69, n. 5, p. 1243-1250, 2017.

SADEGHI, Z. *et al.* Antioxidant activity and total phenolic content of *Boerhavia elegans* (choisy) grown in Baluchestan, Iran. **Avicenna J Phytomed**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2015.

SARABAHI, S. Recent advances in topical wound care. **Indian J Plast Surg**, v. 45, n. 2, p. 379-87, 2012.

SARANDY, M. M. *et al.* Hydroethanolic Extract of *Strychnos pseudoquina* Accelerates Skin Wound Healing by Modulating the Oxidative Status and Microstructural Reorganization of Scar Tissue in Experimental Type I Diabetes. **Biomed Res Int**, v. 2017, p. 1-11, 2017.

SAROJA, M.; SANTHI, R.; ANNAPOORANI, S. Wound Healing Activity of Flavonoid fraction of *Cynodon dactylon* in swiss albino mice. **IRJP**, v. 3, n. 2, p. 230-231, 2012.

SARTORI, C. J.; CASTRO, A. H. F.; MORI, F. A. Teores de Fenóis Totais e Taninos nas Cascas de Angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina*). **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 3, p. 394-400, 2014.

SAYAGO, C. T. *et al.* Chemical composition and in vitro antioxidant activity of hydro-ethanolic extracts from *Bauhinia forficata* subsp. pruinosa and *B. variegata*. **Acta Biol Hung**, v. 64, n. 1, p. 21-33, 2013.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 8, p. 93-131, 2006.

SHAH, J. M. *et al.* Cellular events and biomarkers of wound healing. **Indian J Plast Surg**, v. 45, n. 2, p. 220-8, May 2012.

SILVA, F.F.A.; OLIVEIRA, L.A.G.; ARAÚJO, E.C. Uso de plantas medicinais pelos idosos em uma estratégia saúde da família. **Revenferm UFPE online**, v. 2, n. 1, p. 9-16, 2008

SILVA, F. R. *et al.* Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v. 83, n. 1-2, p. 33-7, Nov 2002

SILVA, K.L.; FILHO, V.C. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Quim Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

SIVAMANI, R. K. *et al.* Phytochemicals and Naturally Derived Substances for Wound Healing. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 1, n. 5, p. 213-217, 2012.

SONGARSA, S. *et al.* New racemosol derivatives as potent cyclooxygenase (COX) inhibitors. **Chem Biodivers**, v. 2, n. 12, p. 1635-1647, 2005.

SOUSA, F.C.F., *et al.* Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Rev bras farmacogn**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008

SOUSA, L. M. **Estudo químico e avaliação biológica de *Phanera glabra* (Jacq.) Vaz & *Bauhinia unguolata* L. (FABACEAE)**. 263f. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SZLISZKA, E. *et al.* Inhibition of inflammatory mediators by neobavaisoflavone in activated RAW264.7 macrophages. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3701-12, 2011.

TAKAHASHI, F. *et al.* Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW 264.7 cells. **IUBMB Life**, v. 49, n. 3, p. 217-21, 2000.

TANG, S. Y.; HALLIWELL, B. Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? **Biochem Biophys Res Commun**, v. 394, n. 1, p. 1-5, 2010.

TURABELIDZE, A.; GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. **Wound Repair Regen**, v. 18, n. 5, p. 460-6, 2010.

UPADHYAY, R. *et al.* Antioxidant property of aerial parts and root of *Phyllanthus fraternus* Webster, an important medicinal plant. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

VAZ, A. M. S. F.; TOZZI, A. M. G. A. *Bauhinia* ser. *Cansenia* (Leguminosae: Caesalpinioideae) no Brasil. **Rodriguésia**, v. 54, n. 83, p. 55-143, 2003.

WANG, X. *et al.* The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. **Nat Protoc**, v. 8, n. 2, p. 302-9, Feb 2013.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev**, v. 83, n. 3, p. 835-70, 2003.

WITTMANN, C. *et al.* Hydrogen peroxide in inflammation: messenger, guide, and assassin. **Adv Hematol**, v. 2012, p. 1-6, 2012

WOODLEY, D. T. Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis: Implications for Wound Healing. **Dermatol Clin**, v. 35, n. 1, p. 95-100, 2017.

XU, Q. *et al.* NADPH Oxidases Are Essential for Macrophage Differentiation. **J Biol Chem**, v. 291, n. 38, p. 20030-41, 09 2016.

YANG, G. *et al.* Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production by chloroform fraction of *Cudrania tricuspidata* in RAW 264.7 macrophages. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 250, 2012.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO *PHARMACOGNOSY JOURNAL*

Pharmacogn J. 2019; 11(1): 37-42

A Multifaceted Journal in the field of Natural Products and Pharmacognosy
www.phcogj.com | www.journalonweb.com/pj | www.phcog.net

Original Article

Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae) on LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells

Raphael de Oliveira Rodrigues^{1,*}, Juliana Navarro Ueda Yaochite¹, Milena Aguiar Braga¹, Amanda Ribeiro de Sousa¹, Greyce Luri Sasahara¹, Said Gonçalves da Cruz Fonseca², Thiago Dias de Vasconcelos Araújo², Gilvandete Maria Pinheiro Santiago², Leôncio Mesquita de Sousa³, Jarbas Lima de Carvalho³, Francisca Bruna Stefany Aires do Nascimento¹, Hélio Vitoriano Nobre Júnior¹, Aparecida Tiemi Nagao-Dias¹

Raphael de Oliveira Rodrigues^{1,*}, Juliana Navarro Ueda Yaochite¹, Milena Aguiar Braga¹, Amanda Ribeiro de Sousa¹, Greyce Luri Sasahara¹, Said Gonçalves da Cruz Fonseca², Thiago Dias de Vasconcelos Araújo², Gilvandete Maria Pinheiro Santiago², Leôncio Mesquita de Sousa³, Jarbas Lima de Carvalho³, Francisca Bruna Stefany Aires do Nascimento¹, Hélio Vitoriano Nobre Júnior¹, Aparecida Tiemi Nagao-Dias¹

¹Department of Clinical Analysis and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceará (UFC), Rua Capitão Francisco Pedro 1210, 60430-370 Fortaleza, CE, BRAZIL.

²Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceará (UFC), Rua Capitão Francisco Pedro 1210, 60430-370 Fortaleza, CE, BRAZIL.

³Department of Organic and Inorganic Chemistry, Sciences Center, Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici 12.200, 60021-940, Fortaleza, CE, BRAZIL.

Correspondence

Dr. Raphael de Oliveira Rodrigues

Laboratory of Immunology, Department Clinical Analysis and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceará, Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, CEP 60430-370 Fortaleza, Ceará, BRAZIL.

Phone no : 55-85-33668270

E-mail: raphaelolrodrigues@gmail.com

History

- Submission Date: 07-08-2018;
- Review completed: 21-09-2018;
- Accepted Date: 06-11-2018

DOI : 10.5530/pj.2019.1.7

Article Available online

<http://www.phcogj.com/v11/i1>

Copyright

© 2019 Phcog.Net. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



ABSTRACT

Objective: The present study aimed to investigate the antioxidant, immunomodulatory and antimicrobial activities of *Bauhinia unguolata* L. **Method:** A flavonoid-rich fraction was obtained from the *Bauhinia unguolata* L stem, called the ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* (FABU). The total antioxidant capacity of the FABU was determined through the phosphomolibdenum reduction method. For the evaluation of its antioxidant activity on a cell culture model, LPS-stimulated RAW 264.7 cells were treated with different concentrations of FABU and the reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), hydrogen peroxide (H₂O₂) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) production levels were measured. For the analysis of its immunomodulatory capacity, TNF- α , TGF- β and IL-10 levels were determined in the culture supernatant. In order to determinate the antimicrobial activity of FABU, antifungal and antibacterial susceptibility testing was performed against *Candida albicans*, methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Result:** The FABU demonstrated neither significant antimicrobial activity nor immunomodulatory capacity; on the other hand, its potential antioxidant activity was demonstrated by the phosphomolibdenum reduction assay. Also, FABU treatment inhibited the ROS, NO, H₂O₂ and TBARS levels in the supernatant of LPS-stimulated cells. **Conclusion:** A significant reduction in the amount of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) was observed, in addition to lipid peroxidation inhibition. Our data suggest that the FABU is a natural antioxidant complex that may interfere in the cascade of cell damage caused by free radicals and a promising potential drug in chronic disease models in which immunopathogenicity involves high levels of RONS.

Key words: *Bauhinia unguolata*; RAW 264.7 cells; Lipopolysaccharide; Free radicals; Antioxidant activity.

INTRODUCTION

The genus *Bauhinia* (family Fabaceae) is widely distributed worldwide and is frequently used in folk medicine-related practices. For instance, leaves, stems and roots are employed for the treatment of diabetes *mel-litus*, inflammatory processes, infections and pain.¹ *In vitro* and *in vivo* studies have suggested that the therapeutic properties of the plant are mostly due to the presence of flavonoids.²

Bauhinia unguolata L., a Brazilian native species, is popularly known as “pata-de-vaca”,³ and can be found in various regions of the country. The popular use of this plant in Brazil originates mainly from its hypoglycemic properties.⁴

Phytochemical analysis of leaves of *B. unguolata* L. revealed the presence of quercetin, quercetin arabinofuranoside, quercitrin and the alkaloids, harmaine

and eleanine.⁵ Several compounds of *B. unguolata* L. were isolated and identified, among them, bibenzyls, flavonoids, triterpenoids and oxepinic derivatives.⁶ Macrophages play an important role in inflammation, particularly through the phagocytosis of pathogens and production of inflammatory mediators.^{7,8} The cells interact through their pattern recognition receptors with pathogen-associated molecular patterns such as lipopolysaccharide (LPS) to initiate an inflammatory response.

After binding to the toll-like receptor 4, LPS induces the cell to produce several inflammatory mediators, including tumor necrosis (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and -6, prostaglandin (PG)E₂ in addition to free oxygen and nitrogen radicals (ROS and RNS, respectively).⁹ LPS-stimulated macrophages constitute

Cite this article: Rodrigues RO, Yaochite JNU, Braga MA, Sousa AR, Sasahara GL, Fonseca SGC, *et al.* Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae) on LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Pharmacogn J.* 2019;11(1):37-42.

an *in vitro* experimental model frequently used to evaluate anti-inflammatory activities of natural products.¹⁰

Oxidative stress may play an important role in the immunopathogenicity of some chronic inflammatory diseases, including neurodegenerative and cardiovascular diseases and cancer.¹¹ For this reason, polyphenolic substances such as flavonoids are gaining attention in research because of their antioxidant properties that occur via some mechanisms of action, including inhibition of pro-oxidant enzymes, ROS and RNS scavenging and increase in the production of antioxidant defenses.¹² The present study aimed to evaluate antioxidant, immunomodulatory and antimicrobial activities of *B. unguolata* L on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.

MATERIALS AND METHODS

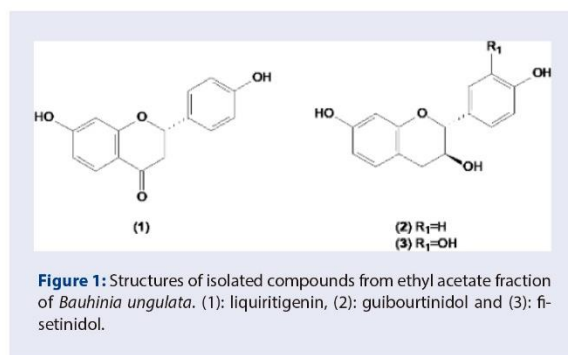
Plant material

Stem wood of *B. unguolata* was collected in Caucaia city, Ceará, Brazil. The identification was performed by Professor Edson P. Nunes, Department of Biology, Universidade Federal do Ceará. A voucher specimen has been deposited at the Herbarium Prisco Bezerra, Department of Biology (UFC) under number 54609.

Obtaining of fraction rich in flavonoids

The flavonoid-rich fraction was obtained as described elsewhere.⁶ Briefly, air-dried and finely powdered stem wood of *B. unguolata* (3.4 kg) was successively extracted with hexane and ethanol (4 x 10 L for each solvent) at room temperature for 48 h. The ethanol solution was concentrated under reduced pressure to yield the ethanol extract of *B. unguolata* (EEBU, 51.7 g). A portion of the EEBU (20.0 g) was suspended in H₂O and extracted with EtOAc (4 x 200 mL) to yield a dark residue (16 g), which was the called ethyl acetate fraction of *B. unguolata* (FABU).

