



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**MICHELLY RODRIGUES PEREIRA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E CICATRIZANTE *IN VITRO***  
**DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Sideroxylon obtusifolium* (ROEM. &**  
**SCHULT.) T. D. PENN.**

**Recife**  
**2020**

**MICHELLY RODRIGUES PEREIRA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E CICATRIZANTE *IN VITRO*  
DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Sideroxylon obtusifolium* (ROEM. &  
SCHULT.) T. D. PENN.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Biologia Química para a Saúde

**Orientadora:** Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

**Recife**

**2020**

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Silva, Michelly Rodrigues Pereira da  
Avaliação das atividades antioxidante e cicatrizante *in vitro* dos extratos das  
folhas de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn. / Michelly  
Rodrigues Pereira da Silva. – 2020.

64 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas, Recife, 2020.

Inclui referências e anexos.

1. Plantas medicinais. 2. Toxicologia. 3. Cicatrização de ferimentos. I.  
Silva, Teresinha Gonçalves da (orientadora). II. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-140

**MICHELLY RODRIGUES PEREIRA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E CICATRIZANTE *IN VITRO*  
DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Sideroxylon obtusifolium* (ROEM. &  
SCHULT.) T. D. PENN.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Data da defesa: 26/11/2020

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Cynthia Layse Ferreira de Almeida (Examinador externo)  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

---

Profa. Dra. Vanda Lúcia dos Santos (Examinador externo)  
Universidade Estadual da Paraíba

*Dedico a Deus, por toda a  
Sua benevolência e graça  
em minha vida*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus*, por Seu infinito amor por mim, pelas bênçãos derramadas sobre minha vida. Obrigada por me dá sustento e mostrar o melhor caminho a ser seguido.

Agradeço à minha orientadora *Profa. Teresinha Gonçalves da Silva*, por ter acreditado em mim desde a iniciação científica. Por toda competência e conhecimento compartilhado. Grata pela orientação nestes quatro anos de laboratório.

Agradeço aos *meus familiares*, em especial a minha mãe, *Claudía Rodrigues*, minha avó, *Odete Rodrigues* e meu pai, *Edelmír Pereira*, por estarem sempre presentes e me apoiarem nesta caminhada acadêmica, por serem minha base e inspiração.

Agradeço ao meu esposo, *Pedro Paulo*, por ser o melhor companheiro de vida e laboratório. Sou grata por todo seu amor, cuidado e principalmente sua paciência nos momentos mais difíceis. Obrigada por seu sorriso leve e por saber me fazer feliz.

Agradeço aos meus meninos, Antony, Eder (irmãos) e Pietro (filho), por serem provas do amor de Deus por mim. Como foi difícil engravidar no mestrado, tive que me redescobrir, mas Deus com toda benevolência mostrou-me o prazer e a dádiva de ser mãe.

Agradeço aos meus sogros, *Solange* e *Fernando*, pelos conselhos e acolhimento. Agradeço a *Bruna* e *Thayana* pelos momentos descontraídos e palavras de apoio.

Agradeço a todos os companheiros do *BIOFARMATOX*. Em especial *Paula*, *Erika* e *Alicia* por toda ajuda e pela troca de conhecimento.

Agradeço a *Carol* (minha mentora e amiga) e *Caio*, por todo ensinamento, carinho e cuidado. Agradeço a *Alexandra* pelo convívio, parceria na iniciação científica e mestrado, sou grata pelo laço de amizade construído.

Agradeço aos meus amigos da graduação, por torcerem por mim e por sempre estarem compartilhando momentos difíceis e alegres. Em especial, *Brenda*, *Bruna* e *Gênesis*.

Agradeço aos amigos de mestrado *Leandro* e *Raísa*, as disciplinas não seriam tão leves sem vocês.

Agradeço as minhas amigas de vida, *Isabella*, *Rhaysa*, *Larissa*, *Gabriela* e *Alessandra*, por estarem à disposição em ouvir meus momentos de estresses e me fazerem dar diversas risadas.

Agradeço à banca examinadora, *Profa. Dra. Vanda Lúcia dos Santos* por ter aceitado o convite para avaliação do meu trabalho e a *Profa. Dra. Cynthia Layse Ferreira de Almeida*, com ressalvas para seu exemplo de pesquisadora e sua contribuição na minha caminhada profissional.

A *FACEPE*, ao *Departamento de Antibióticos* e *UFPE* pela estrutura e apoio financeiro para realização desse trabalho.

## RESUMO

*Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.), conhecida popularmente como quixabeira, é uma planta típica das regiões do Cerrado brasileiro, sendo encontrada também no bioma Caatinga. A sua casca é usada pelas comunidades tradicionais para o tratamento de úlcera, gastrite, azia, inflamação ovariana e como cicatrizante. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade aguda, citotoxicidade e as atividades antioxidante e cicatrizante *in vitro* dos extratos brutos das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. Foram obtidos os extratos acetato de etila (EASo), etanólico (EESo) e metanólico (EMSo) das folhas de *S. obtusifolium*. As principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos foram identificadas por cromatografia em camada delgada (CCD). A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos fosfomolibdênio DPPH, ABTS e eliminação dos radicais superóxido (SOD), enquanto a atividade cicatrizante foi avaliada através da migração celular. A citotoxicidade foi feita em hemácias murinas e fibroblastos L929. A toxicidade aguda foi feita segundo as normas da OECD 2001. A CCD apontou a presença de taninos hidrolisáveis, flavonoides, terpenoides/esteroides, mono e sesquiterpenos. Na atividade antioxidante, todos os extratos apresentaram relevante atividade em relação aos controles, tendo o EMSo alcançado o melhor resultado de  $Cl_{50}$  no método DPPH ( $95,70 \pm 5,31 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto o EESo teve melhor desempenho nos demais modelos. Na atividade citotóxica, os extratos de *S. obtusifolium* não alteraram significativamente a viabilidade dos fibroblastos L929 nem causaram hemólise. Na atividade cicatrizante *in vitro*, o teste de migração celular demonstrou um aumento na taxa de confluência dos fibroblastos que receberam EESo nos tempos 8, 10, 12 e 24 h e do EMSo nos tempos 10 e 12 h em relação ao controle. No teste de toxicidade aguda, a  $DL_{50}$  do extrato etanólico de *S. obtusifolium* foi superior a 2000 mg/kg. Foi observado o aumento no ganho de massa corporal dos animais do grupo tratado, além de alterações na massa dos órgãos (fígado e baço) e dos parâmetros hematológicos (hemácias, hematócrito e CHCM). A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que os extratos brutos de *S. obtusifolium* apresentaram atividade antioxidante e cicatrizante *in vitro*. Além disso, a espécie apresentou baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Quixabeira; Plantas medicinais; Estresse oxidativo; Cicatrização; Toxicidade.

## ABSTRACT

*Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) Is a plant typical of the Brazilian Cerrado regions, and is also found in the Caatinga biome. Its bark is used by traditional communities to treat ulcers, gastritis, heartburn, ovarian inflammation and as a healing agent. In this context, the aim of this work was to evaluate the acute toxicity, cytotoxicity and the antioxidant and healing activities *in vitro* of the crude extracts of the leaves of *Sideroxylon obtusifolium*. The ethyl acetate (EASo), ethanolic (EESo) and methanolic (EMSo) extracts were obtained from the leaves of *S. obtusifolium*. The main secondary metabolites present in the extracts were identified by thin layer chromatography (CCD). The antioxidant activity was evaluated by the phosphomolybdenum DPPH, ABTS and elimination of superoxide radicals (SOD) methods, while the healing activity was evaluated through cell migration. Cytotoxicity was performed on murine red blood cells and L929 fibroblasts. Acute toxicity was carried out according to the OECD 2001 rules. The CCD pointed out the presence of hydrolyzable tannins, flavonoids, terpenoids/steroids, mono and sesquiterpenes. In the antioxidant activity, all extracts showed relevant activity in relation to the controls, with the EMSo achieving the best IC<sub>50</sub> result in the DPPH method ( $95.70 \pm 5.31 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), while the EESo had better performance in the other radicals. In cytotoxic activity, extracts of *S. obtusifolium* did not significantly alter the viability of L929 fibroblasts, nor did they cause hemolysis. In the healing activity *in vitro*, the cell migration test demonstrated an increase in the confluence rate of fibroblasts that received EESo at 8, 10, 12 and 24 h and EMSo at 10 and 12 h compared to control. In the acute toxicity test, the LD<sub>50</sub> of the ethanolic extract of *S. obtusifolium* was greater than 2000 mg/kg. It was observed an increase in the body mass gain of the animals in the treated group, in addition to changes in the mass of the organs (liver and spleen) and in hematological parameters (red blood cells, hematocrit and MCHC). From the results obtained in this work, it can be concluded that the crude extracts of *S. obtusifolium* showed antioxidant and healing activity *in vitro*. In addition, the species showed low toxicity *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Quixabeira; Medicinal plants; Oxidative stress; Healing; Toxicity.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 OBJETIVOS.....	13
1.1.1 <b>Objetivo Geral</b> .....	13
1.1.2 <b>Objetivos Específicos</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 ESTRESSE OXIDATIVO.....	14
2.2 CICATRIZAÇÃO.....	16
2.3 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS.....	20
2.4 FAMÍLIA SAPOTACEAE.....	22
2.4.1 <b>Gênero <i>Sideroxylon</i></b> .....	22
2.4.2 <b><i>Sideroxylon obtusifolium</i></b> .....	23
<b>3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	25
3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE <i>S. obtusifolium</i> .....	25
3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE <i>S. obtusifolium</i> .....	25
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DE <i>S. obtusifolium</i> .....	26
3.3.1 <b>Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH</b> .....	26
3.3.2 <b>Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ABTS</b> .....	27
3.3.3 <b>Avaliação da atividade antioxidante pelo método de eliminação de radicais superóxido (SOD)</b> .....	27
3.3.4 <b>Avaliação da atividade antioxidante pelo método de fosfomolibdênio</b> .....	28
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i> DE <i>S. obtusifolium</i> .....	28
3.4.1 <b>Avaliação da atividade hemolítica</b> .....	28
3.4.2 <b>Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT</b> .....	29
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE <i>IN VITRO</i> DE <i>S. obtusifolium</i> .....	30
3.6 ENSAIO TOXICOLÓGICO NÃO CLÍNICO AGUDO.....	30
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
<b>4 ANÁLISE DOS DADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32

4.1 OBTENÇÃO E RENDIMENTO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE	
<i>S. obtusifolium</i> .....	32
4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE <i>S. obtusifolium</i> .....	33
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DE	
<i>S. obtusifolium</i> .....	35
<b>4.3.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH</b> .....	36
<b>4.3.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ABTS</b> .....	36
<b>4.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de eliminação de</b>	
<b>radicais superóxido (SOD)</b> .....	37
<b>4.3.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de</b>	
<b>fosfomolibdênio</b> .....	37
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i> DE	
<i>S. obtusifolium</i> .....	38
<b>4.4.1 Avaliação da atividade hemolítica</b> .....	38
<b>4.4.2 Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT</b> .....	39
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE <i>IN VITRO</i> DE	
<i>S. obtusifolium</i> .....	41
4.6 ENSAIO TOXICOLÓGICO NÃO CLÍNICO AGUDO.....	44
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	48
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49
<b>ANEXO A – FICHA DE APROVAÇÃO CEUA</b> .....	63

## 1 INTRODUÇÃO

Espécies reativas (ER) estão constantemente expondo os organismos vivos a sua ação, levando à modificação de moléculas biológicas e danos em diferentes escalas (RIZZO, 2010). Esses agentes oxidantes são mais frequentemente encontrados na forma de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) que surgem na maioria das vezes do rompimento da homeostase celular (RIZZO, 2010; LUSHCHAK, 2014).

Em contrapartida, os sistemas antioxidantes são responsáveis por atrasar ou inibir o dano oxidativo ocasionado pelas ERs através da estabilização dessas moléculas (KIRSCHWENG, 2017). Esses sistemas podem ser classificados como: não enzimáticos, como exemplo os flavonoides e o ácido ascórbico; ou enzimáticos, tais como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (SHALABY; SHANAB, 2013; IGHODARO; AKINLOYE, 2018). A disponibilidade de antioxidantes influencia a resposta de diferentes células ao estresse oxidativo que é o resultado do desequilíbrio entre a quantidade de compostos oxidantes e antioxidantes, favorecendo a maior quantidade de ERs (SHINDE, 2012).

As ERs podem ser provenientes tanto de fatores exógenos quanto endógenos. Os fatores exógenos incluem agentes químicos e radiações, enquanto que os endógenos têm relação com o metabolismo celular e em decorrência de condições patológicas, como na formação de úlceras de pressão (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006; RANI, 2016; MOTEGI et al., 2017).

A cicatrização é definida como uma coordenada cascata de eventos moleculares, bioquímicos e celulares que interagem entre si para o conserto de uma descontinuação tecidual (HAN; CEILLEY, 2017). Esse processo pode ser dividido em três etapas que se relacionam: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação (GURTNER et al., 2008). Ao longo dessas fases, há o envolvimento de uma grande variedade de células que visam estacionar a inflamação, diminuir o dano oxidativo e restaurar a integridade do tecido (REINKE; SORG, 2012; DREIFKE; JAYASURIYA; JAYASURIYA, 2015; MEDEIROS; DANTAS-FILHO, 2016).

A maioria dos fármacos cicatrizantes é conhecida por causar efeitos adversos aos usuários e muitas vezes não conseguem ser eficientes, tendo em vista as particularidades de cada caso (YU et al., 2017; ALAZZOUNI et al., 2020). A fim de diminuir esses riscos, o estudo do processo cicatricial tem se tornado cada vez mais

relevante, visto que ainda é alto o percentual de pessoas que necessitam de um tratamento imediato e eficiente (HAN; CEILLEY, 2017; MADMOLI et al., 2019).