For the phytochemical analysis of FABU, part of this fraction (4.78 g) was fractionated over silica gel (79.9g) by elution with CH₂Cl₂/MeOH (95/5, 9/1) and methanol to yield 75 fractions (30 mL each) that were subject to thin layer chromatography (TLC) analysis and then were pooled into 8 fractions (F1–F8). F3 (0.1404 g, CH₂Cl₂/MeOH (95/5) and F4 (0.2677 g, CH₂Cl₂) yielded liquiritigenin (1; 6.6 mg) and guibourtinidol (2; 24.5 mg), respectively, by silica gel chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (95/5) as eluent. F6 (2.0880 g, CH₂Cl₂/MeOH (9/1)) was subject to silica gel column chromatography and eluted with CH₂Cl₂/MeOH (9/1) to yield fisetinidol (3; 1.62 g). The molecular structures of the isolated compounds are presented in Figure 1 and were elucidated by spectroscopic analysis, using mainly 1D and 2D 1H- and 13C-NMR spectra and comparison with literature values.



Total antioxidant capacity

The total antioxidant capacity was evaluated based on molybdenium reduction,¹³ with modifications. The technique analyzed the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by antioxidant substances. This reaction resulted in the formation of a green colored compound at acidic pH. A 100 μ L aliquot of the test sample solution, dissolved in ethanol, was added to a polypropylene tube containing 1 mL of the reagent solution, which consisted of 0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate. The reaction mixture was incubated for 90 min at 95°C. After cooling at room temperature, optical densities were measured at 700 nm in a spectrophotometer. A calibration curve was obtained with the ethanolic solution of butylated hydroxytoluene (BHT) at 12.5 to 50.0 μ g/mL. The following equation was used:

$$A = 0.01C - 0.0118$$

$$r^2 = 0.998$$

Where, A is the absorbance obtained with the test sample and C is the concentration of BHT equivalents

The total antioxidant capacity of the fraction was expressed as BHT equivalents (mg of BHT equivalent per mg of fraction).

Antifungal Susceptibility Testing

The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of FABU against *Candida albicans* strain ATCC[®] 10231 was performed using the broth micro dilution method.¹⁴ Various concentrations of FABU were tested (0.9765–500 μ g/mL). The yeast inoculum was adjusted according to the 0.5 McFarland scale and diluted with RPMI 1640 culture medium (pH 7.0 \pm 0.1) and buffered with 0.165M morpholinopropane sulfonic acid (Sigma, USA) in order to obtain the final concentration of 2.5×10^3 CFU/mL. The microplates were incubated for 24 h at 35°C. The MIC was determined as the lowest concentration of the drug capable of inhibiting 50% growth of the microorganism compared to the control well.¹⁴

Antibacterial susceptibility testing

The MICs of the FABU against methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) ATCC[®] 6538P, methicillin-resistant *S. aureus* ATCC 65398 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 9027 were determined by using the broth micro dilution method, according to the protocol M07-A10.¹⁵ Various concentrations of FABU were tested (0.9765 – 500 μ g/mL). The bacterial inoculum was adjusted according to the 0.5 McFarland scale and diluted with calcium-adjusted Mueller-Hinton broth in order to obtain the final concentration of 5×10^5 CFU/mL. The microplates were incubated for 20 h for *P. aeruginosa* and 24 h for MSSA and MRSA at 35°C. The MIC was determined as the lowest concentration of the drug capable of completely inhibiting the growth of the microorganism compared to the control well by visual reading.¹⁵

Cell culture

RAW 264.7 cells obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Brazil) were cultured in cultured culture flasks containing high-glucose Dubecco's Modified Eagle's Medium (Gibco[®], USA), supplemented with 10% fetal bovine serum and gentamicin at 5 μ g/mL; and kept at 37°C and 5% CO₂.

Cell viability assay (MTT)

RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/well) were plated in 96 well tissue culture plates and incubated at 37°C and 5% CO₂ overnight. The cells were treated with various concentrations of the FABU (7.81–500 μ g/mL) and incubated for 24 h. Afterward, the supernatant was discarded and the adhering cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). Afterwards, DMEM medium supplemented with 500 μ g/mL of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT,

Sigma, USA) was added to the wells. After incubation for 4 h at 37 °C and 5% CO₂, the supernatant was discarded and 100 µL of 100% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, USA) were added in the wells in order to solubilize the formazan salt products. The plates were shaken vigorously for 15 min and the final solution was measured at 570 nm using a plate reader. The assays were performed in triplicate.

Detection of ROS using H₂DCFDA

RAW 264.7 cells were plated at 5 x 10⁵ cells/mL (200 µL/well) in 96-well plates and incubated overnight at 37°C and 5% CO₂. The cells were pretreated with various concentrations of the FABU (15.63–62.5 µg/mL) or controls (0.06% DMSO or 4 µM dexamethasone) for 1 h and then stimulated with 1 µg/mL of LPS for 24 h. Afterward, the culture supernatant was discarded and DMEM medium containing 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) was added at a concentration of 10 µM. After cleavage by intracellular esterases and ROS oxidation, the non-fluorescent form, H₂DCFDA, was converted to the highly fluorescent, 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) molecule. The cells were again incubated at 37°C and 5% CO₂ for 1 h and thereafter, the supernatant was discarded and cells washed twice with PBS. Fluorescence was measured at 485 and 535 nm excitation and emission, respectively, using a Synergy™ H1 plate reader (BioTek, USA).

Determination of hydrogen peroxide levels

For determination of hydrogen peroxide (H₂O₂),¹⁶ RAW 264.7 cells were plated at a density of 2 x 10⁶ cells/mL in 96-well plates and incubated at 37°C for 24 h. The medium was removed and cells were then pretreated with the FABU (15.63–62.5 µg/mL) or with the control agents for 1 h and then stimulated with 1 µg/mL LPS for 24 h. The cells were then washed twice with PBS and 100 µL of the phenol red reagent solution (140 mM NaCl, 10 mM potassium phosphate, pH 7.0, 5.5 mM dextrose, 0.56 mM phenol red and 0.01 mg/mL type II horseradish peroxidase [Sigma, USA]) was added and incubated for 1 h at 37°C. Afterward, 10 µL of the 1 N NaOH solution was added and the absorbance was read using a plate reader at 600 nm.

Activity of the ethyl acetate fraction on LPS-stimulated RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells plated at 5 x 10⁵ cells/well in 24-well plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ overnight. Subsequently, the cells were pretreated with various concentrations of FABU (15.63–62.5 µg/mL) or controls (0.06% DMSO or 4 µM dexamethasone) for 1 h and then stimulated with 1 µg/mL LPS for 24 h. After this time, the culture supernatant or cells were collected and kept at -80°C for nitrite and cytokine determination. The FABU at 62.5 µg/mL contained about 0.086 µg/mL of liquiritigenin, 0.32 µg/mL of guibourtinidol and 21.2 µg/mL of fisetinidol.

Nitrite determination

The nitrite dosage indicates macrophage-associated nitric oxide (NO) production. After stimulation of the RAW 264.7 cells with LPS, nitrite concentration in the supernatant was estimated.¹⁷ A volume of 100 µL of the supernatant was added to 150 µL Griess's reagent (1% sulfanilic acid in 5% H₃PO₄ and 0.1% N (1-naphthyl) ethylenediaminedihydrochloride). A standard curve was obtained using different concentrations of sodium nitrite (Sigma-Aldrich, USA).

Cytokine levels

An aliquot of 100 µL of the culture supernatant was collected for the measurement of TNF-α, TGF-β and IL-10 levels using a sandwich enzyme ELISA according to the manufacturer's recommendations (Novex®, Invitrogen, USA).

Lipid peroxidation determination

The action of free radicals on cell membrane unsaturated lipids results in the formation of lipid peroxidation products such as malondialdehyde

(MDA). The determination of MDA was done according to the following protocol¹⁸ in which RAW 264.7 cells were plated at a density of 5 x 10⁵ cells/well in 24-well plates and incubated. Cells pretreated with FABU (15.63–62.5 µg/mL) for 1 h were stimulated with LPS (1 µg/mL) for 12 h. Cells were re-suspended with the aid of a cell scraper and lysed with 3 cycles of freezing and ultrasonic bath treatment. After centrifugation at 13,000 x g for 10 min, 60 µL of perchloric acid was added to the supernatant and proteins were removed by centrifugation. A volume of 600 µL thiobarbituric acid (TBA) (in 0.5% acetic acid) was added into a reaction tube containing 200 µL of the final supernatant and incubated at 95°C for 60 min. Volumes corresponding to 300 µL of 1-butanol and 100 µL of 5M NaCl were added to the reaction tubes and centrifuged for 3 min at 16,000 x g. After centrifugation, the upper layer was incubated in a dry bath at 55°C until 1-butanol was totally evaporated. The resulting precipitate was re-suspended with 200 µL of ultra-pure water and transferred to a 96-well plate for spectrophotometric reading at 532 nm (Asys UVM 340, Biochrom, USA).¹⁹ The assay was performed in triplicate and the results were expressed in µM/mg protein. For the standard curve, MDA was obtained from the acid hydrolysis of 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France).

Statistical analysis

The results were expressed as mean ± standard error of the mean. For the analysis of the results, analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test was used as the method for multiple comparisons. All statistical analyzes were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Prism, USA) and *p* < 0.05 was considered as significant.

RESULTS

Antimicrobial activity

The MICs of FABU against MSSA, MRSA, *P. aeruginosa* and *C. albicans* were > 500 µg/mL (Tables 1 and 2), which represented low effectiveness of the fraction against these pathogens.

Total antioxidant capacity

The total antioxidant activity of the FABU was 1.70 mg equivalent of BHT per mg FABU, indicating that the antioxidant capacity performed per 1mg of FABU corresponded to the same activity as presented by 1.70mg BHT. The data demonstrated that the FABU presented more antioxidant capacity than the control.

Table 1: Evaluation of antibacterial activity of FABU against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Pseudomonas aeruginosa* strains.

Strains*	MIC ^b		
	MIC values (500 to 0.9765 µg/mL) ^c		
	ATCC ^a	ATCC ^a	ATCC ^a
	<i>P. aeruginosa</i>	MSSA	MRSA
Sample	#9027	#6538P	#65398
FABU	>500	>500	>500
Tween 80	>1,5%	>1,5%	>1,5%

*ATCC bacterial strain collection. ^bMIC was defined as the lowest concentration that completely inhibited bacterial growth after 24 h of incubation. ^cThe procedure was performed according to the CLSI protocol M07-A10, 2015. The range of compounds tested ranged from 500 to 0.9765 µg/mL of the fraction and from 1.5 to 0.0029% of Tween 80.

Table 2: Evaluation of antifungal effect of FABU against *Candida albicans*.

Strains ^a	MIC ^b
	MIC values (500 to 0.9765 µg/mL) ^c
Sample	ATCC [®] <i>C. albicans</i> #22019
FABU	>500
Tween 80	>1.5%

^aATCC yeast strain collection. ^bMIC was defined as the lowest concentration which reduced 50% the yeast growth after 24h incubation. ^cThe procedure was performed according to the CLSI protocol M27-A3, 2008. The concentration of the compounds ranged from 500 to 0.9765 µg/mL of the fraction and from 1.5 to 0.0029% of Tween 80.

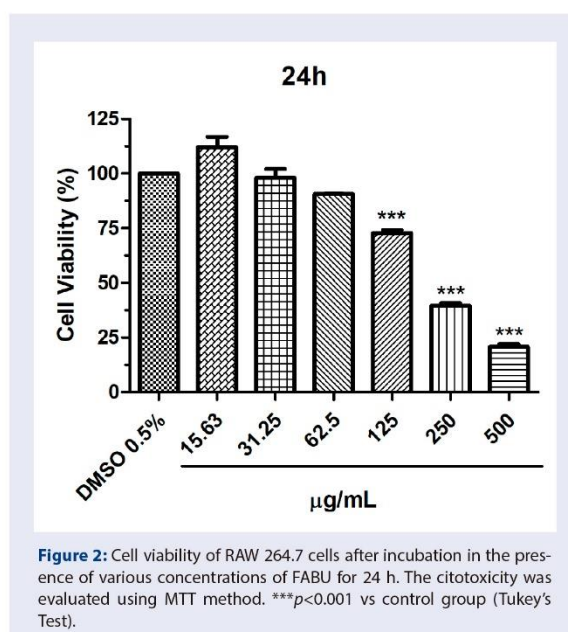


Figure 2: Cell viability of RAW 264.7 cells after incubation in the presence of various concentrations of FABU for 24 h. The cytotoxicity was evaluated using MTT method. *** $p < 0.001$ vs control group (Tukey's Test).