A utilização de plantas na medicina popular é uma prática milenar e ainda hoje bastante comum em regiões mais pobres do Brasil, onde, na maioria das vezes, é o único recurso terapêutico dessas comunidades como alternativa à medicina moderna (BESSA et al., 2013). Essas plantas constituem fontes naturais de diversas substâncias com potencial farmacológico. Essa riqueza de compostos fundamenta a exploração das espécies vegetais para fins de cura e prevenção de doenças (VELU; PALANICHAMY; RAJAN, 2018).

Plantas da Caatinga têm se mostrado promissoras fontes de compostos bioativos, devendo isso às condições ambientais extremas em que se encontram. Essa influência de fatores bióticos e abióticos do meio impõem esses organismos alterações adaptativas, tanto a nível morfológico como metabólico. Por isso, muitas espécies têm sido utilizadas pelos povos tradicionais para o tratamento de doenças (BESSA et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2019). Essa utilização se faz na forma de extratos botânicos que podem possuir atividades antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante devido à presença de compostos do metabolismo secundário vegetal em sua constituição, como alcaloides, terpenos, flavonoides e esteroides (ERTANI et al., 2016).

*Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T. D. Penn é uma planta medicinal da família Sapotaceae, conhecida popularmente como "quixabeira" ou "rompe-gibão" que é amplamente distribuída no bioma Caatinga. A casca dessa espécie, seu órgão mais explorado, é usada na medicina popular para o tratamento de inflamações, lesões, cicatrização de feridas, limpeza de feridas uterinas (ALBUQUERQUE et al., 2007; BARBOSA et al., 2020). Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar as atividades antioxidante e cicatrizante *in vitro*, além do efeito toxicológico das folhas de *S. obtusifolium*.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar as atividades antioxidante e cicatrizante *in vitro*, além da segurança de uso dos extratos brutos das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T. D. Penn.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter os extratos em acetato de etila, etanol e metanol das folhas de *S. obtusifolium*;
- Realizar o *screening* fitoquímico e determinar os teores de fenóis totais, taninos totais e flavonoides totais dos extratos das folhas de *S. obtusifolium*;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos das folhas de *S. obtusifolium* pelos métodos de sequestros dos radicais livres DPPH e ABTS, eliminação dos radicais superóxido (SOD) e capacidade antioxidante total (CAT);
- Determinar a capacidade hemolítica dos extratos das folhas de *S. obtusifolium*;
- Estudar o potencial cicatrizante *in vitro* dos extratos das folhas de *S. obtusifolium*;
- Avaliar a toxicidade aguda não clínica do extrato mais ativo das folhas de *S. obtusifolium*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

Os processos inflamatórios, como os que acontecem na formação de úlceras, envolvem prioritariamente a liberação de espécies reativas (ERs) (LÓPEZ-DELIS, 2018). Os radicais livres são exemplos dessas moléculas, capazes de capturar elétrons de outras moléculas estáveis e causar sua desestabilização. Radicais livres são produzidos em diversas reações fisiológicas, tendo um curto período de vida, podem desencadear danos aos sistemas biológicos pela sua interferência nas reações químicas (VALKO, 2007; FIRUZI, 2011).

É conhecido que na natureza as substâncias que têm destaque na produção de radicais livres são o oxigênio ( $O_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o óxido nítrico (NO), este último pode ser encontrado tanto no ar atmosférico, quanto sintetizado por inúmeras células, dentre elas os neutrófilos (HENSLEY; FLOYD, 2002). Estas células geram Espécies reativas de oxigênio (EROs) principalmente quando atuam na interceptação de agentes infecciosos, como bactérias e vírus (HALLIWELL, 2009; BABIOR, 2004). Entretanto, a ER mais nociva para os sistemas biológicos é o  $OH^-$ , por ser altamente reativo e possuir um período curto de meia vida (BEHNEN, 2017).

Ao serem produzidas, as ERs podem afetar o funcionamento do organismo provocando alterações que desencadeiam quadros inflamatórios, danos ao DNA, proteínas e lipídios, entre outras desordens (MURATA, 2018).

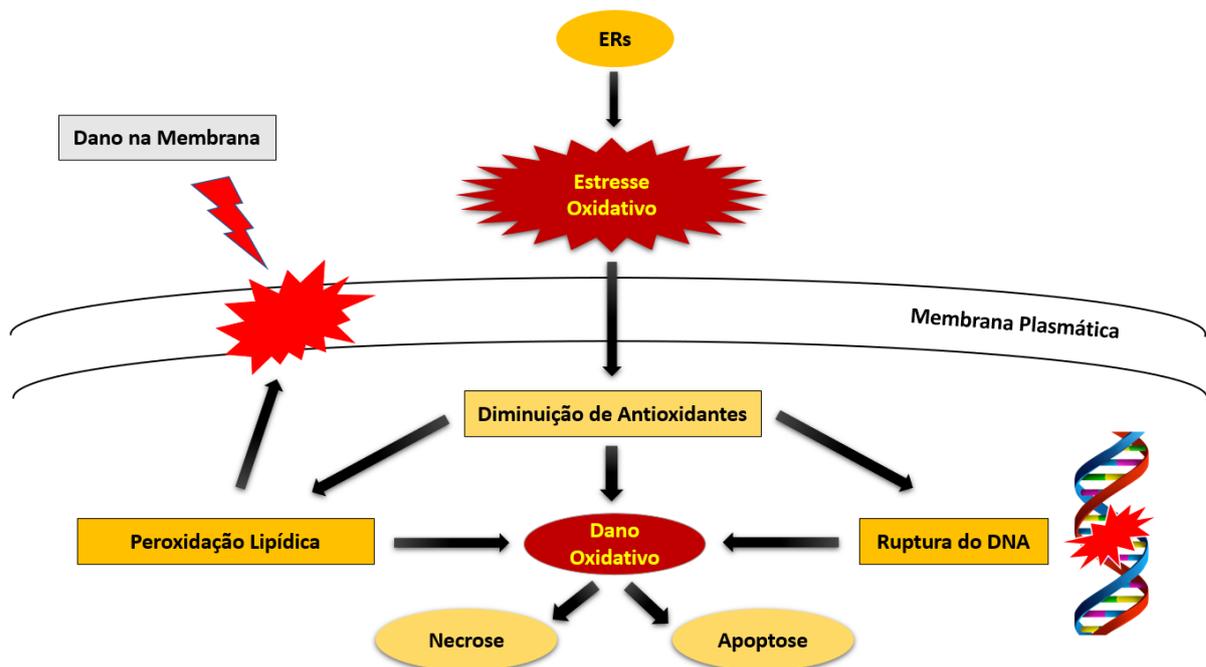
A peroxidação lipídica, por exemplo, pode causar efeitos negativos diretos nas funções celulares, causando citotoxicidade e mutagenicidade. Alterações em nível de membrana interferem na permeabilidade, causando a perda da seletividade de vários nutrientes e modificando sua matriz extracelular (GASCHLER; STOCKWELL, 2017; PAN et al., 2019).

Por outro lado, algumas moléculas possuem a capacidade de doar elétrons de sua estrutura para estabilizar outras moléculas instáveis, sendo por isso conhecida como antioxidantes. Esses compostos podem ser divididos por meio do seu comportamento em enzimáticos ou não enzimáticos (SHALABY; SHANAB, 2013). Grande parte dos antioxidantes não enzimáticos podem ser obtidos através da dieta, principalmente de vegetais folhosos, sendo os polifenóis a classe mais

presente. Outras classes que se destacam são as vitaminas C e E, de extrema importância na alimentação humana (JAKUBCZYK et al., 2020).

Do lado dos antioxidantes enzimáticos, a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) têm maior representatividade por estarem presentes em todas as células do corpo (SHALABY; SHANAB, 2013; IGHODARO; AKINLOYE, 2018). A SOD é uma metaloproteína que produz o peróxido de hidrogênio por meio da metabolização do radical superóxido pelo processo de dismutação. A catalase, por sua vez, converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Ela se encontra nos peroxissomos e algumas outras organelas, como mitocôndrias e retículo endoplasmático (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Quando há um desequilíbrio na quantidade de agentes oxidantes em detrimento dos antioxidantes é dito que há um “estresse oxidativo” (SHINDE, 2012) (Figura 1).

**Figura 1:** Danos celulares induzidos pelo estresse oxidativo



**Fonte:** Modificado de Finosh e Jayabalan (2013).

Esse quadro pode ser causado por diversos fatores, dentre eles estão as infecções virais ou bacterianas e os processos inflamatórios (RANNEH et al., 2017). Durante as inflamações, os radicais livres ativam um vasto número de células e, em baixos níveis, eles conseguem ativar a migração e proliferação a fim de combater o

quadro. Entretanto, quando em atividade exacerbada, o estresse oxidativo se comporta de forma pró-inflamatória e pode beneficiar patogêneses e levar à morte de várias células (WANG et al., 2016; RANNEH et al., 2017). Essa influência negativa é responsável por desestabilizar vários mecanismos fisiológicos do organismo, incluindo processos cicatriciais, por envolverem a atividade de uma variedade de células que podem ser eventualmente prejudicadas (SONEJA; DREWS; MALINSKI, 2005).

## 2.2 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização tem como base a interação entre eventos a níveis celular e molecular, sendo esses processos que vão culminar na reconstituição tecidual por meio da reepitelização. Esse caminho de reparação percorrido é resultado do esforço dos tecidos para restaurar a integridade estrutural até o seu estado normal, com as suas devidas funções recuperadas, e para isso é necessário que haja um aumento na migração e divisão celular, mediadas por fatores de crescimento (REINKE; SORG, 2012; EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; DREIFKE; JAYASURIYA; JAYASURIYA, 2015).

Esse esforço leva o organismo a voltar suas atenções integralmente para o reparo desse evento danoso, sendo primordial que tudo ocorra fisiologicamente bem, pois qualquer comprometimento pode influenciar no tempo de cicatrização e na presença de possíveis complicações, interferindo diretamente na qualidade da cicatriz (MENON et al., 2012; XUE; JACKSON, 2015). O surgimento de feridas crônicas é comum, justamente em razão da falha de um desses mecanismos, principalmente na interação entre células que leva uma descompensação na produção de componentes da matriz celular (MENON et al., 2012).

Por sua complexidade, que envolve grande atividade quimiotática, ação de mediadores químicos e vascularização extensa, a cicatrização pode ser dividida em três fases, respectivamente: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação (Figura 2) (GURTNER et al., 2008).

A fase inflamatória é iniciada no exato momento em que ocorre o trauma e pode ser caracterizada pela tentativa do tecido em limitar a lesão. Após o extravasamento sanguíneo pelos vasos comprometidos, inicia-se o processo de

coagulação com a ativação plaquetária, levando à produção da matriz de fibrina que forma uma barreira protetora contra a entrada de agentes infecciosos e impermeabiliza a ferida (ALTIOK; ALTIOK; TIHMINLIOGLU, 2010). Por outro lado, mediadores vasoativos como as prostaglandinas, epinefrina e serotonina impedem que a perda do sangue seja mantida, cenário que se torna favorável para a diapedese, o principal evento dessa fase (BUSTI, 2005). O efluxo de leucócitos para o local de lesão é mediado pela ação de vasodilatadores como a histamina, bradicinina e serotonina, e tem por finalidade a remoção do tecido necrótico, resíduos e bactérias que possam existir no local (DUNNILL et al., 2017). Outro sinalizador que tem função tão importante quanto os anteriores é a prostaglandina que auxilia também no recrutamento leucocitário, influenciando na divisão celular e favorecendo a produção de exsudato (MENDES et al., 2018).

Os polimorfonucleares, células envolvidas no processo de cicatrização, têm uma função antimicrobiana importante na fase inflamatória ao agirem contra a ação de bactérias (MEDEIROS; DANTAS-FILHO, 2016). Os neutrófilos são recrutados para a região lesionada em motivo da degranulação das plaquetas ao liberar o fator plaquetário 4 (PF4) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; BEAR; HAUGH, 2014). Essas células possuem atividade antibacteriana específica que, ao fagocitar esses invasores, liberam mediadores inflamatórios e EROs. A síntese de NO influenciada pelos neutrófilos resulta no recrutamento de monócitos que, por sua vez, se diferenciam em macrófagos (REINKE; SORG, 2012; MEDEIROS; DANTAS-FILHO, 2016).

Os macrófagos, apesar de atuarem na fagocitose, também desempenham outro papel importante, sendo fonte de vários fatores de crescimento promotores da proliferação e migração celular no processo cicatricial, como os fatores de crescimento transformador alfa (TGF-  $\alpha$ ) e beta (TGF-  $\beta$ ); fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; BEAR; HAUGH, 2014).

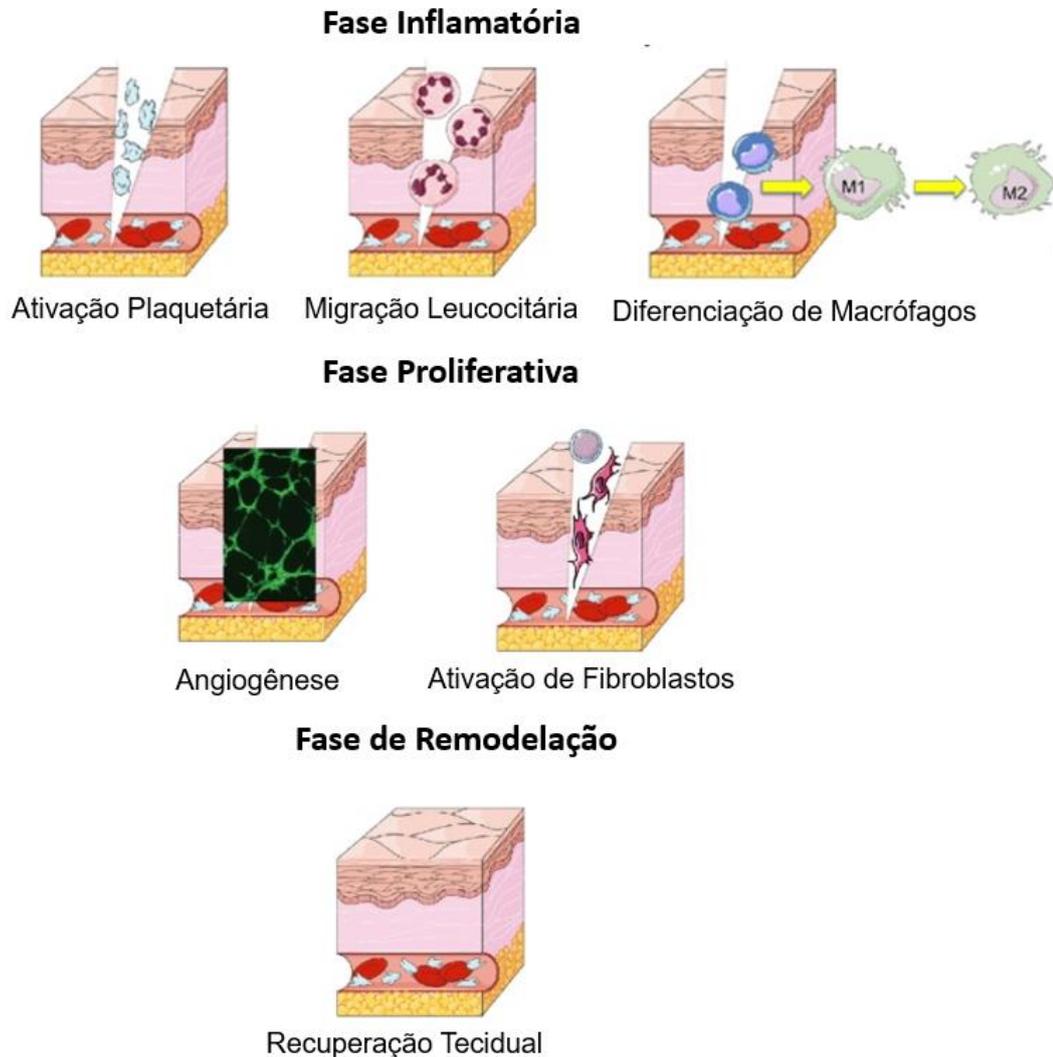
A fase de proliferação, segunda fase da cicatrização, é caracterizada pelo processo de fibroplasia, o qual abriga a síntese da matriz extracelular e a formação do tecido de granulação, podendo por isso também ser conhecida como fase de granulação (DREIFKE; JAYASURIYA; JAYASURIYA, 2015). Isso desencadeará outras etapas do desenvolvimento, como a angiogênese e a reepitelização. Nesse

processo, prevalecem os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF2) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (ZHANG et al., 2018; BARRIENTOS et al., 2008).

Em função da perda da irrigação vascular causada pela descontinuação do tecido, a área lesionada sofre com a hipóxia. Por isso, a angiogênese, estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ), é considerada essencial no processo de nutrição do tecido através da produção de novos capilares responsáveis por esse suporte a diversas células, como os fibroblastos (YAN et al., 2010; RODRIGUES et al., 2019;).

Os fibroblastos podem ser considerados umas das células mais importantes da cicatrização. São essas células que, associadas aos novos vasos sanguíneos, são responsáveis por formar o tecido de granulação por meio da substituição da matriz fibrinosa que serve de substrato para a migração de queratinócitos (RODRIGUES et al., 2019). Ao sintetizar os componentes da matriz, os fibroblastos depositam principalmente colágeno na sua estrutura, enquanto os queratinócitos produzem queratina para restaurar a função protetiva do epitélio (GRINNELL, 1994). A velocidade da reepitelização dependerá do nível de comprometimento da membrana basal, pois caso esteja lesionada, vai ocorrer um esforço de restauração da barreira protetora por meio da proliferação celular (Figura 2) (GAO et al., 2013).

**Figura 2:** Principais fases e eventos do processo cicatricial.



**Fonte:** Modificado de Cancedda et al. (2017).

Na última fase, a de remodelação tecidual ou fase de maturação, o processo cicatricial será finalizado com a diminuição do eritema. Essa fase é conhecida pela reorganização das fibras colágenas para substituição do tecido de granulação (KONDO; ISHIDA, 2010). Esse processo se dá pela troca do colágeno do tipo I para o tipo III, tendo assim uma elevada atuação de fibroblastos que acabam por integrar o espaço antes ocupado por células inflamatórias (DIEGELMANN; EVANS, 2004). Posteriormente, a quantidade de fibroblastos diminui, assim como o tecido de granulação. Esses acontecimentos levam à formação de cicatriz acelular revestida por epiderme, agora tomando o espaço da lesão inicial (LORDANI, 2018).

Na atualidade, os tratamentos para as lesões e úlceras dependem do tipo e características das mesmas, podendo se resumir à formulações semissólidas quando em caso de feridas cutâneas, além de curativos que favoreçam o ambiente ideal para cicatrização (PROKSCH et al., 2017).

Diante disso, o presente trabalho buscou avaliar as atividades antioxidante e cicatrizante *in vitro* e a segurança de uso de *S. obtusifolium*, visando confirmar suas indicações etnofarmacológicas.

### 2.3 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

O uso de plantas com fins medicinais é uma das práticas mais antigas da humanidade, considerado o primórdio da medicina moderna, pois era dessa forma que o homem cuidava da sua saúde inicialmente. Essa é uma prática que perdura até hoje, passada empiricamente de geração em geração, desde os tempos pré-históricos (PIRES et al., 2014).

As espécies vegetais são fontes de compostos biologicamente ativos, tornando-as alvo de exploração pelas comunidades tradicionais para o tratamento de diversas doenças, principalmente de países em desenvolvimento (PIRIZ et al., 2013). Esse é um fator que chama a atenção da terapêutica para o auxílio nos cuidados primários de saúde, compatível com a medicina convencional, tendo em vista os insatisfatórios desempenhos que a grande maioria dos fármacos sintéticos apresenta na forma de efeitos adversos em seus usuários (GOLENIOWSKI et al., 2006; SAHOO et al., 2010).

É nesse cenário que o mercado de produtos fitoterápicos ganha destaque, como uma alternativa mais branda nos cuidados com a saúde. Os fitoterápicos, também conhecidos como fitomedicamentos, podem ser definidos como medicamentos que usam plantas medicinais como base da sua formulação, utilizados extratos vegetais com a mistura de vários componentes da forma natural da planta. Em contrapartida, o uso de componentes ativos isolados das plantas medicinais para a formulação farmacêutica é denominado fitofármaco (DUTRA et al., 2016; MARTINS et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018).

Com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), o uso da fitoterapia começou a ter maior atenção dos pesquisadores com o intuito de diminuir o alto custo dos remédios e a toxicidade dos mesmos, uma vez que medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais possuem menos efeitos adversos e são de fácil acesso. É de extrema relevância a implementação dessa política no SUS para que se abram perspectivas da criação de métodos alternativos no tratamento dos usuários (BRASIL, 2006). Inúmeros estudos científicos vêm sendo feitos no sentido de validar as informações populares referentes ao uso de plantas medicinais com o objetivo de descobrir novos princípios ativos (RODRIGUES et al., 2016).

Apesar da importância do potencial terapêutico das plantas medicinais, as pesquisas sobre sua comprovação farmacológica e segurança de uso ainda não são ideais (CALIXTO et al., 2005). Mesmo o Brasil sendo detentor de uma rica biodiversidade, desconhece o valor econômico de seus recursos botânicos e são necessários mais estudos farmacológicos (DUTRA et al., 2016).

Entretanto, apesar do uso de produtos naturais apresentarem menor risco do aparecimento de efeitos adversos, o uso irregular pode acarretar em problemas aos usuários. Não é difícil encontrar relatos na literatura de acidentes envolvendo o uso de plantas medicinais, especialmente se estas não foram corretamente estudadas e identificadas (DA TRINDADE; DA SILVA; SETZER, 2018). Esses problemas se devem ao fato de que a grande maioria das espécies vegetais, apesar de serem benéficas quando corretamente utilizadas, produzem substâncias que podem ser agressivas para a maioria dos seres vivos (LEGOUIN et al., 2017).

Estudos visando avaliar os efeitos toxicológicos das plantas são de grande importância como base para o uso seguro e correto das espécies na terapêutica, visto que o potencial farmacológico delas é extremamente vasto para a saúde em geral (RUPPENTHAL, 2013). Para isso, a maioria das pesquisas leva em consideração a análise de diversos fatores envolvidos para a segurança de uso, como a dose usada, a via e frequência de administração e a forma de utilização. São todos elementos que, se corretamente estudados, se tornam potencializadores dos efeitos benéficos ao organismo, diminuindo os perigos ao usuário (BHARDWAJ; GUPTA, 2012).

## 2.4 FAMÍLIA SAPOTACEA

A família Sapotacea, pertencente a ordem Ericales, é formada por 53 gêneros e mais de 1200 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, com altitudes inferiores à 1000 metros em relação ao nível do mar e com alto índice pluviométrico (GOVAERTS; FRODIN; PENNINGTON, 2001). No Brasil, foram catalogados 14 gêneros com cerca de 200 espécies, com maior ocorrência na Região Nordeste, mas também podem ser encontradas na Floresta Amazônica e em menor quantidade na Mata Atlântica (PENNINGTON et al., 1990).

Morfologicamente, a família inclui espécies de arbustos e árvores frutíferos e sementes oleaginosas, com destaque para seus frutos comestíveis e o látex de suas cascas (PENNINGTON; KRUKOFF, 1991). Composto esse que tem grande importância econômica por ser utilizado para a produção de goma comercial. Dentre os gêneros mais importantes pertencentes à família, destacam-se o *Chrysophyllum*, o *Pouteria* e o *Sideroxylon* (SWENSON; ANDERBERG, 2005; ANDERBERG; SWENSON, 2005).

### 2.4.1 Gênero *Sideroxylon*

O gênero *Sideroxylon* consiste em cerca 75 espécies de arbustos e árvores, geralmente espinhosos, distribuídas nas Américas, África e leste Asiático (SWENSON; ANDERBERG, 2005). Apesar da família Sapotaceae apresentar sua população normalmente em regiões subtropicais e tropicais, neste gênero predominam espécies geralmente encontradas em áreas de floresta tropical sazonalmente secas da África, bem como regiões áridas e semi-áridas, como o bioma Caatinga, presente em todo Nordeste brasileiro (AUBRÉVILLE, 1965).

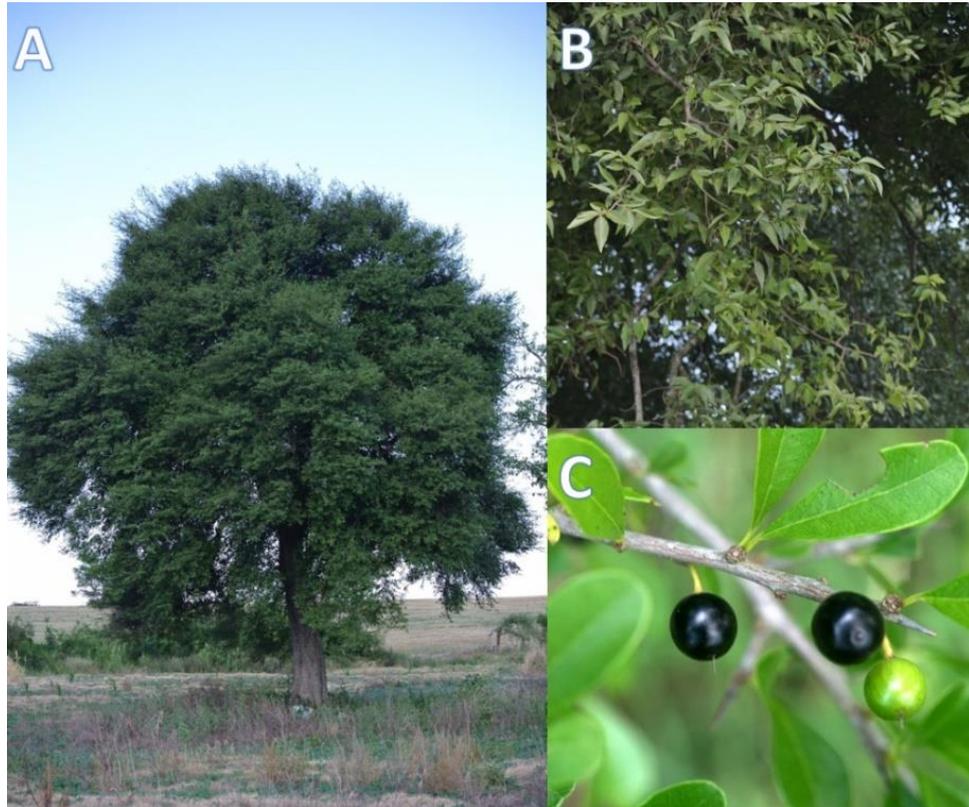
Existem poucas pesquisas farmacológicas sobre esse gênero, embora haja relatos na literatura envolvendo a presença de compostos bioativos dos metabólitos secundários com valor farmacológico reconhecido, como triterpenos, saponinas e flavonoides. Apesar disso, o potencial medicinal de algumas espécies já foi comprovado cientificamente, através do estudos com as espécies: *Sideroxylon inerme*, *Sideroxylon cubense* e *Sideroxylon obtusifolium* (MOMTAZ et al., 2008; LEITE et al., 2015; JIANG et al., 1994).