ROS and RNS cascades in RAW 264.7 macrophages

As the FABU was shown to be cytotoxic at levels ≥ 125 µg/mL (Figure 2), doses below this concentration were used in the assays. As observed in Figure 3A, FABU at 15.63, 31.25 and 62.5 µg/mL could significantly decrease ROS levels via the H_2DCFDA assay when compared to the LPS-stimulated group ($p < 0.01$ to 15.63 and 31.25 µg/mL, $p < 0.001$ for 62.5 µg/mL). Figure 3B shows that FABU doses of 31.25 and 62.5 µg/mL were able to inhibit NO production ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) in comparison to the untreated and LPS-stimulated group. Finally, the production of H_2O_2 by macrophages was decreased in a dose-dependent manner after treatment of LPS-stimulated cells with FABU at 31.25 and 62.5 µg/mL (Figure 3C, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). The data clearly demonstrate that FABU presents an effective antioxidant capacity by interfering with ROS and RNS cascades.

Lipid peroxidation

As seen in Figure 3D, MDA production was significantly reduced after cell treatment with the FABU at all tested concentrations ($p < 0.001$). The

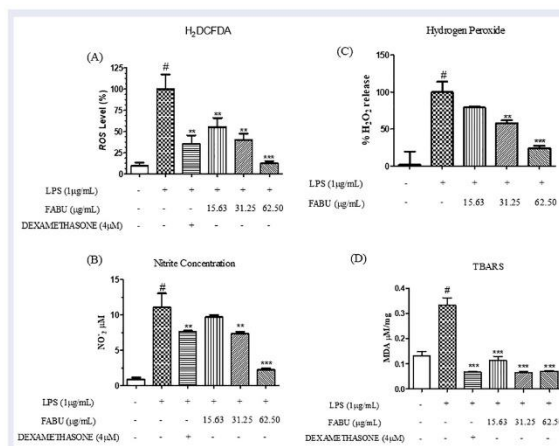


Figure 3: Antioxidant activity of *Bauhinia unguolata* L on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. (A) Inhibition of ROS generation. *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ vs LPS-stimulated cells group (Tukey's test); # $p < 0.001$ vs Control. (B) Inhibition of NO production. *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ vs LPS-stimulated cells group; # $p < 0.001$ vs Control. (C) Inhibition of hydrogen peroxide production. *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ vs LPS-stimulated cells group; # $p < 0.001$ vs Control. (D) Inhibition of TBARS generation. *** $p < 0.001$ vs LPS-stimulated cells group; # $p < 0.001$ vs Control.

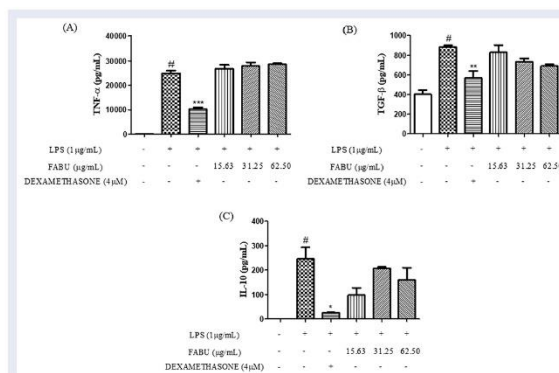


Figure 4: Immunomodulatory activity of *Bauhinia unguolata* L on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. (A) Inhibition of TNF- α secretion. *** $p < 0.001$ vs LPS-stimulated cells group (Tukey's test); # $p < 0.001$ vs Control. (B) Inhibition of TGF- β secretion. ** $p < 0.01$ vs LPS-stimulated cells group; # $p < 0.001$ vs Control. (C) Inhibition of IL-10 secretion. * $p < 0.05$ vs LPS-stimulated cells group; # $p < 0.01$ vs Control.

result indicates that FABU could effectively reduce cellular lipid peroxidation based on the MDA assay.

Cytokine quantification

Secretion of TNF- α , TGF- β and IL-10 levels were significantly increased in LPS-stimulated cells compared to unstimulated cells (Figure 4). However, FABU was not able to alter these cytokine levels at any tested concentration, suggesting that the fraction presented no significant immunomodulatory activity (Figure 4).

DISCUSSION

Several studies have shown that high concentrations of ROS and RNS may be responsible for causing damage to DNA, proteins and lipids during an oxidative stress-related process such as lipid peroxidation of membrane phospholipids. Moreover, high amounts of free radicals may overload the endogenous protection system, affecting the anti-oxidant activities exerted by glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), among others. As an alternative, external source of antioxidants can delay or inhibit the oxidative damage.^{20,21}

Various authors have demonstrated that some medicinal plants contain high concentrations of free radical scavenging molecules. Among these molecules, phenolic compounds such as flavonoids and tannins, present potential antioxidant activity and act directly on ROS and RNS by neutralizing them or inhibiting their production.^{21,22}

In the present study, it was demonstrated that FABU presented antioxidant activity, acting more efficiently in reducing Mo (VI) to Mo (V) than the BHT control. In addition, Paula et al.³ demonstrated that the ethanolic extract and hexane, chloroform and ethyl acetate fractions from *B. unguolata* leaves also presented antioxidant activity. Flavonoids are recognized as antioxidant agents and the phytochemical investigation of FABU led to the isolation of the compounds identified as liquiritigenin (1), guibourtinidol (2) and fisetinidol (3).⁶ These flavonoids presented antioxidant activity, according to Gai et al.²³ Sobeh et al.²⁴ and Imai et al.²⁵

In the model of oxidative stress evaluation by the method of H₂DCFDA, FABU was shown to inhibit ROS production by LPS-stimulated cells. Although some studies use H₂DCFDA to specifically measure H₂O₂, oxidation of H₂DCF to DCF can be induced by various ROS, including hydroxyl and nitrogen dioxide. In addition, superoxide anions can be converted to hydrogen peroxide by the action of superoxide dismutase. Also, H₂O₂ can contribute to the amplification of the DCF signal.²⁶ H₂O₂ concentrations were also measured using the method described by Pick and Mizel.¹⁶ We also demonstrated lower H₂O₂ levels in supernatants from LPS-stimulated RAW 264.7 cells after treatment with FABU.

LPS-stimulated macrophages also activate inducible enzyme nitric oxide synthase (iNOS), which converts L-arginine to nitric oxide and L-citrulline and contributes to formation of another free radical, nitric oxide, which reacts with superoxide anion producing a potent biological oxidizing agent, peroxynitrite. High concentrations of peroxynitrite can lead to tissue damage, mainly by lipid peroxidation.²⁷ In our study, NO levels in the culture supernatant from LPS-stimulated cells was significantly reduced after treatment with FABU at 31.25 and 62.5 µg/mL. We have also tested the antioxidant activity of fisetinidol, a major constituent found in FABU (33.89%). We observed that fisetinidol at 3.125, 6.25 and 12.50 µg/mL was not as effective as FABU in reducing NO levels (data not shown). Concentrations ≥25.0 µg/mL of fisetinidol were not tested because they were cytotoxic to macrophages. Finally, our data suggest that the antioxidant activity exerted by FABU may be attributed to the synergist effect promoted by the various components of the fraction.

Sayago et al.²⁸ demonstrated that extracts from dried and fresh *B. variegata* leaves were capable of significantly inhibiting Fe²⁺-induced TBARS production in a model using egg yolk homogenate as a phospholipid-rich substrate. However, only the fresh leaf extract was able to significantly inhibit lipid peroxidation in a model using mouse brain homogenates. In our study, the results demonstrated that thiobarbituric acid reactive substance formation by LPS-stimulated cells was significantly inhibited after treatment with FABU. Since lipid peroxidation is involved in various diseases such as atherosclerosis, rheumatoid arthritis, cancer, Alzheimer's disease in addition to several other immunological disorders, the search for compounds that inhibit oxidative stress is crucial.

In vivo studies are necessary to confirm the antioxidant capacity of *B. unguolata*.

In respect to the antimicrobial activity, the MICs of the FABU against MSSA ATCC[®] 6538P, MRSA ATCC[®] 65398 and *P. aeruginosa* ATCC[®] 9027 and *C. albicans* strain ATCC[®] 22019 were >500 µg/mL. Paula et al.²⁹ previously demonstrated that the MICs of the crude extract of leaves of the same plant species against strains of *S. aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 5922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 were >1000 µg/mL and of hexane, chloroform, ethyl acetate and residual hydroalcohol fractions were >200 µg/mL. The data suggest that the species probably does not present good antimicrobial activity.

CONCLUSION

Our results demonstrated that the ethyl acetate fraction of the *B. unguolata* stem wood presented antioxidant activity, demonstrated in the phosphomolybdenum model in addition to a cell culture model using LPS-stimulated macrophages. In such a model, a significant decrease in the amount of reactive oxygen and nitrogen species was observed in addition to lipid peroxidation inhibition. Based on the measurement of TNF-α, TGF-β and IL-10 levels in supernatants from LPS-stimulated cells after treatment with FABU, the extract did not present any significant immunomodulatory activity. In conclusion, FABU is a natural antioxidant complex that may interfere in the cascade of cell damage caused by free radicals. Further studies are needed to demonstrate its beneficial effects using *in vivo* models.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Professor Alexandre Havt Bindá, Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal do Ceará, for allowing the use of the fluorescence plate reader.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ABBREVIATIONS

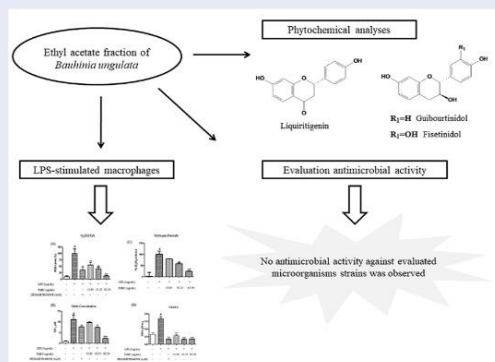
FABU: Ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata*; LPS: Lipopolysaccharide; ROS: Reactive oxygen species; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances.

REFERENCES

- Silva KL, Filho VC. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. Quim Nova. 2002;25(3):449-54.
- Cechinel FV. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. Phytother Res. 2009;23(10):1347-54.
- Paula CS, Canteli VCD, Hirora BCK, Campos R, Oliveira, VB, Kalegari M, et al. Potencial antioxidante *in vitro* das folhas da *Bauhinia unguolata* L. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2014;35(2):217-22.
- Paula CS, Canteli VCD, Silva CB, Miguel OG, Miguel MD. Estudo do potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia unguolata* L. sobre a divisão celular e atividade enzimática em plântulas de alface. Rev Bras Pl Med. 2015;17(4):577-84.
- Neto MM, Neto MA, Braz FR, Lima MAS, Silveira ER. Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. Biochem Syst Ecol. 2008;36(3):227-9.
- DeSousa LM, DeCarvalho JL, DaSilva HC, Lemos TL, Arriaga AM, Braz-Filho R, et al. New Cytotoxic Bibenzyl and Other Constituents from *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae) L. (Fabaceae). Chem Biodivers. 2016;13(12):1630-5.
- Arulselvan P, Tan WS, Gothai S, Muniandy K, Fakurazi S, Esa NM, et al. Anti-inflammatory potential of ethyl acetate fraction of moringaoleifera in down regulating the NF-kappaB signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Molecules. 2016;21(11):1452-65.
- Szliszka E, Skaba D, Czuba ZP, Krol W. Inhibition of inflammatory mediators by neobavaisoflavone in activated RAW264.7 macrophages. Molecules. 2016;16(5):3701-12.
- Yang G, Lee K, Lee M, Ham I, Choi HY. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production by chloroform fraction of *Cudrania*

- tricuspidata* in RAW 264.7 macrophages. BMC Complement Altern Med. 2012;12(1):250.
- Dong L, Yin L, Zhang Y, Fu X, Lu J. Anti-inflammatory effects of ononin on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. Mol Immunol. 2017;83:46-51.
 - Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked?. Free Radic Biol Med. 2010;49(11):1603-16.
 - Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016(7432797):1-9.
 - Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Anal Biochem. 1999;269(2):337-41.
 - CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Approved Standard M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008;28.
 - CLSI. Reference Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2015.
 - Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. J Immunol Methods. 1981;46(2):211-26.
 - Hwang JH, Lim SB. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Broccoli Florets in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. Prev Nutr Food Sci. 2014;19(2):89-97.
 - Londero D, LoGreco P. Automated high-performance liquid chromatographic separation with spectrofluorometric detection of a malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in plasma. J Chromatogr A. 1996;729(1-2):207-10.
 - Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979;95(2):351-8.
 - Kwak CS, Son D, Chung YS, Kwon YH. Antioxidant activity and anti-inflammatory activity of ethanol extract and fractions of *Doenjang* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Nutr Res Pract. 2015;9(6):569-78.
 - Upadhyay R, Chaurasia JK, Tiwari KN, Singh K. Antioxidant Property of Aerial Parts and Root of *Phyllanthus fraternus* Webster, an Important Medicinal Plant. The Scientific World Journal. 2014;2014(692392):1-7.
 - Sadeghi Z, Valizadeh J, Shermeh OA, Akaberi M. Antioxidant activity and total phenolic content of *Boerhaviaealegans* (choisy) grown in Baluchestan, Iran. Avicenna J Phytomed. 2015;5(1):1-9.
 - Gai QY, Jiao J, Luo M, Wei ZF, Zu YG, Ma W, *et al.* Establishment of hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Isatis tinctoria* L. for the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities. PLoS One. 2015;10(3):e0119022.
 - Sobeh M, Mansour MF, Abdelfattah MAO, Cheng H, El-Shazly AM, Wink M. A proanthocyanidin-rich extract from *Cassia abbreviata* exhibits antioxidant and hepatoprotective activities *in vivo*. J Ethnopharmacol. 2018;213:38-47.
 - Imai T, Inoue S, Ohdaira N, Matsushita Y, Suzuki R, Sakurai M, *et al.* Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril* and *Astronium leucointei* and their antioxidant activities. J Wood Sci. 2008;54(6):470-5.
 - Oparka M, Walczak J, Malinska D, Van OLMPE, Szczepanowska J, Koopman WJH. Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. Methods. 2016;109:3-11.
 - Takahashi F, Takahashi K, Maeda K, Tominaga S, Fukuchi Y. Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW 264.7 cells. IUBMB Life. 2000;49(3):217-21.
 - Sayago CT, Camargo VB, Barbosa F, Gularte C, Pereira G, Miotto S, *et al.* Chemical composition and *in vitro* antioxidant activity of hydro-ethanolic extracts from *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* and *B. variegata*. Acta Biol Hung. 2013;64(1):21-33.
 - Paula CS, Verdam MCS, Hirota BCK, Souza AM, Silva CB, Miguel OG, *et al.* Phytochemical characterization, preliminary toxicity and evaluation of the antibacterial activity of the leaves of *Bauhinia unguolata* L. Rev Bras Farm. 2015;96(2):1315-34.

GRAPHICAL ABSTRACT



SUMMARY

- The minimal inhibitory concentration of the FABU against MSSA, MRSA, *P. aeruginosa* and *C. albicans* was ≥ 500 $\mu\text{g/mL}$.
- The total antioxidant activity of the FABU was 1.70 mg equivalent of BHT per mg FABU.
- The study demonstrated that FABU could significantly inhibit ROS levels and also decrease NO, H₂O₂ and TBARS levels when compared to the LPS-stimulated group.
- FABU did not alter the levels of TNF- α , TGF- β and IL-10 in the culture supernatant after treatment of LPS-stimulated cells.
- Our results demonstrated that FABU presents significant antioxidant activity.

Cite this article: Rodrigues RO, Yaochite JNU, Braga MA, Sousa AR, Sasahara GL, Fonseca SGC, *et al.* Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae) on LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. Pharmacog J. 2019;11(1):37-42.

APÊNDICE B – MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO.

Antioxidant, anti-inflammatory and healing potential of ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae) on *in vitro* and *in vivo* wound model

Raphael de Oliveira Rodrigues^{a*}, Juliana Navarro Ueda Yaochite^a, Greyce Luri Sasahara^a, Andressa Almeida Albuquerque^a, Said Gonçalves da Cruz Fonseca^b, Thiago Dias de Vasconcelos Araújo^b, Gilvandete Maria Pinheiro Santiago^b, Leôncio Mesquita de Sousa^c, Jarbas Lima de Carvalho^c, Ana Paula Negreiros Nunes Alves^d, Paulo Germano de Carvalho^e, Aparecida Tiemi Nagao-Dias^a

^a Department of Clinical Analysis and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceara (UFC), Rua Capitao Francisco Pedro 1210, 60430-370 Fortaleza, CE, Brazil

^b Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceara (UFC), Rua Capitao Francisco Pedro 1210, 60430-370 Fortaleza, CE, Brazil

^c Department of Organic and Inorganic Chemistry, Sciences Center, Universidade Federal do Ceara (UFC), Campus do Pici 12.200, 60021-940, Fortaleza, CE, Brazil

^d Department of Dental Clinic, Division of Oral Pathology, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^e Center for Health Sciences, Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Av. Washington Soares 1321, 60811-905 Fortaleza, CE, Brazil

***Corresponding author**

Raphael de Oliveira Rodrigues
Laboratory of Immunology,
Dept. Clinical Analysis and Toxicology,
Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceará,
Rua Capitão Francisco Pedro, 1210,
CEP 60430-370 Fortaleza, Ceará, Brazil,
Tel: 55-85-33668270
Email: raphaelolrodrigues@gmail.com

ABSTRACT

The present work aimed to investigate the antioxidant, anti-inflammatory and wound healing potential of ethyl acetate fraction from *Bauhinia unguolata* L. (FABU) on *in vitro* and *in vivo* models. Wound healing assay using human lung adenocarcinoma A549 cell line was employed to evaluate the ability of FABU to modulate cell migration. In addition, a surgical wound model in C57BL/6 mice was used to study the healing potential of FABU incorporated into gel using carbopol. Evaluation of lipid peroxidation, inflammatory and anti-inflammatory mediator gene expression, rate of wound closure, and histological analysis were done. FABU significantly reduced the gap area in *in vitro* wound healing assay, 24 hours after treatment. In the animal model, FABU at 0.5% topically applied once-daily during 5 days to the surgical wounds reduced significantly the lesion area. Moreover, it significantly decreased the levels of lipid peroxidation in the lesions and decreased the relative gene expression levels of IL-1 β and TNF- α in the injured region. In conclusion, our study suggests that *Bauhinia unguolata* can effectively promote the wound healing, probably by regulating the inflammatory environment during the early stages of the process.

Keywords: *Bauhinia unguolata*; Phenolic compounds; Cell migration; Antioxidant activity; Wound healing.

INTRODUCTION

Wound healing is a well-regulated physiological process which aim is to restore the integrity of injured tissues, and is a consequence of the interaction among cytokines, growth factors, cells, as well as components of the extracellular matrix. The process can be divided into four continuous and overlapping stages, including hemostasis, inflammation, proliferation and tissue remodeling [1].

Evidence shows that the overall costs to health systems for treating ulcers reach \$25 billion a year. Moreover, an increasing number of patients with chronic diseases in whom wound healing can be affected occurs every year [2]. For this reason, the development of products and technologies that promote wound healing and tissue regeneration has gained prominence in recent years [3].

The use of natural products, particularly those with anti-inflammatory, anti-oxidant and antimicrobial properties, such as polyphenolic compounds, for instance, can be a great alternative in this aspect [4, 5].

It is known that reactive oxygen species (ROS) have an important role in the healing process, mainly due to their direct action against the proliferation of microorganisms at the lesion site. Unfortunately, high concentrations of ROS may contribute to an exacerbated inflammatory environment, and can be associated with an worse prognosis in chronic lesions [6].

Thus, it has been observed that phenolic compounds from several plants may potentially prevent oxidative tissue damage, especially in the initial stages of the healing process, what promotes a down-regulated inflammatory environment [7].

Bauhinia unguolata L. is a native species of Brazil, popularly known as "pata-de-vaca", due to its shaped leaves [8]. It is distributed in the North, Center-West, Southeast and Northeast regions of the country and its main use in popular medicine is attributed to its hypoglycemic properties [9].

Phytochemical investigation of leaves of *B. unguolata* L. have demonstrated various chemical compounds, for instance, flavonoids quercetin, quercetin arabinofuranoside and quercitrin; besides the alkaloids harmine and ephedrine [10]. De Sousa *et al.* (2016) [11] have isolated and identified bibenzes, flavonoids, triterpenoids and oxepinic derivatives in extracts obtained from stems, barks and roots of *Bauhinia unguolata* L.

Recently, we have demonstrated that ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* stem wood (FABU) presented a significant antioxidant activity on LPS-stimulated macrophages, by decreasing the production of reactive oxygen and nitrogen species, as well as reducing lipid peroxidation [12].

The present study aimed to evaluate *in vitro* and *in vivo* wound healing activities of FABU, using A549 epithelial cells and a surgical wound model in mice.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Stem wood of *Bauhinia unguolata* was collected in Caucaia County, Ceará, Brazil. The identification was performed by Professor Edson P. Nunes, Department of Biology, Universidade Federal do Ceará. A voucher specimen has been deposited at the Herbarium Prisco Bezerra, Department of Biology (UFC) under number 54609.

Obtaining fraction rich in flavonoids

Fraction from *B. unguolata* rich in flavonoids (FABU) was obtained according to De Sousa *et al* (2016) [11]. Briefly, 3.4 kg of stem wood of *B. unguolata* were air-dried and finely powdered, and extracted successively with hexane (4 x 10 L) and ethanol (4 x 10 L) at room temperature for 48 h. The ethanol solution was then concentrated under reduced pressure in order to obtain the ethanolic extract of *B. unguolata* (51.7 g), which yielded approximately 1.52%. A portion of

EEBU (20.0 g) was suspended in distilled water and extracted with ethyl acetate (4 x 200 mL) to afford the ethyl acetate fraction of *B. unguolata* (FABU, 16 g), 80% yield.

For the phytochemical investigation of FABU, a mass of approximately 4.78 g of the fraction was subjected to chromatography on a silica gel column (79.9 g). The sample was eluted with a mixture of CH₂Cl₂/MeOH (95/5; 9/1) and methanol to yield 75 fractions (30 mL each). The samples were further subjected to thin layer chromatography (TLC) and pooled into 8 fractions (F1-F8). F3 [0.1404 g, CH₂Cl₂/MeOH (95/5)] and F4 fractions (0.2677 g, CH₂Cl₂) yielded liquiritigenin [**1**, 6.6 mg (0.14%)] and guibourtinidol [**2**, 24.5 mg (0.51%)], respectively, using silica gel column chromatography eluted with mixture of CH₂Cl₂/MeOH (95/5). In addition, by submitting the fraction F6 [2.0880 g, CH₂Cl₂/MeOH (9/1)] to a silica gel column chromatography eluted with CH₂Cl₂/MeOH (9/1), fisetinidol [**3**, 1.62 g (33.89%)] was obtained. By spectroscopy analysis, using one and bi-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of ¹H and ¹³C and comparison with literature values, the structural elucidation of the isolated compounds were done (Figure 1) [11].

Quantification of phenolic compounds and total tannins

For the determination of total polyphenol and total tannin levels in FABU, the Folin-Denis method was used, according to Galvão *et al.* (2018) [13] and Sartori, Castro and Mori (2014) [14], with modifications. Gallic acid was used as standard reference (1.69 to 13.56 µg/mL). For the quantification of total phenols in the sample, a volume corresponding to 120 µL of FABU (352.5 µg/mL), previously dissolved in ethanol, was added to a tube containing 60 µL Folin-Denis reagent, 600 µL water and 720 µL of anhydrous sodium carbonate at 29% (w/v). After 30 min- incubation at room temperature, the absorbances were measured at 760nm using a spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). A calibration curve was obtained through an

ethanolic solution of gallic acid, at concentrations of 1.69 µg/mL to 13.56 µg/mL, according to the following equation:

$$A = 0,0632C + 0,0791$$
$$R^2 = 0,98$$

Where, **A** was the absorbance obtained with the test sample and **C** was the concentration of gallic acid equivalents

The results of concentration were expressed as % *gallic acid equivalent per sample*.

Crospovidone complexing agent (BASF, Germany) was added to an aliquot of FABU (352.5µg/mL) previously dissolved in ethanol. The mixture was shaken for 5 min and then centrifuged at 7000 rpm for 5 min. A volume of 120 µL supernatant was tested by the Folin-Denis reaction, as described earlier.

The approximate concentration of tannins in the sample was estimated by the difference between the total phenol contents and phenols not adsorbed with crospovidone.

FABU chromatographic profile and determination of fisetinidol content

The chromatographic profile and the determination of fisetinidol content in FABU were estimated by subjecting the fraction to a high performance liquid chromatography (HPLC), using a Varian ProStar HPLC System UV-VIS system, equipped with pumps Rainin Dynamax, model SD-200. FABU and fisetinidol standard (isolated from FABU), both at 500 µg/mL in ethanol, were injected into a Phenomenex C18 reversed phase column, 5 µm, 4.6 mm x 150 mm. The mobile phases A and B consisted of 0.1% acetic acid solution and 5% methanol and 95% hydromethanol solution with 0.1% acetic acid, respectively. The gradient elution was: 0 min, 100% A; 0-30 min, change in gradient from 100 % A to 100% B over the interval; 30-40 min, 100% B, flow rate of 1.0 mL/min, injection volume of 20 µL. The quantification of

fisetinidol presented in FABU was performed according to the respective retention times (tR) and the total area of the peak at 281 nm.