### 2.4.2 *Sideroxylon obtusifolium*

*Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex Roem. & Schult.) T. D. Penn. é uma espécie pertencente à família Sapotaceae, conhecida popularmente como quixabeira, maçaranduba-da-praia, rompe-gibão, sapotiaba, coronilha, entre outros (DA SILVA; DANTAS, 2017). Anteriormente catalogada como *Bumelia sartorum*, esta espécie é uma planta com ampla distribuição geográfica da América Central à América do Sul, correndo também em território brasileiro (LORENZI; MATOS, 2008).

No Brasil, possui grande densidade populacional em áreas de Cerrado, mas principalmente no bioma Caatinga, apesar de ser encontrada também na Mata Atlântica e em praticamente todas as regiões brasileiras (Norte, Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul) (CARNEIRO et al., 2015). Estruturalmente, *S. obtusifolium* é uma planta de porte arbóreo, com casca áspera superficialmente fissurada e galhos espinhosos. Suas folhas são do tipo coriáceas, geralmente em disposição oposta e as flores se apresentam em aglomerados com coloração verde-amarelas. Seu fruto do tipo drupa com sementes normalmente globosas é muito consumido por populações tradicionais e pela fauna local, caracterizando a planta com um elevado valor econômico (Figura 3) (PENNINGTON, 1990; SILVA et al., 2012).

**Figura 3:** A - *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). B – Folhas coriáceas. C - Frutos verdes e maduros.



Fonte: Tropical.theferns.info (2014).

A espécie possui um valor etnofarmacológico importante, pois sua casca é usada na medicina tradicional para o tratamento de úlceras, gastrite, azia, inflamação, inclusive ovariana, diabetes, na cicatrização de feridas (ALBUQUERQUE, 2007a; ALBUQUERQUE, 2007b; AGRA et al., 2008).

Estudo farmacológicos comprovaram as suas atividades antioxidante (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005), anti-inflamatória (ARAUJO-NETO et al., 2010), antimicrobiana (NETO et al., 2017) e hipoglicemiante (NAIK et al., 1991). Essas propriedades farmacológicas estão, muito provavelmente, atreladas à presença de metabólitos secundários em sua composição. Na literatura, já foram descritas a presença de taninos, flavonoides e triterpenos (OLIVEIRA et al., 2012).

### 3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *S. obtusifolium*

As folhas da *S. obtusifolium* foram coletadas no município de Ingá (7° 14' 17" Sul, 35° 36' 57" Oeste – 247 m), zona metropolitana de Itabaiana, estado da Paraíba, e foi identificada e depositada no Herbário UFP - Geraldo Mariz, localizado no centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, sob o número de tombamento 84.225. O material foi submetido à secagem em estufa a 40 °C por um período de 14 dias e, em seguida, triturado com o auxílio de um moinho de facas. Para obtenção dos extratos acetato de etila (EASo), etanólico (EESo) e metanólico (EMSo), foram utilizadas 150 g do material vegetal para 1 L de cada solvente em ordem crescente de polaridade (acetato de etila, álcool etílico e álcool metílico, respectivamente), através do processo de maceração a temperatura ambiente durante 72 h. Em seguida, os filtrados foram logo depois concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida, a temperatura entre 40-50 °C e secados em dessecador. Calculou-se o rendimento total dos extratos, de acordo com a fórmula:  $Re = (M_{extrato}/M_{folhas}) \times 100$ . Sendo Re = Rendimento total do extrato (%);  $M_{extrato}$  = Massa do extrato rotaevaporado (g);  $M_{folhas}$  = Massa do pó utilizado na preparação do extrato.

#### 3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE *S. obtusifolium*

A análise do perfil fitoquímico foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), segundo metodologia descrita por Wagner e Bladt (2009). Uma amostra de cada extrato na concentração de 10 mg/mL foi aplicada em placas cromatográficas de sílica gel 60 (0,20 mm) como fase fixa e solventes orgânicos como fase móvel pré-selecionados. Após a corrida cromatográfica, as placas foram irradiadas com luz UV 365 nm e reveladas, utilizando reagentes específicos de acordo com a classe de metabólitos pesquisados: flavonoides, triterpenos, esteroides, mono e sesquiterpenos, alcaloides, taninos condensados e taninos hidrolisáveis. Os padrões e reveladores químicos utilizados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Padrões e reveladores químicos.

<b>Metabólitos</b>	<b>Padrões</b>	<b>Reveladores</b>	<b>Fase móvel/Proporção</b>
Taninos condensados	Catequina	Vanilina clorídrica	Acetato de Etila: Ácido Fórmico: Ácido Acético glacial: Água (100:11:11:27 v/v) Acetato de Etila: Tolueno: Ácido Fórmico (10:3:1 v/v)
Taninos hidrolisáveis	Ácido gálico	Alumínio de ferro a 1%	Fórmico (10:3:1 v/v)
Alcaloides	Pilocarpina	Dragendorff	Acetato de Etila: Ácido Fórmico: Ácido Acético glacial: Água (100:11:11:27 v/v)
Flavonoides	Quercetina	NEU	Acetato de Etila: Ácido Fórmico: Ácido Acético glacial: Água (100:11:11:27 v/v)
Triterpenos e esteroides	$\beta$ -sitosterol	Liebermann -Burchard	Tolueno: Acetato de Etila (90:10 v/v)
Mono e sesquiterpenos	Timol	Anisalaldeído sulfúrico	Tolueno: Ácetato de Etila (97:3 v/v)

### 3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE *S. obtusifolium*

#### 3.3.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH

A avaliação da atividade antioxidante do *S. obtusifolium* pelo método de sequestro de radicais livres foi medida por doação de hidrogênio utilizando o radical estável DPPH (BLOIS, 1958).

As medições foram realizadas em triplicata, utilizando 250  $\mu$ L da solução de DPPH (1 mM) a 40  $\mu$ L de diferentes concentrações dos extratos (31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1.000  $\mu$ g/mL). As soluções foram deixadas em repouso 30 minutos, ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. Logo após, a absorbância foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 517 nm e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de DPPH removida. Um análogo de vitamina E (Trolox-Sigma-Aldrich, Alemanha) e BHT (Sigma-Aldrich, Alemanha) foram usados como padrão. A porcentagem de inibição (%) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

### 3.3.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante do *S. obtusifolium* pelo ensaio ABTS<sup>+</sup> (2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) foi baseada na geração do radical cromóforo catiônico obtido da oxidação de 7 mM de ABTS com 140 mM de persulfato de potássio, os quais foram incubados à temperatura ambiente e na ausência de luz por 12-16 h (tempo necessário para a formação do radical). Após este período, a solução foi diluída em etanol até a obtenção de uma solução com absorvância de 0,70 ( $\pm$  0,05) a 734 nm. Sendo assim, foram misturados 30  $\mu$ L de extrato de *S. obtusifolium* com 3 mL da solução, deixados em repouso durante 6 min antes de se medir a absorvância a 734 nm (RE et al., 1999).

Os experimentos foram realizadas em triplicata. Um análogo de vitamina E (Trolox-Sigma-Aldrich, Alemanha) foi utilizado nas concentrações de 100 a 2.00 mM e BHT (Sigma Aldrich, Alemanha) foi usado como padrão. A percentagem de inibição (I%) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{ABTS (\%)} = \frac{\text{Absorvância do controle} - \text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do controle}} \times 100$$

### 3.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de eliminação de radicais superóxido (SOD)

A capacidade antioxidante foi avaliada de acordo com um procedimento modificado baseado em Dasgupta (2004). Uma alíquota de 200  $\mu$ L dos extratos de *S. obtusifolium* foi misturada com 200  $\mu$ L de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), 200  $\mu$ L de metionina 65 mM, 200  $\mu$ L de solução EDTA 0,5 mM, 200  $\mu$ L de cloreto de nitrotetrazolium blue 0,375 mM (NBT) e 200  $\mu$ L de riboflavina 0,5 mM.

Amostras de controle foram preparadas substituindo 200  $\mu$ L de amostra por 200  $\mu$ L de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). A mistura foi incubada sob luz fluorescente durante 15 min e a absorvância lida a 560 nm contra o branco. A atividade sequestradora de radicais livres foi calculada usando a fórmula:

$$\text{SOD (\%)} = \frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

### 3.3.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio

A capacidade antioxidante total foi determinada pelo método do fosfomolibdênio (Prieto et al., 1999). Os extratos foram diluídos em metanol para obter uma solução na concentração de 1 mg/mL. Em seguida, 0,1 mL de cada amostra foi misturada a 1 mL da solução de fosfomolibdênio (ácido sulfúrico 600 mM, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM) e posteriormente incubados a 95 °C por 90 min. As absorbâncias das amostras foram medidas a 695 nm contra um branco (1 mL de solução de fosfomolibdênio e 0,1 mL do metanol).

Utilizou-se ácido ascórbico como referência e a capacidade antioxidante total (CAT) foi expressa como equivalente de ácido ascórbico. A CAT (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{CAT (\%)} = \frac{\text{Absorbância do branco} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do ácido ascórbico} - \text{Absorbância do branco}} \times 100$$

## 3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DE *S. obtusifolium*

### 3.4.1 Avaliação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi realizada em hemácias obtidas do sangue periférico de camundongos. Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina (NaCl 0,9% + CaCl<sub>2</sub> 10 mM) e centrifugados (790 g/5 min). O sobrenadante foi descartado e os eritrócitos foram ressuspensos em solução de NaCl 0,9% para se obter uma suspensão de eritrócitos a 2%.

Este ensaio foi realizado em placas de 96 poços, distribuídos da seguinte forma: 100 µL de solução salina (controle negativo); 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo (branco); 80 µL de solução salina + 20 µL de Triton X – 100 a 1% (controle positivo); 100 µL de solução salina + 100 µL dos extratos separadamente diluídos em DMSO a 10% e distribuídos nos poços. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram distribuídos em todos os poços. Após incubação de 1 h, sob agitação constante à temperatura ambiente, a placa permaneceu em repouso por um período de 1 h, onde o sobrenadante foi transferido para outra placa e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. Amostras com valores de CH% (concentração capaz de hemolisar 50% das hemácias) < 200 µg/mL foram consideradas hemolíticas (COSTA-LOTUFO et al., 2002, com modificações).

#### **3.4.2 Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT**

Células L929 (fibroblastos de camundongos) foram mantidas no BIOFARMATOX do departamento de Antibióticos/UFPE em meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino e 1% antibióticos (penicilina 1000 UI/mL contendo estreptomicina 250 mg/mL e 1% L-glutamina 200 mM), em uma atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. O teste foi realizado pelo ensaio colorimétrico de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], conforme Alley et al. (1988). A linhagem celular estudada na concentração de 10<sup>5</sup> células/ml foi distribuída em uma placa de 96 poços e incubada por 24 h a 37 °C, em estufa enriquecida com CO<sub>2</sub>. Em seguida, as amostras, dissolvidas em DMSO (0,1%), foram adicionadas aos poços nas concentrações de 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL. Após 72 h de reincubação, foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e após mais 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e a doxorubicina foi utilizada como controle.

### 3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE *IN VITRO* DE *S. obtusifolium*

Células L929 foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL e cultivadas *overnight* para obter uma monocamada confluenta. Em seguida, foram feitos riscos (*scratch*) usando a ponta de uma pipeta estéril de 200  $\mu$ L. As células desprendidas foram removidas por lavagem em solução tampão fosfato (PBS).

O meio foi imediatamente substituído por meio fresco contendo 1% de soro fetal bovino e os extratos *S. obtusifolium* nas concentrações escolhidas de acordo com o resultado do teste de citotoxicidade foram adicionados às placas. O controle negativo foi incubado com meio contendo 0,1% de DMSO. As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C em 5% CO<sub>2</sub>. A borda da ferida riscada foi fotografada em três pontos por campo, em vários intervalos de tempo, utilizando um microscópio invertido. Os experimentos foram feitos em triplicata. A área da fenda entre as bordas da ferida foi medida usando o programa *ImageJ*. A percentagem de migração celular foi calculada a partir do tamanho da fenda em 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 e 48 h após a formação da ferida, comparada com a fenda da ferida inicial no tempo zero.

$$\text{Taxa de confluência (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

### 3.6 ENSAIO TOXICOLÓGICO NÃO CLÍNICO AGUDO

Foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas (massa = 30-35g), provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno à temperatura de  $22 \pm 2$  °C, com ciclo claro/escuro de 12 h recebendo ração balanceada e água *ad libitum*. O projeto foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 0052/2020) (Anexo A). Grupos de três camundongos albinos Swiss fêmeas foram submetidos a um jejum 8 h. Os grupos receberam o EESo por via oral (gavagem) na dose de 2000 mg/kg e o grupo controle recebeu água destilada como veículo.

Os animais foram observados nas duas primeiras horas, e uma vez ao dia, até completar 72 h após a administração, pelo método de *screening* hipocrático, com intuito de avaliar alterações comportamentais e fisiológicas (MALONE, ROBICHAUD, 1962).

Durante os 14 dias seguintes foram avaliados o consumo de água, ração, massa corporal e mortalidade. No 14º dia, os animais foram eutanasiados com uma dose anestésica de cetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg) por via intraperitoneal e foi realizada a coleta de sangue, por punção cardíaca, para os exames hematológicos e bioquímicos. Após a eutanásia, foram coletados fígado, rim e baço para observação macroscópica.

O experimento foi repetido, sendo o *n* final igual a 6 animais por grupo (OECD, 2001). A massa relativa dos órgãos foi mensurada pela fórmula (YAM et al., 2009):

$$\text{Massa relativa} = \frac{\text{Massa do órgão}}{\text{Massa do animal}} \times 100$$

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Para comparação múltipla de resultados paramétricos foi utilizado o teste “t” de *Student* e ANOVA, seguido de pós-teste de *Tukey*. Para o ensaio de citotoxicidade, foi utilizado o pós-teste Bonferroni. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$  e os dados foram analisados através do *software GraphPad Prism 7.0*.

## 4 ANÁLISE DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO E RENDIMENTO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *S. obtusifolium*

A partir das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*, foi calculado que o rendimento dos EASo, EESo e EMSo obtidos pelo método de maceração, que foi 2,82%; 2,47% e 2,67%, respectivamente (Tabela 2).

**Tabela 2:** Relação de pesos e rendimentos dos extratos brutos de *S. obtusifolium*.

<i>Sideroxylon obtusifolium</i>	EASo	EESo	EMSo
Massa das folhas (g)	150	150	150
Massa do extrato seco (g)	4,230	3,815	4,013
Rendimento (%)	2,82	2,47	2,67

EASo – extrato acetato de etila de *S. obtusifolium*. EESo - extrato etanólico de *S. obtusifolium*. EMSo – extrato metanólico de *S. obtusifolium*

*S. obtusifolium*, também conhecida como *Bumelia sartorum* ou *Bumelia obtusifolia*, é amplamente utilizada pelas comunidades tradicionais para os cuidados com inúmeras enfermidades, sendo a sua casca a parte mais explorada na medicina popular (ALBUQUERQUE et al., 2007; BELTRÃO et al., 2008; BARBOSA et al., 2020). Entretanto, esse uso significa na maioria das vezes um dano irreparável para a planta, e particularmente para a espécie, e resultou na sua inclusão na lista de plantas ameaçadas de extinção (SANTOS et al., 2018). Em contrapartida, o uso de folhas pela medicina popular para a produção de extratos vegetais é uma prática mais comum. Essa escolha deve-se ao fato desse órgão possuir a maior atividade metabólica em relação aos demais e pela facilidade de reconstituição após a sua coleta (AGRA et al., 2008; LEZOUL et al., 2020).

Para Singh (2008), os extratos vegetais, por se tratarem de misturas complexas, oferecem uma vasta diversidade de compostos bioativos para o desenvolvimento de novas drogas. A extração é um processo físico-químico de transferência de massa que pode ser feita por diversas técnicas. Dentre as mais utilizadas, se destacam a maceração e a infusão que podem fazer uso de solventes orgânicos (ciclohexano, acetato de etila, butanol, etanol) e inorgânicos (metanol e água) (GUNTERO; MANCINI; KNEETEMAN, 2017).

Fariás-Campomanes et al. (2013) afirmaram que o rendimento da extração de compostos das espécies vegetais sofre influência de fatores como: tipo do solvente, temperatura de extração e técnica implementada. A escolha específica do solvente vai indicar quais classes de compostos serão extraídas por sua eficiência na captura de compostos de mesma polaridade (SAFDAR et al., 2017).

Assim, o uso dos extratos brutos das folhas de *S. obtusifolium* por maceração e os solventes utilizados podem fornecer subsídios para a busca de novos compostos bioativos, a fim de confirmar suas atividades farmacológicas.

#### 4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE *S. obtusifolium*

A cromatografia em camada delgada é uma das técnicas mais utilizadas para a identificação qualitativa de compostos vegetais devido a sua simplicidade e ao seu baixo custo, fazendo uso de marcadores e reveladores específicos (CIURA et al., 2017). A análise por CCD apontou que as classes de metabólitos secundários presentes na composição dos extratos de *S. obtusifolium* foram: taninos hidrolisáveis, flavonoides, terpenoides/esteroides, mono e sesquiterpenos (Tabela 3).

**Tabela 3:** Classes de metabólitos secundários presentes nos extratos das folhas de *S. obtusifolium*.

Classe de metabólitos secundários	EASo	EESo	EMSo
Flavonoides	-	++	+++
Triterpenos e esteroides	++	++	++
Mono e sesquiterpenos	+	+	-
Alcaloides	-	-	-
Taninos condensados	++	++	+
Taninos hidrolisáveis	++	++	+

(+++) forte; (++) médio; (+) fraco; (-) ausente

Os polifenóis são compostos do metabolismo secundário das plantas que apresentam uma capacidade redutora em função da sua estrutura, caracterizando uma defesa contra danos oxidativos. Os flavonoides e taninos são os principais compostos fenólicos presentes na dieta humana (MOREIRA et al., 2012). O consumo de compostos fenólicos tem efeito benéfico no tratamento de várias doenças, incluindo desordens inflamatórias, cardiovasculares e oxidativas e câncer (CLERE et al., 2011; SOUZA.; MARCADENTI; PORTAL, 2017; LUTZ et al., 2019).

Taninos são moléculas que possuem alta reatividade com materiais oxidativos e apresentam grande variabilidade de estruturas, sendo os taninos condensados e hidrolisáveis os mais conhecidos (SIENIAWSKA; BAJ, 2017; SHIRMOHAMMADLI; EFHAMISISI; PIZZI, 2018). A grande maioria dos taninos presentes nas plantas têm sido estudados por apresentam diversas atividades farmacológicas, tais como anti-inflamatória, inibidora de peroxidação lipídica, antimicrobiana e antiulcerogênica (FUMAGALLI et al., 2016; KURHEKAR, 2016; POTROKHOV; ZINKOVSKIY; GORBUNOVA, 2020). Segundo Pavini (2019), atividade cicatrizante dos taninos se deve à capacidade de precipitar microproteínas formando uma camada protetora que evita a ação de agentes agressivos, como oxidantes e micro-organismos.

Os flavonoides são um grupo de metabólitos secundários, geralmente presentes em grandes concentrações em algumas plantas. Eles participam de funções importantes no metabolismo vegetal, atuando no desenvolvimento, crescimento e defesa contra herbivoria (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). Os flavonoides são subdivididos nas principais classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonoides (SANTOS et al., 2017; BRAVO, 1998). A atuação desses compostos é mais reconhecida na categoria de antioxidantes, capturando ERs para conferir estabilidade aos radicais formados (DAVID; ARULMOLI; PARASURAMAN, 2016).

Associada a essa capacidade antioxidante, os flavonoides também são conhecidos por outras atividades farmacológicas, como atividades anticâncer, antibacteriana, anti-inflamatória, antitrombótica e contra alterações causadas pelo óxido nítrico (PEREZ-VIZCAINO, 2018; ABOTALEB et al., 2019; MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019). Para essa última atividade, Qian et al. (2017) afirmaram que os flavonoides influenciam na biodisponibilidade de óxido nítrico pelo endotélio. Isso pode causar a inibição da agregação plaquetária e, conseqüentemente, diminuição dos riscos de trombose e favorecimento dos processos de cicatrização (FAGGIO et al., 2017).

Terpenos constituem uma família de substâncias naturais encontradas em sementes, flores, folhas, raízes de plantas. Eles são derivados de isoprenos, uma molécula com 5 átomos de carbono ou unidade C<sub>5</sub>, devendo sua classificação à quantidade de unidades isoprênicas. O terpenos podem ser classificados em

hemiterpenos (C5) monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40), sendo os esteroides modificações de triterpenos (GERSHENZON; KREIS, 2018). Os esteroides e triterpenos são considerados metabólitos secundários de origem natural com capacidades farmacológicas promissoras, em especial por sua atividade anti-inflamatória (ROMERO-ESTRADA et al., 2016; PALIT; MANDAL.; BHUNIA, 2016).

O resultado da análise fitoquímica do presente estudo está de acordo com os achados de Oliveira et al. (2012) que, através da análise por UPLC-PDA-MS, identificou flavonoides como os principais constituintes presentes nas folhas da *S. obtusifolium*. Nakano e Hasegawa (1975) conseguiram isolar triterpenos das partes aéreas da *Bumelia obtusifolia* (*S. obtusifolium*) coletada na Venezuela, dentre eles o lupeol e o taraxerol. Polifenóis também foram achados por Ruela et al. (2011) e Bobach et al. (2014) nos extratos acetato de etila da casca de *S. obtusifolium* (*Bumelia sartorum*). O gênero *Sideroxylon* também tem indicações da presença desses compostos, como confirmou Momtaz et al. (2008) ao identificar flavonoides no extrato metanólico da casca de *Sideroxylon inerme*.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE *S. obtusifolium*

Foram realizadas quatro metodologias diferentes para a análise antioxidante, pois por se tratarem de diferentes métodos, estes podem estar correlacionados ou não, e são considerados complementares ao avaliar a capacidade antioxidante das plantas (PISOSCHI; NEGULESCU, 2011).

##### 4.3.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH

O método de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) é comumente usado para determinar a capacidade antioxidante de plantas e considerado na literatura como um método fácil e econômico. Baseia-se na eliminação de um radical lipofílico livre, havendo uma mudança da coloração púrpura para amarela e seus resultados são expressos pelo valor da  $CI_{50}$  (SIRIVIBULKOVIT; NOUANTHAVONG; SAMEENOI, 2018). O resultado da avaliação antioxidante dos extratos de *S. obtusifolium* pelo método de sequestro de radicais livres DPPH está representado na Tabela 4. Os

valores de  $CI_{50}$  dos extratos foram estimados em  $350,66 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$  para EASo;  $280,62 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$  para EESo e  $95,70 \pm 5,31 \mu\text{g/mL}$  para EMSo, sendo o último o extrato que apresentou melhor resultado neste método em relação aos padrões Trolox ( $51,12 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ ) e BHT ( $266,53 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ ).

#### **4.3.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS**

O teste de captura de radicais livres ABTS (2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) apresenta vantagens em relação as demais testes por ser um teste rápido e estável, podendo detectar a atividade antioxidante em amostras orgânicas e aquosas, extratos vegetais brutos ou compostos isolados. O processo se dá pela oxidação do sal por persulfato de potássio, seguido da perda de cor da amostra (ILYASOV; BELOBORODOV; SELIVANOVA, 2018).

A atividade antioxidante dos extratos das folhas de *S. obtusifolium* para os radicais ABTS, representada na Tabela 4, apresentou os valores médios de  $CI_{50}$  de  $723,18 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$  para EASo;  $482,12 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$  para EESo; e  $1644,00 \pm 107,79 \mu\text{g/mL}$  para EMSo. Comparado aos padrões Trolox ( $112,93 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$ ) e BHT ( $482,38 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ ), o EESo apresentou o melhor desempenho neste teste.

#### **4.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de eliminação de radicais superóxido (SOD)**

A atividade da SOD foi avaliada segundo a capacidade de catalisação da reação entre o ânion superóxido e prótons, resultando em peróxido de hidrogênio (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Para esse método, o resultado da avaliação dos EASo e EESo está descrito na Tabela 4.

#### **4.3.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio.**

Como mostrado na Tabela 4, o método fosfomolibdênio indicou que o EESo foi o mais ativo, com valor de  $CI_{50}$   $349,24 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ . Os padrões utilizados para

esse teste foram o BHT ( $782,91 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ ) e o ácido ascórbico ( $500,00 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$ ).

**Tabela 4:** Análise da atividade antioxidante dos extratos de *S. obtusifolium* pelos métodos de DPPH, ABTS, fosfomolibdênio e SOD.

Extrato	DPPH <sup>+</sup> /Cl <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABTS <sup>+</sup> /Cl <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fosfomolibdênio/ Cl <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	SOD/Cl <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
EASo	$350,66 \pm 0,02$	$723,18 \pm 0,05$	$428,15 \pm 0,01$	$685,29 \pm 0,03$
EESo	$280,62 \pm 0,01$	$482,12 \pm 0,00$	$349,24 \pm 0,01$	$478,29 \pm 0,07$
EMSo	$95,70 \pm 5,31$	$164,4 \pm 107,79$	N.T.	N.T.
Trolox	$51,12 \pm 0,06$	$112,93 \pm 0,00$	N.T.	N.T.
BHT	$266,53 \pm 0,10$	$482,38 \pm 0,01$	$782,91 \pm 0,08$	N.T.
Ácido ascórbico	N.T.	N.T.	$500,00 \pm 0,00$	$723,49 \pm 0,00$

Valores em médias  $\pm$  desvio padrão. EASo – extrato acetato de etila de *S. obtusifolium*. EESo - extrato etanólico de *S. obtusifolium*. EMSo – extrato metanólico de *S. obtusifolium*. BHT – hidroxitolueno butilado. N.T. – Não testado.

Os antioxidantes naturais são intensamente explorados por sua ação através de variados mecanismos, de forma a conferir defesa contra o ataque de ERs (HASANUZZAMAN et al., 2020). Os metabólitos secundários encontrados nas plantas estão diretamente relacionados a essa capacidade antioxidante. Compostos fenólicos, por exemplo, estão envolvidos principalmente no sequestro de radicais livres, entretanto, eles também podem atuar por outras vias, como os taninos ao se ligarem às proteínas, suprimindo sua atividade enzimática; e os flavonoides, levando a proteção dos efeitos de espécies reativas de oxigênio (ALI et al., 2016; RUVANTHIKA; MANIKANDAN, 2019).

Momtaz (2008) avaliou que uma espécie do gênero *Sideroxylon*, a *Sideroxylon inerme* L., possui uma atividade antioxidante importante através da utilização do extrato metanólico da casca para o ensaio de DPPH. Resultados semelhantes foram observados por Schmeda-Hirschmann et al. (2005) e Ruela et al. (2011) ao avaliarem os extratos metanólicos dos frutos e da casca de *Bumelia sartorum*, respectivamente. Desmarchelier et al. (1999) mostraram que os extratos metanólico e aquoso da casca de *S. obtusifolium* possuem atividade antioxidante relevante sobre a peroxidação lipídica, um mecanismo envolvido na inflamação e formação de úlceras.