Citotoxicity assay

Human epithelial cells, originating from alveolar adenocarcinoma, A549 cell line (BCRJ, Brazil), were seeded in 96-well plates at a concentration of 1×10^5 cells per well, and incubated at 37 °C and 5% CO₂, overnight. The cells were then treated with FABU (0.78 to 100.0 µg/mL) or dilution control (0.1% Tween 80) and incubated for 24 h. After, the supernatants were discarded and the adhered cells were washed twice with PBS (phosphate-buffered saline). Thereafter, a new DMEM medium supplemented with 500 µg/mL of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) was added to the wells. After incubation for 4 h at 37° C and 5% CO₂, the supernatant was discarded and 100 µL of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, USA) were added to the wells to dissolve the formazan salts. After 15 min of vigorous shaking, the absorbances were read using a microplate reader (Biochro, UK) at 570 nm.

In vitro wound healing assay

A549 human epithelial cells (2×10^5 cells per well) in DMEM High glucose medium with 10% FBS (foetal bovine serum, Gibco, Brazil) and 1% of Pencillin-Streptomycin antibiotics were added to 24-well plates, according to Ameeramja *et al.* (2016) [15]. Cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ until a monolayer with approximately 90% confluency would be formed. The cells were then cultured in *medium lacking serum growth factor* by addition of 0.5% FBS for 24 h, what lead the synchronization of the cells into the G₀-phase of the cell cycle. Afterwards, a slit was done in the middle of each well with the aid of a 200 µL-tip. The wells were washed twice with DMEM medium to remove the detached cells and treated with 0.5% FBS (negative

control), 10% FBS (positive control) or FABU at concentrations of 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$. The wound healing process was followed by photographs which were taken using an inverted microscope at 400x magnification coupled to a 10 mp- digital camera, at 0, 6 and 24 h after treatment. The photographs were analyzed by the *ImageJ* software (NIH, USA) and the results were expressed as percent wound closure.

In vivo wound healing

Topical gel preparation

Gel carbomer 940 (Carbopol®) was used as a vehicle for the topical gel application of FABU. The FABU fraction was solubilized with 1 mL dipropylene glycol in a polypropylene tube under a constant ultrasonic bath for 15 min. Thereafter, the mixture was withdrawn from the tube with the aid of a luer lock syringe and then connected to a three-way tap-like device. Subsequently, with the aid of another syringe containing 5% w/v carbopol adapted to the same device, the contents of the syringes were mixed by force applied to the plungers. Then, aminomethylpropanol (AMP-95) was added in order to adjust the pH of the mixture to 7.0. Subsequently, the mixture was filled with ultrapure water (q.s.p 10mL) to obtain 1% carbopol gel containing the FABU at 0.25% (w/v, that is, 2.5 mg/mL) and 0.50% (w/v, that is, 5 mg/mL), which were used for the treatment of surgical wounds.

Animals

C57BL/6 male mice, aged 8 weeks of age, weighing 20-30g, were obtained from the Centre of Experimental Biology (Nubex), University of Fortaleza (UNIFOR). The animals were kept at a controlled temperature of 26°C, 12h light-dark cycles, with water and food ad libitum. The

project was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the University of Fortaleza, 018/2016.

Skin irritation test

Skin irritation test was performed according to JIA; ZHAO; JIA (2008) [16], with modifications. Mice (n=5) were anesthetized with an intraperitoneal application of ketamine and xylazine (ketamine, 100 mg/kg, xylazine, 10mg/kg) and trichotomized on the dorsal surface. After the procedure, the animals were individually housed in cages and topically treated with 200 μ L of 0.5% (w/v) FABU gel once-daily during five days. The gel was applied in a predetermined area on normal skin, which has been previously depilated. The following parameters were evaluated: irritation, erythema, pustule formation, exudate, crust or any other signs of inflammation. After the treatment has finished, the animals were euthanized and the lesion area was divided into three parts. After the period of treatment, the animals were euthanized and a skin sample was removed for histopathological analysis.

Excision wound model

The animals were initially anesthetized with intraperitoneal application of ketamine and xylazine (ketamine, 100 mg/kg, xylazine, 10mg/kg). After, trichotomy was performed on the animal's back, skin asepsis was done with 70% ethanol. Afterwards, a single wound was done with the aid of an 8mm- biopsy punch in the depilated area, as described by Naito *et al.* (2014) [17]. In order to avoid local skin contraction, a silicone splint of approximately 10.0 mm in diameter were sutured in the peripheral region to the lesion [18]. The mice were subdivided into five experimental groups, each group containing 6 animals. The sham group consisted of mice that underwent surgery but received no treatment. The vehicle group comprised mice that received the gel without the incorporation of FABU. The standard treatment group consisted of

mice treated with FITOSCAR®, a commercial product composed of dry extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. 0.50% FABU group comprised mice receiving gel treatment containing 0.5% (w/v) FABU. The 0.25% FABU group comprised mice receiving gel treatment containing 0.25% (w/v) FABU.

The animals were treated topically once-daily with a volume of 200 μ L for a period of 5 days, starting at day 0 (shortly after the surgical procedure). Immediately after treatment, the animals were housed in individual cages.

Antioxidant activity of FABU

The action of free radicals against the lipids of cell membranes results in the formation of lipid peroxidation products, such as malondialdehyde (MDA). Lipid peroxidation at the lesion site was evaluated by measuring the levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), based on the protocol described by OHKAWA; OHISHI; YAGI, (1979) [19], with modifications. A 10% homogenate was prepared with a tissue section collected 5 days after surgery in 50 mM PBS (pH 7.8) with the aid of a polytron homogenizer in an ice-bath. After centrifugation at $11,000 \times g$ for 15 min at 4° C, 30 μ L of perchloric acid were added to the supernatant and the proteins were removed by centrifugation. A volume of 300 μ L TBA (thiobarbituric acid in 0.5% acetic acid) was added to a reaction tube containing 100 μ L of the final supernatant and incubated for 60 min at 95 °C. Volumes corresponding to 150 μ L of n-butanol and 50 μ L of 5M NaCl were added to the tubes and centrifuged at $16,000 \times g$ for 3 min. After centrifugation, the upper layer was collected and 100 μ L of ultrapure water were added and transferred to a 96 well plate. Thereafter, absorbance readings were performed at 532 nm (Asys UVM 340, Biochrom, USA). A standard curve of MDA was obtained after hydrolysis of 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France). The results were expressed as μ M MDA/g tissue.

RNA extraction and mRNA relative expression

Total RNA was extracted from the tissue sections collected on the 5th day after the surgical procedure, using Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), as recommended by the manufacturer. The final RNA was solubilized in ultrapure DEPC-treated water and maintained at -80 °C until use.

Approximately 1.5 µg of total RNA was reversely transcribed into complementary DNA (cDNA) with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA), according to the manufacturer's recommendations. For performance of the qPCR, the following primers were used: COX-2 (NM_011198.4), F: 5'-AGAAGGAAATGGCTGCAGAA-3' e R: 5'-GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3'; VEGF-a (NM_001025250.3), F: 5'-CCAGGAGGACCTTGTGTGAT-3' e R: 5'-GGGAAGGGAAGATGAGGAAG-3'; TNF-α (NM_013693.3), F: 5'-CTGGGACAGTGACCTGGACT-3' e R: 5'-GCACCTCAGGGAAGAGTCTG-3'; TGF-β (NM_011577.2), F: 5'-TTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3' e R: 5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3'; IL-1β (NM_008361.4), F: 5'-GGGCCTCAAAGGAAAGAATC-3' e R: 5'-TACCAGTTGGGGAAGTCTGC-3'; IL-6 (NM_031168.2), F: 5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3' e R: 5'-TCCACGATTTCCCAGAGAAC-3'; TBP (NM_013684.3) (*housekeeping* gene): F: 5'-AAGAGAGCCACGGACAAGT-3' e R: 5'-TTCACATCACAGCTCCCCAC-3'. Primers were designed using OligoPerfect™ Designer Software (Thermo Scientific, USA). The PCR reaction was done in a 10 µL reaction volume. The mixture contained 20 ng of cDNA, *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, USA), and primers at 300 nM. The PCR conditions were: 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 95° C for 15s and 60° C for 60s. A melt curve was done in order to evaluate the specificity of the reactions. Reactions were performed on a thermal cycler C1000 Touch Thermal Cycler CFX96 Real Time System (Bio-Rad, USA). The relative gene expression (fold change)

was normalized with *TBP* (TATA box binding protein) housekeeping gene, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [20]. The reason for selecting *TBP* gene was based on the study conducted by Turabelidze *et al* (2010) [21], where the authors evaluated several genes used as housekeeping genes in healing models and observed that *TBP* presented more consistent and stable expression and could be used as the reference gene for normalization and relative quantification.

Assessment of wound healing

During daily monitoring of the mice, the following observations were done: splint stability, wound exudate, presence of infectious agents, inflammation and granulation tissue formation. Photographic records of the lesions were performed on days 0 (before treatment), 2 and 5. Based on the analysis of the images obtained, wound closure was calculated with the aid of the *ImageJ*® software (Bethesda, MD, USA). The images were captured with a 10-megapixel digital camera. The percentage of wound size (P) was calculated for the different periods, from the final and initial areas of the lesions, applying the equation:

$$P = \frac{A_f}{A_i} \times 100$$

where A_f was the final area of the lesion on the assessed day and A_i was the initial area of the lesion.

Histological analysis

The tissue sections collected on day 5 after surgical procedure were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin blocks and sectioned at 5 μ m thick for histological analysis. After staining with haematoxylin-eosin stain, the results were presented in a descriptive way.

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm standard error of the mean. For the analysis of the results, analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test was used as the method for multiple comparisons. All statistical analyzes were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Prism, USA) and $p \leq 0.05$ was considered to be significant.

RESULTS

Content of total phenolic compounds and total tannins

Using the Folin-Denis method, the total phenol content and total tannins of the ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* (FABU) were estimated. FABU presented 46.04% of total polyphenols and 39.09% of tannins.

Quantification of fisetinidol

HPLC was used to verify the chromatographic profile of FABU. As seen in Figure 2A, fisetidinol isolated from FABU (used as reference standard) presented a retention time (t_R) of about 13.54 min. Similarly, the FABU presented a major peak in the same retention time under the same conditions (Figure 2B), which represented about 36.42% of fisetinidol.

Cytotoxicity of FABU against A549 adenocarcinoma cells

Treatment with all the tested concentrations of FABU (0.78 -100.0 $\mu\text{g/mL}$) did not lead to any reduction of cell viability (Figure 3). In this order, doses ≤ 100 $\mu\text{g/mL}$ were used to evaluate FABU in the *in vitro* wound healing assay.

In vitro wound healing assay

As observed in Figures 4A and 4B, treatment with FABU significantly accelerated the cell migration process ($p < 0.001$), as compared to the 0.5% FBS-treated control group, reducing the initial lesion area to approximately 32.6% and 22.0%, respectively. After 6 h of treatment, no difference in gap area were found in the groups treated with FABU in comparison to the 0.5% FBS-treated control group.

Skin irritability test

Topical treatment with the gel containing 0.50% FABU did not promote any sign of inflammatory response at the site of skin application, that is, no irritation or erythema present in the depilated area was observed. In addition, microscopic analysis of the skin did not show any sign of inflammation or morphological alteration (Fig. 5).

In vivo wound healing model

Antioxidant activity

As shown in Figure 6, FABU at 0.25% and 0.50% could effectively reduce tissue MDA production ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) when compared to the Sham group (untreated). Standard treatment with FITOSCAR® also showed a significant reduction in MDA levels ($p < 0.01$)

TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-1 β , COX-2 and VEGF relative expression levels in wound tissue

Relative expressions of some target genes present in tissue sections collected 5 days after surgery were analyzed (Figure 7). Treatment with 0.5% FABU significantly reduced levels (about 50%) of the relative expressions of TNF α and IL-1 β ($p < 0.05$ and < 0.01 , respectively)

in comparison to the Sham group, but it did not interfere in the relative expression of IL-6, COX-2, TGF- β or VEGF-a. The standard drug (FITOSCAR® group) induced high levels of relative expression of TGF- β (about 50%) and reduced levels of relative expressions of IL-1 β (about 50%).

Assessment of wound healing

As shown in Figure 8A, the images represent the progression of the initial stages of wound healing, that is, days 0, 2 and 5 after surgery. During the evaluated period, no bacterial growth was observed at the wound site. A progressive reduction in lesion area was observed in all groups. A thick protective layer surrounding the lesion can be seen in the animals treated with 0.50% FABU, and also in the group treated with FITOSCAR® (on days 2 and 5) When the photographs were submitted to the analysis by *imageJ* software, a statistically significant reduction in the wound area could be observed in the groups treated with 0.25% and 0.50% FABU ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively) when compared to the Sham group on day 2. The group treated with 0.50% FABU presented better response than the standard group ($p < 0.05$). On day 5, with the animals treated with 0.50% FABU presented a significant reduction of the initial lesion area when compared to the Sham ($p < 0.001$), vehicle ($p < 0.05$) and standard ($p < 0.001$) groups.

Histopathological analysis of the tissue sections collected on day 5 after surgery is demonstrated in Figure 9. No significant differences were found among the different groups considering the following parameters, that is, leukocyte cell infiltrate, angiogenesis and fibrinogranulocyte membrane.

DISCUSSION

The skin is the first barrier of defense against external agents and is also responsible for thermoregulation and fluid balance, thus playing an important role in homeostasis [22]. Loss of skin integrity results in a variable number of complications for the individual, and may be associated with morbidity due to fluid loss and increased susceptibility to infections [23].

It has been documented that high levels of proinflammatory cytokines, especially in the early stages of the healing process may be correlated with a slow process of tissue regeneration, as well as with wound chronicity. In these terms, high concentration of inflammatory mediators in the lesion, such as enzymes and reactive oxygen and nitrogen species, may facilitate the maintenance of the inflammatory environment and prolong tissue injury [24].

Some authors have pointed out that wound healing process can be directly related to the antioxidant activity of the therapeutic agent used, since these could significantly accelerate the healing process by removing free radicals and stimulating colloid synthesis in the lesion [25].

Some studies have investigated the use of plants and/or plant derivatives as agents that may facilitate cutaneous wound healing [26]. For instance, flavonoids and other phenolic compounds may be beneficial in the wound healing process by modulating free radicals produced by a variety of cells, such as, neutrophils, macrophages and lymphocytes [27].

In a previous study [12], we have demonstrated that the FABU showed significant antioxidant activity, demonstrated *in vitro* by the phosphomolybdenum reduction model and also in a model using LPS-stimulated macrophages.

Ergene Öz *et al.* (2018) claim that drugs presenting anti-inflammatory and antioxidant activities could effectively contribute to the tissue healing process [28]. In this aspect, the present study focused on demonstrating the effects of FABU gel in a surgical wound model, mainly through the modulation capacity of oxidative stress and the inflammatory environment in the early stages of the healing process, complemented by the results found in the *in vitro* model. In this

way, we could demonstrate that FABU could reduce TBARS levels at the lesion site. Thus, the topical application of FABU appears to induce an important antioxidant effect, decreasing lipid peroxidation. This effect has fundamental importance once the presence of ROS may cause lipid peroxidation of organelles and cell membranes and consequently damage to endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes [29]. Our *in vivo* findings corroborate with our previous data showing that FABU reduced TBARS production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages [12].

In the present work, we could demonstrate that FABU at 0.5% reduced significantly the relative expression of TNF- α and IL-1 β in the lesion, in comparison to the Sham group. Nonetheless, some authors [30] consider that healing can be favored by proinflammatory cytokine production at the site of injury, based on their properties of stimulation, proliferation and chemotaxis of fibroblasts, for example. On the other hand, it is known that overproduction of these cytokines may lead to exacerbated tissue injury, hindering the evolution of the healing process. We believe that a well regulated inflammatory environment is required in order that tissue regeneration process occurs normally.

According to Biswas *et al* (2017) [31], the ideal healing process can be characterized by the successful closure of the injured area, in a short period of time, associated with no side effects. It was observed that the treatment with the FABU significantly accelerated wound closure during the evaluated period. In the group treated with 0.5% FABU, the lesion area was significantly reduced on days 2 and 5 of tissue injury in comparison to the other groups. Macroscopic monitoring of the lesions also showed the formation of a thicker protective layer in the wound region in those animals treated with 0.5% FABU. It is known that in the context of wound healing, some phenolic compounds, mainly tannins, have the capacity to precipitate proteins, and consequently, the formation of a complex with low water solubility, which accumulates in the injured area, creating a protective layer against harmful agents and inhibiting

the formation of exudate, thus promoting tissue repair [32, 33]. This characteristic is commonly observed through the treatment of wounds with *Stryphnodendron adstringens*. In addition to this biological property, some studies have also reported benefits on keratinocyte proliferation, cell migration and wound collagen production [33].

The use of gel of FABU could present a beneficial effect. Gels have the properties of maintaining wettability and humidity in the wound region and, in this way, promoting the acceleration of the tissue regeneration process [34]. This characteristic may have also contributed to promote a favorable environment for better resolution of the lesions.

Finally, our results demonstrated that wound healing activities of the ethyl acetate fraction from stem of *Bauhinia unguolata* in *in vitro* and *in vivo* studies, are probably due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, besides its effect on cellular migration. Further studies are needed to demonstrate its benefit in *in vivo* models of exacerbated and chronic inflammatory conditions.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas, Department of Clinical Analysis and Toxicological, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceará, for allowing the use of the Real-Time PCR Thermal Cycler.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Dorai, A. (2012). Wound care with traditional, complementary and alternative medicine. *Indian Journal of Plastic Surgery*, 45(2), 418.
2. Han, G., & Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in therapy*, 34(3), 599–610.
3. Murphy, P. S., & Evans, G. R. D. (2012). Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products. *Plastic Surgery International*, 2012, 1–8.
4. Ibrahim, N., 'Izzah, Wong, S. K., Mohamed, I. N., Mohamed, N., Chin, K. Y., Ima-Nirwana, S., & Shuid, A. N. (2018). Wound healing properties of selected natural products. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(11), 1-23.
5. Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–16.
6. Cano Sanchez, M., Lancel, S., Boulanger, E., & Neviere, R. (2018). Targeting Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the Treatment of Impaired Wound Healing: A Systematic Review. *Antioxidants*, 7(8), 98, 1-14.
7. Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., & Kulma, A. (2016). The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 1–41.
8. Paula, C. da S., Canteli, V. C. D., Hirota, B. C. K., Campos, R., de Oliveira, V. B., Kalegari, M., Silva, C. B., Silva, G. M., Miguel, O. G., Miguel, M. D. (2014). Potencial antioxidante in vitro das folhas da Bauhinia unguilata L. *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*, 35(2), 217–222.
9. Paula, C. da S., Christina, M., Konopatzki, B. C., Souza, A. M. De, Bezerra, C., & Miguel, O. G. (2015). Caracterização fitoquímica, toxicidade e avaliação preliminar da

- atividade antibacteriana das folhas de *Bauhinia unguolata* L. Phytochemical characterization , preliminary toxicity and evaluation of the antibacterial activity of the leaves of *Bauhinia ungu.* *Rev. Bras. Farm.*, 96(2), 1315–1334.
10. Neto, M. M., Neto, M. A., Filho, R. B., Lima, M. A. S., & Silveira, E. R. (2008). Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(3), 227–229.
 11. de Sousa, L. M., de Carvalho, J. L., da Silva, H. C., Lemos, T. L. G., Arriaga, A. M. C., Braz-Filho, R., Militão, G. C. G., Silva, T. D. S., Ribeiro, P. R. V. Santiago, G. M. P. (2016). New Cytotoxic Bibenzyl and Other Constituents from *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae). *Chemistry and Biodiversity*, 13(12), 1630–1635.
 12. Rodrigues, R. de O., Yaochite, J. N. U., Braga, M. A., Sousa, A. R. de, Sasahara, G. L., Fonseca, S. G. da C., Araújo, T. D. V., Santiago, G. M. P. S., Sousa, L. M., Carvalho, J. L., Nascimento, F. B. S. A., Nobre Júnior, H. V., Nagao-Dias, A. T. (2019). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae) on LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Pharmacognosy Journal*, 11(1), 37–42.
 13. Galvão, M. A. M., Arruda, A. O. de, Bezerra, I. C. F., Ferreira, M. R. A., & Soares, L. A. L. (2018). Evaluation of the Folin-Ciocalteu Method and Quantification of Total Tannins in Stem Barks and Pods from *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) L. P. Queiroz. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61, 1-20.
 14. Sartori, C. J., Castro, A. H. F., & Mori, F. A. (2014). Teores de fenóis totais e taninos nas cascas de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina*). *Floresta e Ambiente*, 21(3), 394–400.
 15. Ameeramja, J., Panneerselvam, L., Govindarajan, V., Jeyachandran, S., Baskaralingam, V., & Perumal, E. (2016). Tamarind seed coat ameliorates fluoride induced cytotoxicity, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis in A549 cells.

- Journal of Hazardous Materials*, 301, 554–565.
16. Jia, Y., Zhao, G., & Jia, J. (2008). Preliminary evaluation: The effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 181–189.
 17. Naito, R., Nishinakamura, H., Watanabe, T., Nakayama, J., & Kodama, S. (2014). Edaravone, a free radical scavenger, accelerates wound healing in diabetic mice. *Wounds*, 26(6), 163-171.
 18. Wang, X., Ge, J., Tredget, E. E., & Wu, Y. (2013). The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nature Protocols*, 8(2), 302–309. doi:10.1038/nprot.2013.002
 19. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2):351-358.
 20. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408.
 21. Turabelidze, A., Guo, S., & Dipietro, L. A. (2010). Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. *Wound Repair and Regeneration*, 18(5), 460–466.
 22. Barthel, R., & Aberdam, D. (2005). Epidermal stem cells. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 19(4), 405–413.
 23. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314–321.
 24. Nguyen, M. C., Le, D. T., Kamei, K., & Dang, T. P. T. (2017). Wound healing activity of *Streptocaulon juvenas* root ethanolic extract. *Wound Repair and Regeneration*, 25(6), 956–963.
 25. Özay, Y., Güzel, S., Yumrutaş, Ö., Pehlivanoglu, B., Erdoğan, İ. H., Yildirim, Z., Türk,

- B. A., Darcan, S. (2019). Wound healing effect of kaempferol in diabetic and nondiabetic rats. *Journal of Surgical Research*, 233, 284–296.
26. Gopalakrishnan, A., Ram, M., Kumawat, S., Tandan, S., & Kumar, D. (2016). Quercetin accelerated cutaneous wound healing in rats by increasing levels of {VEGF} and {TGF}- β 1. *Indian Journal of Experimental Biology*, 54(3), 187–195.
27. Ghosh, P. K., & Gaba, A. (2013). Phyto-Extracts in Wound Healing. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 16(5), 760–820.
28. Ergene Öz, B., Saltan İşcan, G., Küpeli Akkol, E., Süntar, İ., & Bahadır Acıkara, Ö. (2018). Isoflavonoids as wound healing agents from *Ononidis Radix*. *Journal of Ethnopharmacology*, 211, 384–393.
29. Moghadamtousi, S. Z., Rouhollahi, E., Hajrezaie, M., Karimian, H., Abdulla, M. A., & Kadir, H. A. (2015). *Annona muricata* leaves accelerate wound healing in rats via involvement of Hsp70 and antioxidant defence. *International Journal of Surgery*, 18, 110–117.
30. WERNER, S., & GROSE, R. (2017). Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiological Reviews*, 83(3), 835–870.
31. Biswas, T. K., Pandit, S., Chakrabarti, S., Banerjee, S., Poyra, N., & Seal, T. (2017). Evaluation of *Cynodon dactylon* for wound healing activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 197, 128–137.
32. Ribeiro, G., Silva, M. A. G., Martins, C. B., Borges, V. P., & Neto, J. C. L. (2013). Associação fitoterápica no tratamento de feridas cutâneas induzidas em equinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(5), 1427–1433.
33. Hernandez, L., da Silva Pereira, L. M., Palazzo, F., & de Mello, J. C. P. (2010). Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(3), 431–436.

34. Kamoun, E. A., Kenawy, E. R. S., & Chen, X. (2017). A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research*, 8(3), 217–233.

Figure legends

Figure 1: Chemical structures of isolated compounds from ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata*. (1): liquiritigenin; (2): guibourtinidol and (3): fisetinidol.

Figure 2: Chromatogram of the fisetinidol standard isolated from the ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* (A) and ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* (B). FABU and fisetinidol standard were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), using a Varian ProStar HPLC System UV-VIS system, equipped with pumps Rainin Dynamax, model SD-200.