A atividade antioxidante dos extratos de *S. obtusifolium* se mostrou promissora. Essa capacidade pode se dever à presença de compostos bioativos confirmados pela análise fitoquímica, como compostos fenólicos.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DE *S. obtusifolium*

Os resultados da citotoxicidade e da atividade hemolítica dos extratos de *S. obtusifolium* estão descritos na Tabela 5 e indicaram baixa toxicidade celular dos extratos em relação ao controle doxorrubicina ( $2,40 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ ).

**Tabela 5:** Valores de  $CI_{50}\%$  (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) em  $\mu\text{g/mL}$  e intervalo de confiança de 95%, realizado pelo teste do MTT após 72 h de incubação e  $CH_{50}$  (concentração capaz de causar hemólise em 50% das hemácias).

Amostras	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CH_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
EASo	> 50	> 200
EESo	> 50	> 200
EMSo	> 50	> 200

##### 4.4.1 Avaliação da atividade hemolítica

A avaliação da capacidade hemolítica pode ser estudada para medir o nível de citotoxicidade de compostos, caracterizando uma etapa importante na triagem *in vitro* de substâncias. Por se tratarem de células de fácil disponibilidade, as hemácias são bons indicadores de efeitos tóxicos causados pela administração de drogas por sua estabilidade mecânica de membrana (PHRUEKSANAN; YIBCHOK-ANUN; ADISAKWATTANA, 2014; ZOHRA; FAWZIA, 2014). Pesquisas apontam que substâncias naturais isoladas podem causar a lise da membrana dos eritrócitos. O rompimento dessa proteção pode levar à desordens fisiológicas associadas ou não ao estresse oxidativo, tais como problemas cardíacos, respiratórios e hepáticos (NSIAH et al., 2011; VO; FUKUSHIMA; MURANAKA, 2017; ZHANG et al., 2018).

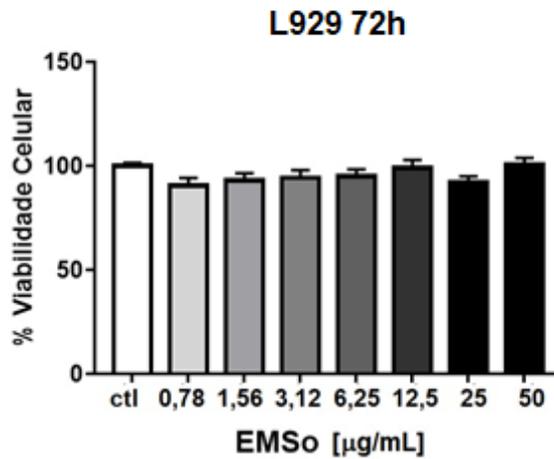
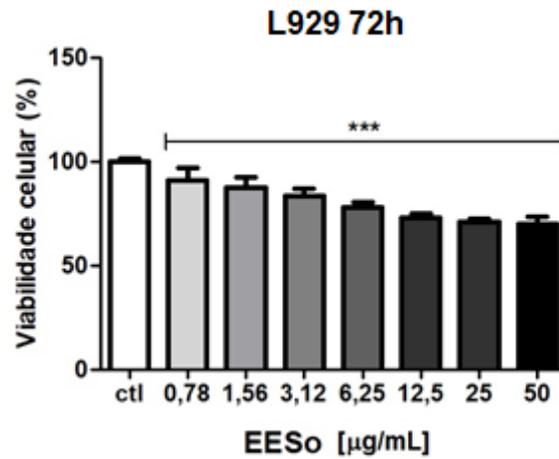
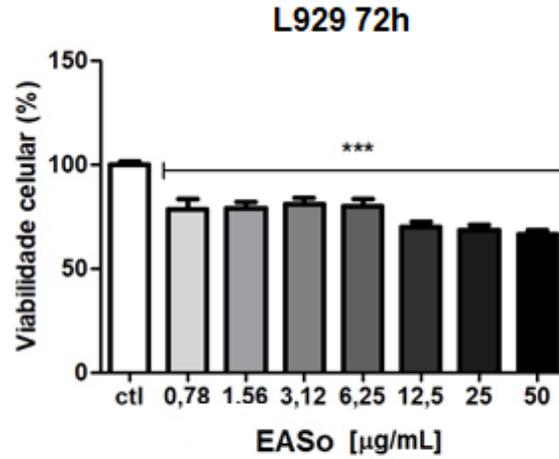
Verificou-se que os EASo, EESo e EMSo apresentaram  $CH_{50}$  superiores a  $200 \mu\text{g/mL}$ , não sendo capazes de induzir hemólise quando comparados ao grupo controle. Esses resultados indicam que os extratos de *S. obtusifolium* possuem baixa capacidade hemolítica nas concentrações testadas, dando margem para a possibilidade da sua utilização em testes *in vivo*.

#### **4.4.2 Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT**

O ensaio de MTT é o método mais comum utilizado para avaliação da citotoxicidade, seja de produtos naturais ou sintéticos. O MTT é um sal de coloração amarela que sofre um processo de redução pela enzima succinato desidrogenase, dentro das mitocôndrias de células viáveis, formando os cristais de formazan, de coloração púrpura. A quantidade de cristais formados é considerada diretamente proporcional ao número de células com metabolismo ativo (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011; BAHUGUNA et al., 2017).

Os resultados do teste de viabilidade celular sobre a linhagem de fibroblastos murinos L929 apontam que, quando comparados ao controle, os EASo e EESo reduziram significativamente a proliferação celular em todas as concentrações testadas ( $p < 0,001$ ), enquanto que o EMSo não diferiu estatisticamente. Os resultados obtidos pelo ensaio colorimétrico de MTT estão representados na Figura 4.

**Figura 4:** Avaliação citotóxica dos extratos EASo, EESo e EMSo de *S. obtusifolium* sobre a viabilidade celular (%) da linhagem fibroblastos L929 após 72 h de tratamento pelo ensaio do MTT



Valores em médias  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle.

Os testes *in vitro* são geralmente utilizados para a triagem inicial de um produto, sendo utilizadas células como alvo para avaliar possíveis níveis danosos (ANKAMWAR et al., 2011). Normalmente, nesse tipo de teste, faz-se uso de linhagens celulares de cultura primária de fácil cultivo e proliferação para analisar alterações de permeabilidade de membrana e apoptose. Podem ser utilizadas as células humanas ou murinas, pois ambas apresentam comportamento similar (LIU et al., 2016). Segundo Rekha & Anila (2019), os fibroblastos L929 são células modelo para ensaios de citotoxicidade por sua rápida facilidade de se proliferar.

Os efeitos citotóxicos de *S. obtusifolium* já haviam sido relatados por Bobach et al. (2014) sobre a linhagem de câncer de próstata LNCaP, onde o extrato acetato de etila da casca inibiu a proliferação dessas células neoplásicas. A fração n-butanol do extrato hidroalcolico das folhas de *S. obtusifolium*, diminuiu a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 e de queratinócitos humanos nas concentrações de 100 e 200 µg/mL (PEREIRA et al. 2016). Entretanto, Souza et al. (2012) ao utilizar o extrato aquoso de *Pouteria torta* indicou que espécies da família Sapotaceae podem ter efeitos proliferativos em queratinócitos HaCat e fibroblastos L929, pelo extrato ter conseguido induzir a proliferação celular em ambas as linhagens.

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que os extratos acetato de etila e etanólico de *S. obtusifolium* apresentaram baixa toxicidade em fibroblastos L929 por apresentar  $CI_{50} > 50$  µg/mL. Esses resultados associados aos dados da literatura asseguram a continuidade dos estudos com a espécie.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE *IN VITRO* DE *S. obtusifolium*

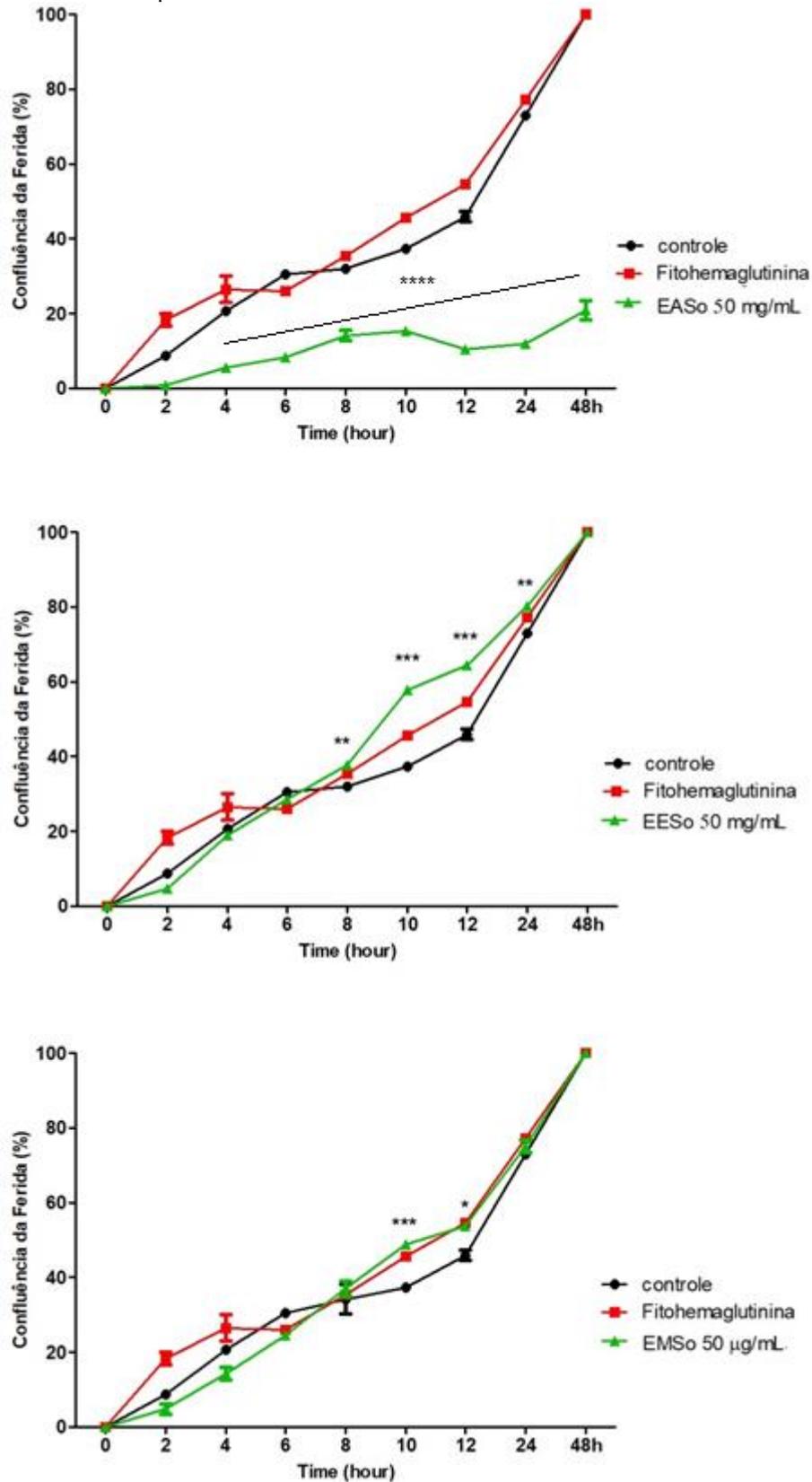
A cicatrização é um processo complexo que exige a atividade cooperativa de diversas células. Para isso, mecanismos de migração celular são ativados pela atividade de sinalizadores celulares e células da matriz extracelular (BALBINO; PEREIRA; CURI et al., 2005; GALLEGO-MUÑOZ et al., 2018). Os fibroblastos são células essenciais para esse processo, pois é por meio deles que são sintetizados inúmeros componentes da matriz extracelular, como o colágeno, que irão servir para restaurar a integridade do tecido após a descontinuidade (PECHERSKY et al., 2016).

A avaliação da cicatrização *in vitro* pode ser realizada pelo método de migração celular ou *scratch*, que consiste na observação da taxa migratória das células após a indução artificial de uma fenda entre as elas, simulando uma lesão (ZHANG et al., 2018; LASOCKA et al., 2018). Para isso, as células ficam dispostas em uma camada única, que se moverem na direção da fenda, a fim de fechá-la. A taxa de confluência é medida por registros fotográficos em intervalos de tempo determinados para posterior cálculo da diminuição da área da fenda em relação ao controle (HU et al., 2019; CHEN; SALISBURY; PERCIVAL, 2019). A fitohemaglutinina normalmente é usada como padrão por se apresentar como um agente mitogênico promissor (FEDERICO et al., 2018).

De acordo com Goetsch e Niesler (2011), o ensaio de migração celular por *scratch*, além de ser um experimento econômico, simula mecanismos de cicatrização *in vivo* por estimular agentes quimiotáticos que são liberados pelas células rompidas. Outro ponto positivo é a precisão na análise morfológica e proteica das células.

O teste de migração celular (Figura 5) avaliado pela porcentagem de confluência dos fibroblastos L929 indicou que, quando comparado à fitohemaglutinina, o EESo mostrou um aumento significativo na taxa de migração celular da 8<sup>a</sup> à 24<sup>a</sup> h com maior atividade nos tempos 10 e 12 ( $p < 0,001$ ). O EMSo proporcionou o aumento da confluência nos tempos 10 h ( $p < 0,001$ ) e 12 h ( $p < 0,01$ ), enquanto que o EASo apresentou uma menor taxa de confluência em relação ao controle negativo.

**Figura 5:** A porcentagem de confluência indica a taxa de fechamento endotelial da lesão em diferentes intervalos de tempo.



Valores em média  $\pm$  desvio padrão. Foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey: \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparados ao controle.