Figure 3: Citotoxicity of A549 cells line treated with various concentrations ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata*. (FABU) for 24 h. The citotoxicity was evaluated using MTT method. The results were expressed as percentage of viable cells.

Figure 4: Wound healing assay with A549 adenocarcinoma cell line treated with different concentrations of ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata*. (FABU). (A): Photographs were taken at 0, 6 and 24 hours after injury. Magnification: 400x. (B) The photographs were submitted to analysis by *image J* software and the results were expressed in % of wound size considering the time.

Figure 5: Skin irritation test. Trichotomized C57BL/6 mice were treated topically once-daily during 5 days on normal skin. Macroscopic (A) and microscopic (B) image of uninjured skin from control group that did not receive treatment (day 5). Right side: Macroscopic (C) and microscopic (D) image of uninjured skin of group treated with 0.5% FABU gel (day 5). Histological sections covered by atrophic paraceratinized stratified squamous epithelium were evidenced in both groups, under which there is dense fibrous connective tissue. There are no signs of inflammation. Magnification: 100x

Figure 6: *In vivo* wound healing model. A single wound was done with the aid of an 8mm-biopsy punch in trichotomized C57BL/6 mice. The animals were treated once-daily during 5 days with 0.25 or 0.5% the ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* (FABU), with the standard drug (FISSETINOL), with vehicle (gel without FABU) or untreated (Sham). On day 5 after the surgery, tissue sections were collected and submitted to lipid peroxidation determination. The results were expressed as μM MDA/g tissue.

Figure 7: *In vivo* wound healing model. A single wound was done with the aid of an 8mm-biopsy punch in trichotomized C57BL/6 mice. The animals were treated once-daily during 5 days with 0.25 or 0.5% the ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* (FABU), with the standard drug (FISSETINOL), with vehicle (gel without FABU) or untreated (Sham). On day 5 after the surgery, tissue sections were collected and submitted to analysis of the relative gene expression of TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-1 β , COX-2 and VEGF by RT- real time PCR technique.

Figure 8: *In vivo* wound healing model. A single wound was done with the aid of an 8mm-biopsy punch in trichotomized C57BL/6 mice. The animals were treated once-daily during 5 days with 0.25 or 0.5% the ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* (FABU), with the standard drug (FISSETINOL), with vehicle (gel without FABU) or untreated (Sham). **(A):** Photographs were taken on day 0, 2, and 5 after surgery. **(B)** The photographs were submitted to the *image J* software and relative measurement of wound areas were done.

Figure 9: *In vivo* wound healing model. A single wound was done with the aid of an 8mm-biopsy punch in trichotomized C57BL/6 mice. The animals were treated once-daily during 5 days with 0.25 or 0.5% the ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* (FABU), with the standard drug (FISSETINOL), with vehicle (gel without FABU) or untreated (Sham). On day 5 after the surgery, tissue sections were collected and submitted to histological analysis. The sections were stained with hematoxylin-eosin stain. Magnification: 100x.

Figure 1

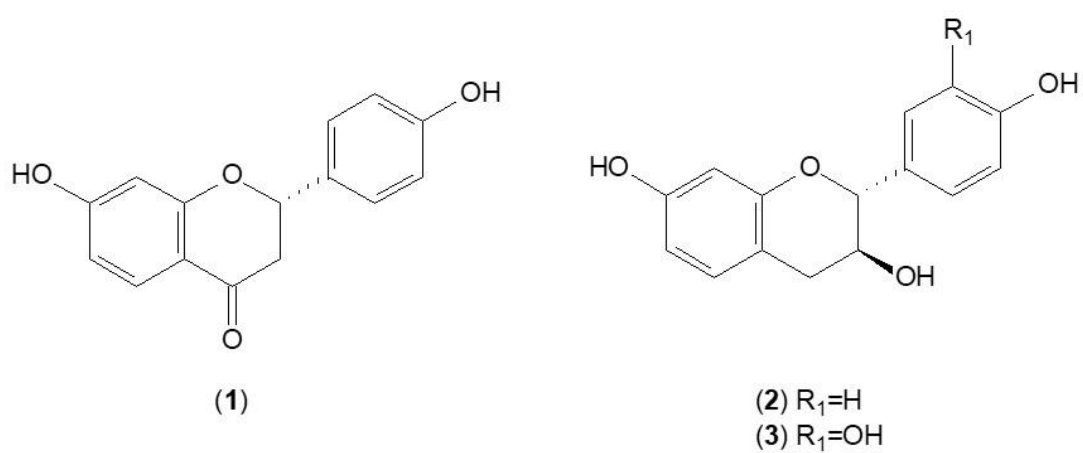
RODRIGUES, *et al.* (2019)

Figure 2A

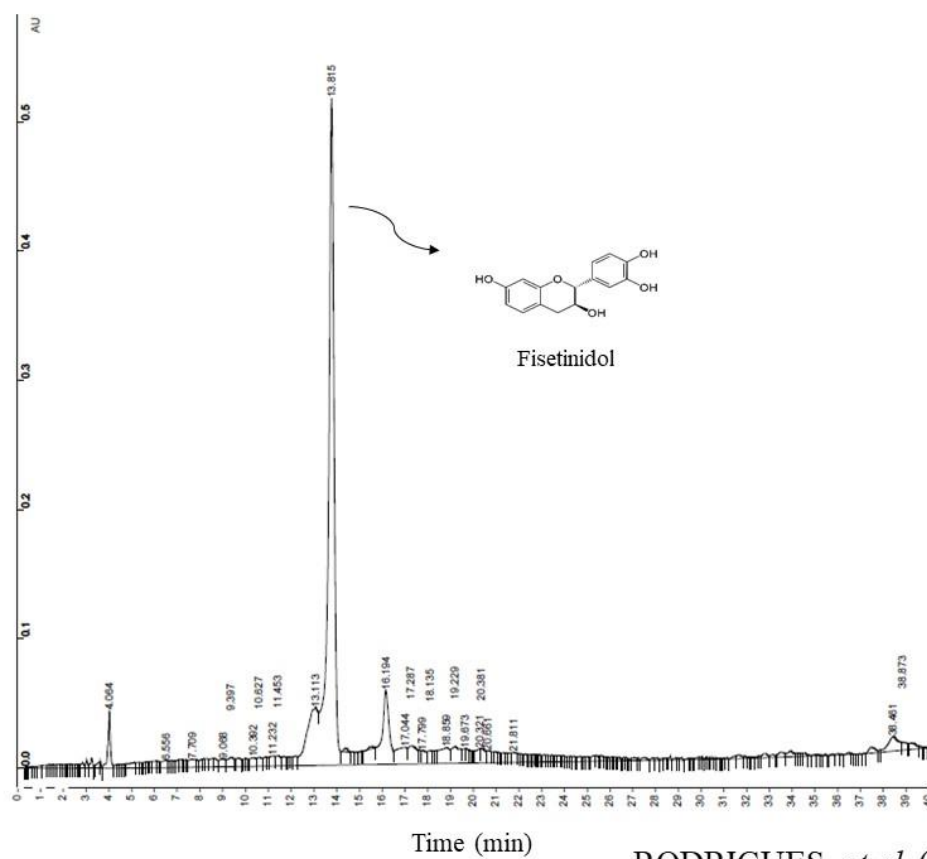
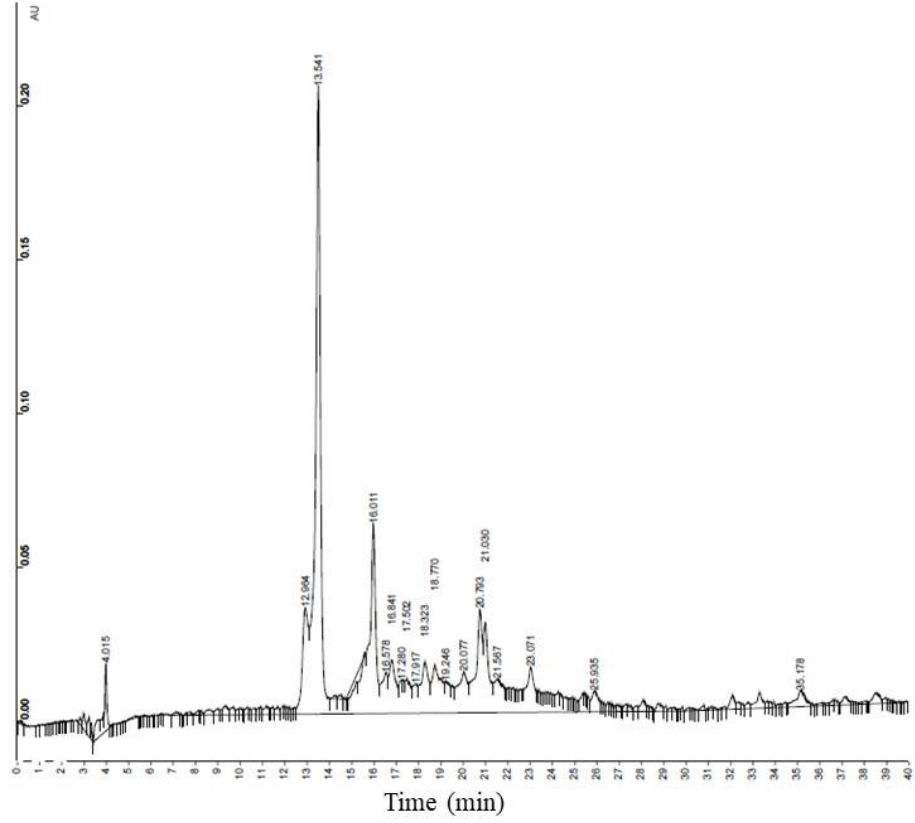
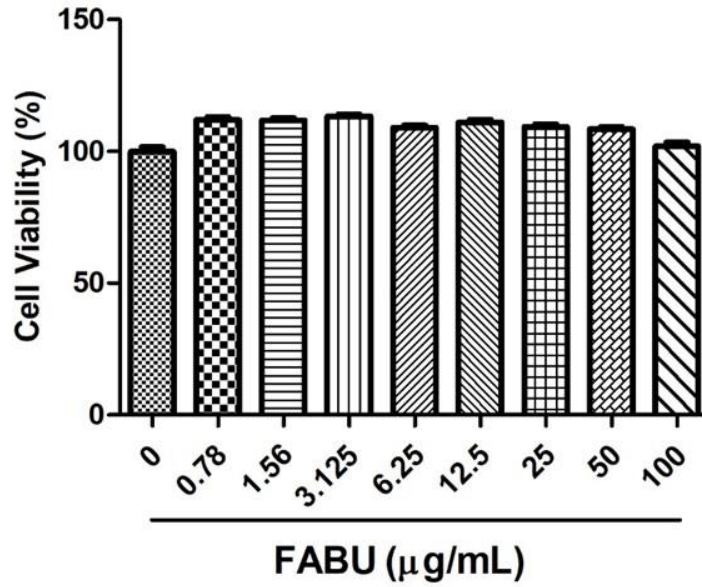
RODRIGUES, *et al.* (2019)

Figure 2B



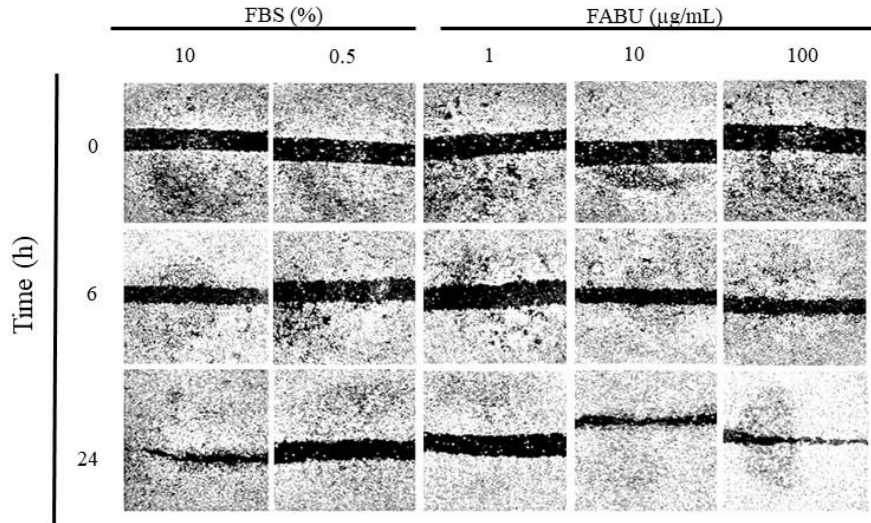
RODRIGUES, *et al.* (2019)