Aquino et al. (2019) avaliaram o efeito cicatrizante do composto N-Metil-(2S,4R)-trans-4-Hidroxi-L-Proline (NMP), um derivado natural da L-prolina isolado das folhas de *S. obtusifolium*. O composto NMP incorporado em um gel induziu a cicatrização das feridas cutâneas de camundongos em até 58% de área, aumentando a proliferação de fibroblastos, matriz extracelular e fibras colágenas. De Aquino et al. (2017) já haviam mostrado que o NMP apresentou atividade anti-inflamatória na atenuação da NO e prostaglandinas. Resultado semelhante ao que o extrato etanólico da casca de *S. obtusifolium* alcançou no estudo de Araujo-Neto et al. (2010)

Segundo Aslam et al. (2018), a presença de flavonoides em extratos vegetais pode significar um bom instrumento para o processo cicatricial em modelos *in vivo*. Essa característica dos flavonoides está relacionada às atividades anti-inflamatórias e antioxidantes dos compostos fenólicos em geral (SILVA et al., 2012; AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016).

Os resultados do teste de migração celular sugerem que *S. obtusifolium* exerce uma importante atividade proliferativa em fibroblastos, podendo potencializar a cicatrização de feridas. Além disso, essa atividade pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos nos extratos da planta.

#### 4.6 ENSAIO TOXICOLÓGICO NÃO CLÍNICO AGUDO

Para o ensaio toxicológico *in vivo*, o EESo foi escolhido com base nos testes *in vitro*. O estudo da toxicidade aguda consiste na administração única de uma dose pré-determinada em animais para posterior avaliação de possíveis alterações comportamentais e fisiológicas, além de índices de mortalidade. Esse teste fornece informações sobre os riscos da exposição aguda à substâncias e seleciona doses para estudos posteriores (AKHILA; SHYAMJITH; ALWAR, 2007; BHARDWAJ; GUPTA, 2012).

O resultado do teste indicou que a DL<sub>50</sub> do EESo é superior a 2000 mg/kg de peso corporal, sendo classificado na categoria 5 de toxicidade, segundo a *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (GHS) (OECD, 2001).

Os animais que receberam EESo por via oral na dose de 2000 mg/kg não apresentaram sinais de toxicidade durante a monitoração diária e não foi registrada mortalidade. O ganho de massa corporal foi significativamente maior para os animais do grupo tratado ( $p < 0,0001$ ) em relação ao controle e também foi constatada alteração na massa dos fígados ( $p < 0,05$ ) e baços dos animais desse grupo ( $p < 0,01$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6:** Efeitos da administração aguda do extrato etanólico de *S. obtusifolium* (EESo) na dose de 2000 mg/kg sobre a massa corporal, o consumo de ração, ingestão hídrica e o índice de órgãos dos animais durante 14 dias.

Parâmetros	Controle	EESo 2000 mg/kg
Consumo de ração (g)	31,3 ± 2,47	34,1 ± 5,03
Consumo de água (mL)	19,5 ± 1,22	19,2 ± 1,15
Ganho de massa corporal (g)	3,16 ± 1,07	6,66 ± 1,93****
Índice de órgãos (g/g)		
Fígado	7,02 ± 0,53	6,22 ± 0,33*
Rim esquerdo	0,61 ± 0,09	0,55 ± 0,04
Rim direito	0,64 ± 0,07	0,58 ± 0,03
Baço	0,86 ± 0,11	0,55 ± 0,18**

Valores em média ± desvio padrão (n=6). Análise por teste "t" de Student. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao controle.

Após a realização dos testes de citotoxicidade, a avaliação da segurança de uso pode avançar para a testagem em animais. Os modelos animais são amplamente explorados por suas vantagens ao considerar a farmacocinética e farmacodinâmica em organismos vivos e com o objetivo de simular e proteger a fisiologia humana (BEDNARCZUK et al., 2010; SUN et al., 2010). Os critérios para escolha de espécies se fundamentam em características metabólicas de animais saudáveis, com pesos e idade ideais e de procedência conhecida (BHARDWAJ; GUPTA, 2012). A avaliação de alguns parâmetros, tais como hematológicos, bioquímicos, massa e integridade macroscópicas dos órgãos são de fundamental importância para indicar possíveis alterações fisiopatológicas causadas por substâncias tóxicas na disfunção de reações metabólicas (MUTMAINNA; PURNAMASARI; PARAWANSA, 2019; VARIYA et al., 2019).

Os parâmetros hematológicos do grupo tratado indicaram alterações ( $p < 0,05$ ) na quantidade de hemácias, no percentual de hematócrito e nos níveis de CHCM. A

análise bioquímica não apresentou diferença estatística entre o grupo tratado em relação ao grupo controle. Os dados estão expressos na Tabela 7.

**Tabela 7:** Efeitos da administração aguda do extrato etanólico de *S. obtusifolium* (EESo) na dose de 2000 mg/kg sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos durante 14 dias.

Parâmetros	Controle	EESo 2000 mg/kg
<b>Análise Hematológica</b>		
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	6,00 $\pm$ 2,09	5,35 $\pm$ 1,13
Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	8,63 $\pm$ 0,53	7,91 $\pm$ 0,24*
Hemoglobina (g/dL)	9,53 $\pm$ 2,39	11,03 $\pm$ 1,80
Hematócrito (%)	28,06 $\pm$ 1,95	25,43 $\pm$ 0,87*
VCM ( $\text{fm}^3$ )	32,33 $\pm$ 0,51	32,00 $\pm$ 0,00
HCM (pg)	10,98 $\pm$ 2,55	13,90 $\pm$ 2,03
CHCM (g/dL)	33,78 $\pm$ 7,82	43,30 $\pm$ 6,16*
Linfócitos (%)	90,95 $\pm$ 5,16	93,80 $\pm$ 2,81
Monócitos (%)	6,26 $\pm$ 3,19	3,38 $\pm$ 1,15
Granulócitos (%)	2,78 $\pm$ 2,07	2,81 $\pm$ 1,80
<b>Análise Bioquímica</b>		
TGO/AST (U/L)	68,2 $\pm$ 17,00	76,66 $\pm$ 24,01
TGP/ALT (U/L)	32,2 $\pm$ 13,23	33,66 $\pm$ 12,12
Ureia (mg/dL)	43,8 $\pm$ 3,83	46,83 $\pm$ 5,34
Creatinina (mg/dL)	0,14 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01
Fosfatase alcalina (mg/dL)	101 $\pm$ 15,85	96,33 $\pm$ 11,36
Proteínas totais (mg/dL)	4,84 $\pm$ 0,32	5,10 $\pm$ 0,16

Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n=6). Análise por teste "t" de Student.

\*p<0,05 em relação ao controle.

O ganho de massa corporal elevado dos animais não acompanhado do aumento do consumo alimentar pode referenciar a ativação de mecanismos de estimulação da miogênese, influenciando no ganho de massa muscular (PRATIWI et al., 2018). Já em relação à massa dos órgãos, segundo Papineni et al. (2018), se roedores forem submetidos à substâncias possivelmente tóxicas, elas podem causar certo grau de dano ao órgão-alvo, diminuindo ou aumentando sua massa tanto quanto a razão massa órgão/corpo. No que diz respeito aos parâmetros hematológicos, uma eventual queda no número de hemácias leva à redução da eficiência do transporte de oxigênio, que por sua vez está relacionada a um baixo percentual da relação hematócrito/viscosidade sanguínea (CONNES, 2013). Para Trzeciak e Meissner (2018), a diminuição do CHCM se relaciona com a diminuição da resistência da membrada das hemácias, permitindo alterações de permeabilidade. Apesar disso, na análise macroscópica foi observada a manutenção da integridade tecidual dos órgãos, sendo provável que a administração do extrato

não influencie na integridade das hemácias em maior escala, visto que na avaliação *in vitro* os extratos não induziram hemólise.

As espécies da família Sapotaceae podem ser conhecidas por sua baixa toxicidade na utilização de seus extratos vegetais em testes de toxicidade *in vivo* (KUETE et al., 2006; MBAYA; NWOSU; ONYAYILI, 2007; KYARI et al., 2016; BAFOR et al., 2020). No estudo de toxicidade aguda, realizado por Ruela et al. (2011), os animais que receberam por via intraperitoneal a fração acetato de etila (EtOAc) da casca de *Bumelia sartorum* nas doses de 1500, 1000 e 500 mg/kg apresentaram sedação após a administração e tiveram mortalidade de 100, 80 e 20%, respectivamente, sendo a DL<sub>50</sub> calculada em 777 mg/kg. Anteriormente, Almeida et al. (1985) haviam encontrado efeitos de sedação semelhantes causado pelo extrato etanólico em ratos e camundongos por via oral nas doses de 250-1000 mg/kg. Já as doses de 2000 e 4000 mg/kg, neste mesmo estudo, intensificaram esses efeitos levando ao óbito de animais.

Os resultados toxicológicos desse trabalho somados aos achados da literatura sugerem que a espécie apresenta baixa toxicidade, entretanto, mais testes precisam ser realizados para elucidar sua segurança de uso.

## 5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, é possível concluir que:

- ✓ Os extratos de *S. obtusifolium* contêm taninos hidrolisáveis, flavonoides, terpenoides/esteroides, mono e sesquiterpenos;
- ✓ Todos os extratos de *S. obtusifolium* apresentaram significativa atividade antioxidante *in vitro*, de acordo com os métodos testados;
- ✓ Os extratos das folhas de *S. obtusifolium* apresentaram baixa citotoxicidade e não promoveram de hemólise;
- ✓ Os EESo e EMSO apresentaram atividade cicatrizante *in vitro*;
- ✓ EESo apresentou baixa toxicidade e a DL<sub>50</sub> do EESo é superior a 2000 mg/kg de massa corporal nas condições avaliadas.

## REFERÊNCIAS

- ABOTALEB, M. et al. Flavonoids in cancer and apoptosis. **Cancers**, v. 11, n. 1, p. 28, 2019.
- AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- AKHILA, J. S.; SHYAMJITH, D.; ALWAR, MC Estudos de toxicidade aguda e determinação da dose letal mediana. **Ciência atual** , p. 917-920, 2007.
- ALAZZOUNI, A. S. et al. Comparative histological and histochemical studies between ranitidine and nizatidine in treatment of peptic ulcer with evaluation of their adverse effects on male sex hormones. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 81, n. 1, p. 1-13, 2020.
- ALBUQUERQUE U. P. et al. Medicinal and magic plants from a public Market in northeastern Brazil. **J Ethnopharmacol** 110: 76-91, 2007a.
- ALBUQUERQUE U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007b.
- ALI, M. *et al.* Sucrose-enhanced biosynthesis of medicinally important antioxidant secondary metabolites in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 39, n. 12, p. 1945-1954, 2016.
- ALLEY, M. C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer research**, v. 48, n. 3, p. 589-601, fev.1988.
- ALMEIDA, R. N.; BARBOSA FILHO, J. M.; NAIK, S. R. Chemistry and pharmacology of an ethanol extract of *Bumelia sartorum*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 14, n. 2-3, p. 173-185, 1985.
- ALTIOK, D.; ALTIOK, E.; TIHMINGLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 7, p. 2227-2236, 2010.
- AMBRIZ-PÉREZ, D. L. et al. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1131412, 2016.
- ANDERBERG, A. A.; SWENSON, U. Linhagens evolutivas em Sapotaceae (Ericales): uma análise cladística baseada em dados da seqüência F ndh. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, n. 5, pág. 763-773, 2003.
- ANKAMWAR, B. et al. Biocompatibility of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles evaluated by *in vitro* cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells. **Nanotechnology**, v. 21, n. 7, p. 075102, 2010.

- AQUINO, P. E. A. et al. The anti-inflammatory effects of N-methyl-(2S, 4R)-trans-4-hydroxy-L-proline from *Syderoxylon obtusifolium* are related to its inhibition of TNF-alpha and inflammatory enzymes. **Phytomedicine**, v. 24, p. 14-23, 2017.
- AQUINO, P. E. A. et al. The Wound Healing Property of N-Methyl-(2 S, 4 R)-trans-4-Hydroxy-L-Proline from *Sideroxylon obtusifolium* is Related to its Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions. **Journal of evidence-based integrative medicine**, v. 24, p. 2515690X19865166, 2019.
- ARAUJO-NETO, V. et al. Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex Roem. & Schult.) TD Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 933-938, 2010.
- ASLAM, M. S. et al. Role of Flavonoids as Wound Healing Agent. **Phytochemicals-Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention**, p. 95-102, 2018.
- AUBRÉVILLE, A. **Sapotacées**. Laboratoire de Phanérogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle, 1965.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current opinion in immunology**, v. 16, n. 1, p. 42-47, 2004.
- BAFOR, E. E. et al. acute toxicity profile of the methanolic stem bark extract of *Omphalocarpum procerum* (p. beauv) sapotaceae in mouse models department of pharmacology and toxicology, faculty of pharmacy. **journal of pharmaceutical and allied sciences**, v. 17, n. 1, 2020.
- BAHUGUNA, A. et al. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. Online: Apr 8-2017, 2017.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mechanisms involved in wound healing: a revision. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BARRIENTOS, S. et al. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound repair and regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585-601, 2008.
- Bear, J. E.; Haugh, J. M. Directed migration of mesenchymal cells: where signaling and the cytoskeleton meet. **Current opinion in cell biology**, 30, 74-82, 2014.
- BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, 2010.
- BEHNEN, M. et al. Extracellular acidification inhibits the ROS-dependent formation of neutrophil extracellular traps. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 184, 2017.
- BELTRÃO, A. E. S. et al. *In vitro* biomass production of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem & Schult). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 696-698, 2008.
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M; DI MASCIO, P. Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BESSA, N. G. F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento Vale Verde – Tocantins. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, v.15, n.4, p.692-707, 2013.

BHARDWAJ, S.; GUPTA, D. Study of acute, subacute and chronic toxicity test. **Int J Adv Res Pharm Bio Sci**, v. 2, p. 103-29, 2012.

BLOIS, M. S. Determinações antioxidantes pelo uso de um radical livre estável. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199, 1958.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BUS, S. A. *et al.* Guidelines on the prevention of foot ulcers in persons with diabetes (IWGDF 2019 update). **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 36, p. e3269, 2020.

BUSTI, A. J. et al. Effects of perioperative antiinflammatory and immunomodulating therapy on surgical wound healing. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 25, n. 11, p. 1566-1591, 2005.

CALIXTO, J. B. et al. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert opinion on emerging drugs**, v. 6, n. 2, p. 261-279, 2001.

CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology & therapeutics**, v. 106, n. 2, p. 179-208, 2005.

CANCEDDA, R. et al. Learning from mother nature: innovative tools to boost endogenous repair of critical or difficult-to-heal large tissue defects. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 5, p. 28, 2017.

CARNEIRO, C. E. et al. Sapotaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2015. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

CHEN, R.; SALISBURY, AM.; PERCIVAL, S. L. *In vitro* cellular viability studies on a concentrated surfactant-based wound dressing. **International wound journal**, v. 16, n. 3, p. 703-712, 2019.

CIURA, K. et al. Thin layer chromatography in drug discovery process. **Journal of Chromatography A**, v. 1520, p. 9-22, 2017.

CLERE, N. et al. Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents)**, v. 9, n. 2, p. 62-77, 2011.

CONNES, P. et al. Decreased hematocrit-to-viscosity ratio and increased lactate dehydrogenase level in patients with sickle cell anemia and recurrent leg ulcers. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79680, 2013.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p.1231–1234. 2002.

CRUZ, D. D. et al. Etnobotânica e impacto da atividade extrativa em *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) TD Penn. em uma área semiárida do nordeste do Brasil. **Indian Journal of Traditional Knowledge (IJTK)**, v. 19, n. 3, pág. 604-616, 2020.

DAVID, A. V. A.; ARULMOLI, R.; PARASURAMAN, S. Overviews of biological importance of quercetin: a bioactive flavonoid. **Pharmacognosy reviews**, v. 10, n. 20, p. 84, 2016.

DEMARQUE, D. P. et al. The role of tannins as antiulcer agents: a fluorescence-imaging based study. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 4, p. 425-432, 2018.

DÍAZ-CARO, I.; GARCÍA GÓMEZ-HERAS, S. Incidence of hospital-acquired pressure ulcers in patients with "minimal risk" according to the "Norton-MI" scale. **PloS one**, v. 15, n. 1, p. e0227052, 2020.

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

DREIFKE, M. B.; JAYASURIYA, A. A.; JAYASURIYA, A. C. Current wound healing procedures and potential care. **Materials Science and Engineering: C**, 48, 651-662, 2015.

DU VERNAY, A. J. V. B. et al. The role of kinins in the proliferation of fibroblast primed with TNF in scratch wound assay: Kinins and cell proliferation. **International Immunopharmacology**, v. 65, p. 23-28, 2018.

DUNNILL, C. et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **International wound journal**, v. 14, n. 1, p. 89-96, 2017.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Science translational medicine**, v. 6, n. 265, p. 265sr6-265sr6, 2014.

ERTANI, A. et al. Biological activity of vegetal extracts containing phenols on plant metabolism. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 205, 2016.

FAGGIO, C. et al. Flavonoids and platelet aggregation: a brief review. **European journal of pharmacology**, v. 807, p. 91-101, 2017.

FARÍAS-CAMPOMANES, A. M.; ROSTAGNO, M. A.; MEIRELES, M. A. A. Production of polyphenol extracts from grape bagasse using supercritical fluids: Yield, extract composition and economic evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 77, p. 70-78, 2013.

FEDERICO, C.; GIL, L.; BRUNO, F.. Phosphorylated nucleolar Tau protein is related to the neuronal *in vitro* differentiation. **Gene**, v. 664, n. October 2017, p. 1–11, 2018.

FINOSH, G. T.; JAYABALAN, M. Reactive oxygen species—Control and management using amphiphilic biosynthetic hydrogels for cardiac applications. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2013, 2013.

FIRUZI, O. et al. Antioxidant therapy: current status and future prospects. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 25, p. 3871-3888, 2011.

FUMAGALLI, M. et al. Strawberry tannins inhibit IL-8 secretion in a cell model of gastric inflammation. **Pharmacological Research**, v. 111, p. 703-712, 2016.

GALLEGO-MUÑOZ, P. et al. Human corneal fibroblast migration and extracellular matrix synthesis during stromal repair: Role played by platelet-derived growth factor-BB, basic fibroblast growth factor, and transforming growth factor- $\beta$ 1. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 12, n. 2, p. e737-e746, 2018.

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) LP Queiroz. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2018.

GAO, F. et al. The contribution of melanocytes to pathological scar formation during wound healing. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 6, n. 7, p. 609, 2013.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 482, n. 3, p. 419-425, 2017.

GEORGE BROUGHTON, I. I.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. A brief history of wound care. **Plastic and reconstructive surgery**, 117(7S), 6S-11S, 2006.

GERSHENZON, J.; KREIS, W. Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glycosides and steroid saponins. **Annual Plant Reviews online**, p. 218-294, 2018.

GOLENIOWSKI, M. E. et al. Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 324-341, 2006.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; PENNINGTON, T. D. World checklist and bibliography of Sapotaceae. **Royal Botanic Gardens**, 2001.

GRINNELL, F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. **The Journal of cell biology**, v. 124, n. 4, p. 401-404, 1994.

GUNTERO, V. A.; MANCINI, P. M. E.; KNEETEMAN, M. N. Apresentando os alunos de química orgânica à extração de produtos naturais encontrados em espécies vegetais. 2017.

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

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 5, p. 531-542, 2009.

HAN, G.; CEILLEY, Roger. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. **Advances in therapy**, v. 34, n. 3, p. 599-610, 2017.

HASANUZZAMAN, M. et al. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 681, 2020.

HU, W. et al. Enhancing proliferation and migration of fibroblast cells by electric stimulation based on triboelectric nanogenerator. **Nano Energy**, v. 57, p. 600-607, 2019.

HUDZ, N. et al. Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of Salvia sclarea extracts. **Pharmacia**, v. 66, p. 209, 2019.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria journal of medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

ILYASOV, I. R.; BELOBORODOV, V. L.; SELIVANOVA, I. A. Three ABTS•+ radical cation-based approaches for the evaluation of antioxidant activity: Fast-and slow-reacting antioxidant behavior. **Chemical Papers**, v. 72, n. 8, p. 1917-1925, 2018.

JAKUBCZYK, K. et al. Antioxidant properties of small-molecule non-enzymatic compounds. *Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, v. 48, n. 284, p. 128-132, 2020.

KIRSCHWENG, B. et al. Natural antioxidants as stabilizers for polymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 145, p. 25-40, 2017.

KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic science international**, 203(1-3), 93-98, 2010.

KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the methanolic extract from the stem bark of *Tridesmostemon omphalocarpoides* (Sapotaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 5-11, 2006.

KURHEKAR, J. V. Tannins-Antimicrobial Chemical Components. **Int. J. Technol. Sci**, v. 9, p. 5-9, 2016.

KYARI, F. et al. Acute toxicity testing and anti-trypanosomal effect of ethanolic extract of *Butyrospermum paradoxum* (sapotaceae) stem bark in rabbits infected with *Trypanosoma evansi*. **Biokemistri**, v. 28, n. 3, 2016.

LASOCKA, I. et al. Biocompatibility of pristine graphene monolayer: Scaffold for fibroblasts. **Toxicology in vitro**, v. 48, p. 276-285, 2018.

LEGOUIN, B. et al. Specialized metabolites of the lichen *Vulpicida pinastri* act as photoprotective agents. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1162, 2017.

LEITE, N. S. et al. Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 164-170, 2015.

LEZOUL, N. E. H. et al. Extraction Processes with Several Solvents on Total Bioactive Compounds in Different Organs of Three Medicinal Plants. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4672, 2020.

LINGNER, D. V. et al. Floresta Ombrófila Densa de Santa Catarina-Brasil: agrupamento e ordenação baseados em amostragem sistemática. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 4, p. 933-946, 2015.

LIU, Y. et al. Variable sensitivity to complement-dependent cytotoxicity in murine models of neuromyelitis optica. **Journal of neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2016.

LÓPEZ-DELIS, A. et al. Characterization of the cicatrization process in diabetic foot ulcers based on the production of reactive oxygen species. **Journal of Diabetes Research**, v. 2018, 2018.

LORDANI, T. V. A. et al. Therapeutic Effects of Medicinal Plants on Cutaneous Wound Healing in Humans: A Systematic Review. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1-12, 2018.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-biological interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

LUTZ, M. et al. Roles of phenolic compounds in the reduction of risk factors of cardiovascular diseases. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 366, 2019.

MADMOLI, M. et al. Study of Some Effective Treatments for Accelerating Diabetic Foot Ulcer Healing: A Systematic Review. **International Journal of Research Studies in Science, Engineering and Technology**, v. 6, n. 2, p. 34-39, 2019.

MAGALHÃES, K. D. N. et al. Medicinal plants of the Caatinga, northeastern Brazil: Ethnopharmacopeia (1980-1990) of the late professor Francisco José de Abreu Matos. **Journal of ethnopharmacology**, v. 237, p. 314-353, 2019

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food chemistry**, v. 299, p. 125124, 2019.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A. Hippocratic screen for pure or crude drug materials. In: **Lloydia**. 1962. p. 320-+.

MARTINS, F. J. et al. Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 34-39, 2016.

MBAYA, A. W.; NWOSU, C. O.; ONYEYILI, P. A. Toxicity and anti-trypanosomal effects of ethanolic extract of *Butyrospermum paradoxum* (Sapotaceae) stem bark in rats infected with *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 526-530, 2007.

MEDEIROS, A. C.; DANTAS-FILHO, A. M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of Surgical and Clinical Research**, v. 7, n. 2, p. 87-102, 2016.

MENDES, D. C. et al. A importância da nutrição no processo de cicatrização de feridas. **ANAIS SIMPAC**, v. 9, n. 1, 2018.

MENON, S. N. et al. Modelling the interaction of keratinocytes and fibroblasts during normal and abnormal wound healing processes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1741, p. 3329-3338, 2012.

MOMTAZ, S. et al. Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. **Journal of ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 507-512, 2008.

MONGE, L. et al. Incidence of hospitalization and mortality in patients with diabetic foot regardless of amputation: a population study. **Acta Diabetologica**, v. 57, n. 2, p. 221-228, 2020.

MOREIRA, A. C. C. G. et al. Polyphenols in Caja-Umbuzeiro Fruit: Extraction Process Efficiency and Antioxidant Potential. **The Natural Products Journal**, v. 2, n. 2, p. 139-148, 2012.

MOTEGI, S. et al. Protective effect of mesenchymal stem cells on the pressure ulcer formation by the regulation of oxidative and endoplasmic reticulum stress. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

MURATA, M. Inflammation and cancer. **Environmental health and preventive medicine**, v. 23, n. 1, p. 1-8, 2018.

MUTMAINNA, M.; PURNAMASARI, Y.; PARAWANSAH, P. Acute Toxicity Test of Gedi (*Abelmoschus manihot* L.) Ethanol Leaves Extract to Histopatology of Liver Mice. **MEDULA**, v. 6, n. 3, 2019.

NAIK, S. R. et al. Probable mechanism of mechanism of hypoglycaemic activity of basic acid, a natural product isolated from *Bumelia sartorum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, n. 1-2, p. 37-44, 1991.

NAKANO, T.; HASEGAWA, M. Isolation of erythrodiol 3-palmitate from *bumelia obtusifolia*. **Planta Medica** v. 27, 1975.

NETO, F. C. et al. Antimicrobial Activity of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. and Schult) TD Penn.(Sapotaceae). **EC Microbiology**, 11, 250-256, 2017.

NSIAH, K. et al. Pattern of AST and ALT changes in relation to hemolysis in sickle cell disease. **Clinical medicine. Blood disorders**, v. 4, p. CMBD. S3969, 2011.

OECD 2001. Guideline 423: Acute Oral Toxicity -Acute Toxic Class Method. Acessado em 18 de dezembro 2008 em <http://www.oecd.org/publications>. **Paris: Head of Publications Service.**

OLIVEIRA, A. P. et al. Metabolite profiling of the leaves of the Brazilian folk medicine *Sideroxylon obtusifolium*. **Planta medica**, v. 78, n. 7, p. 703-710, 2012.

PALIT, P.; MANDAL, S.C.; BHUNIA, B. Total steroid and terpenoid enriched fraction from *Euphorbia nerifolia* Linn offers protection against nociceptive-pain, inflammation, and *in vitro* arthritis model: An insight of mechanistic study. **International immunopharmacology**, v. 41, p. 106-115, 2016.

PAN, J. et al. Matrine inhibits mycelia growth of *Botryosphaeria dothidea* by affecting membrane permeability. **Journal of Forestry Research**, v. 30, n. 3, p. 1105-1113, 2019.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**, v. 5, 2016.

PAPINENI, S. et al. No treatment-related effects with aryloxyalkanoate dioxygenase12 in three 28-day mouse toxicity studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 92, p. 220-225, 2018.

PAVANI, C. H. Investigation of antiulcer activity of *Pergularia extensa* Linn. **International Journal of Research in Phytochemistry and Pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 23-26, 2019.

PECHERSKY, A. V. *et al.* Regeneration and cicatrization. **Journal of