Figure 3



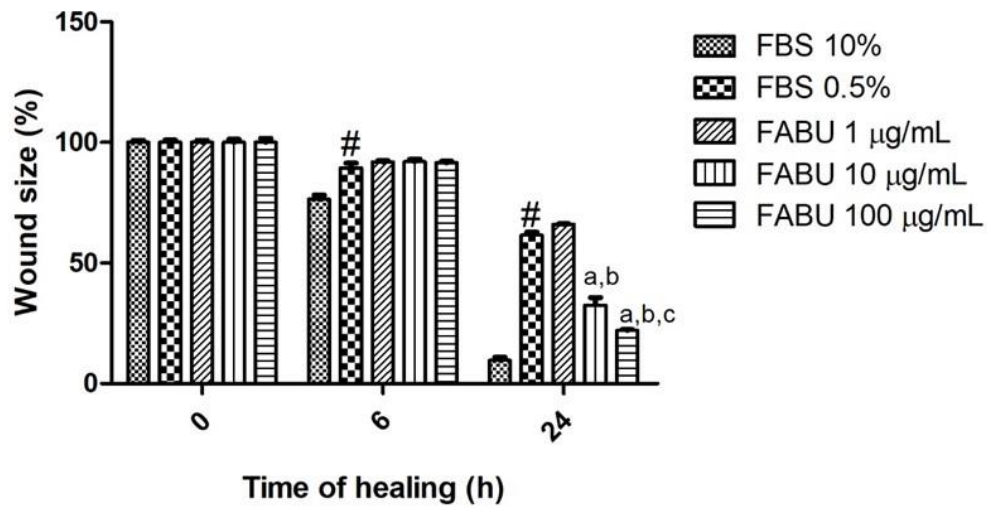
RODRIGUES, *et al.* (2019)

Figure 4A



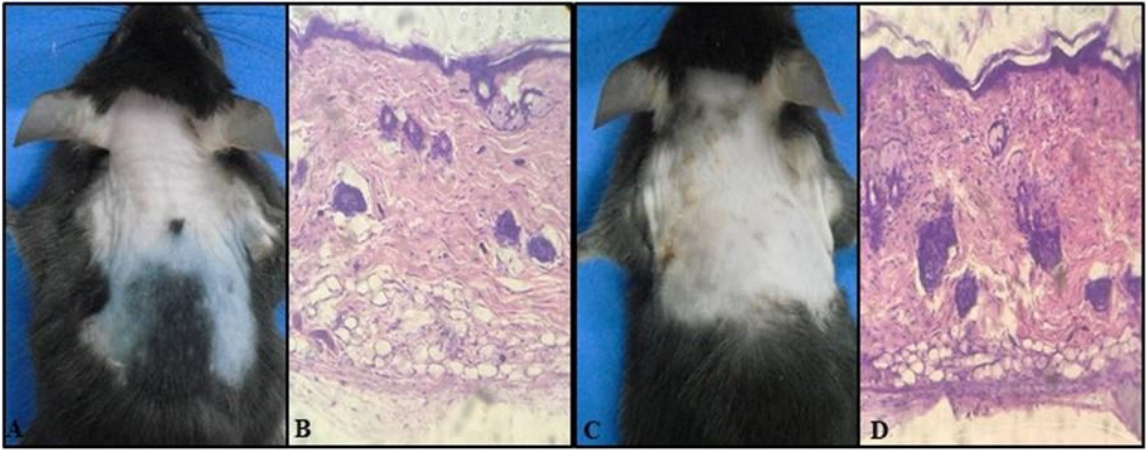
RODRIGUES, *et al.* (2019)

Figure 4B



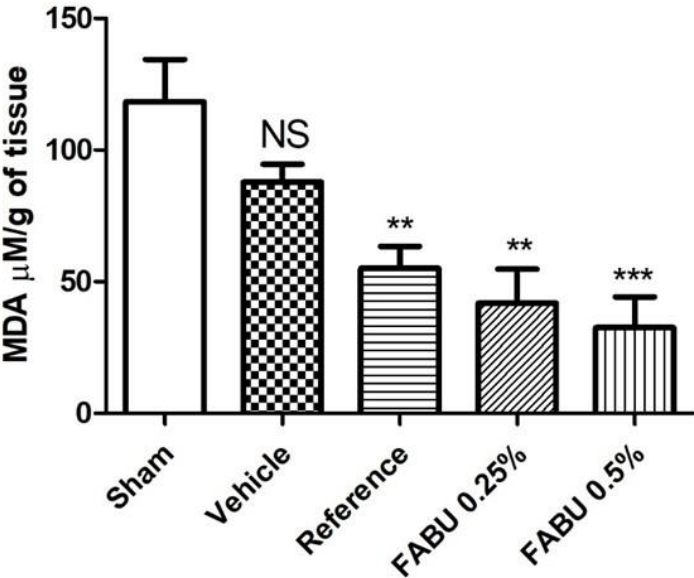
RODRIGUES, *et al.* (2019)

Figure 5



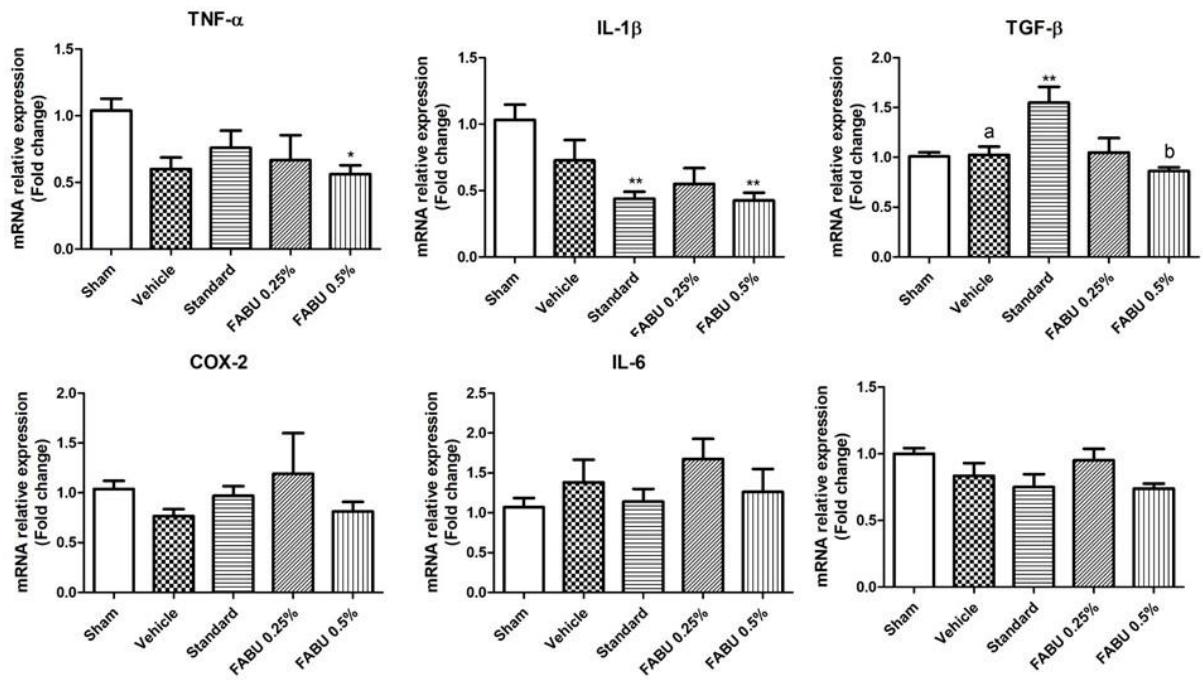
RODRIGUES, *et al.* (2019)

Figure 6



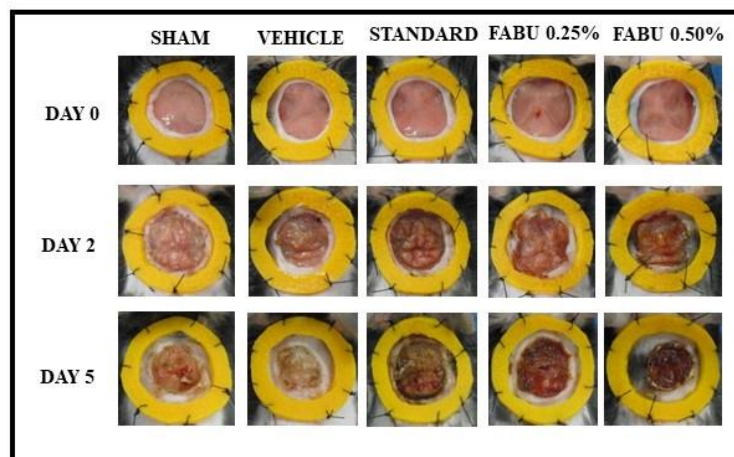
RODRIGUES, *et al.* (2019)

Figure 7

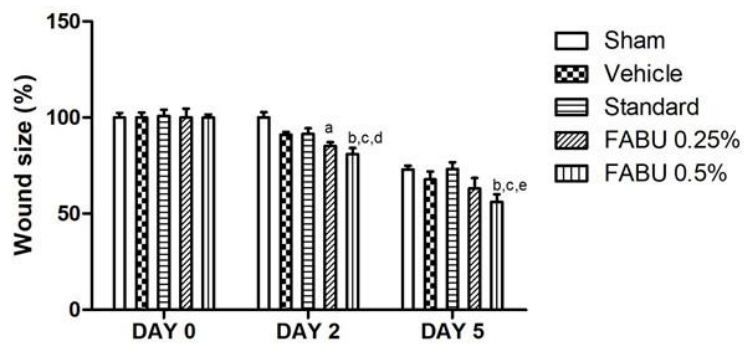


RODRIGUES, *et al.* (2019)

Figure 8 (A)

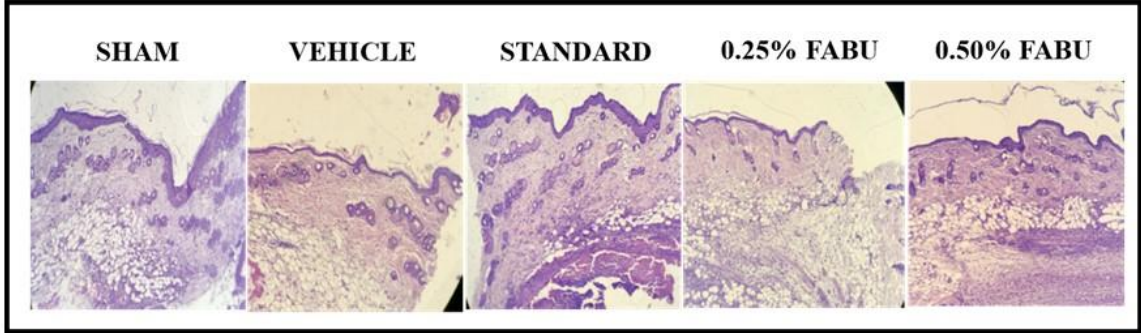


(B)



RODRIGUES, *et al.* (2019)

Figure 9



RODRIGUES, *et al.* (2019)

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
Diretoria de Pesquisa Desenvolvimento e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais– CEUA

PARECER N°. 018/2016

Projeto de Pesquisa: Avaliação do potencial regenerativo de Bauhinia pulchella em úlcera diabética experimental.

Pesquisador Responsável: Paulo Germano de Carvalho
Finalidade de Proposta: Pesquisa

Data de apresentação ao CEUA: 09/08/16.

Registro no CEUA: 16-023

Tipo de Animal: Roedores

Espécie: Camundongo Isogênico

Linhagem: C57BL/6

Quantidade: 60 (60 machos C57BL/6)

Idade e Peso: 08 semanas / 28 g

Vigência da autorização: 28/11/16 a 31/04/18

Origem dos Animais: Biotério de Produção do NUBEX- Núcleo de Biologia Experimental da Universidade de Fortaleza

Parecer: Aprovado na data de 28/11/16



Prof. Ramon da Silva Raposo
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

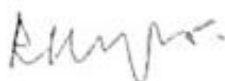


Comissão de Ética para o Uso de Animais – CEUA

Considerando solicitação do pesquisador **Paulo Germano de Carvalho**, com projeto aprovado intitulado "Avaliação do potencial regenerativo de plantas do gênero Bauhinia em úlcera experimental" nº 018/2016 para inclusão de 30 camundongos C57black 6J no referido projeto em desenvolvimento;

esta comissão após a análise, deferiu a solicitação.

Fortaleza, 01 de julho de 2019



Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais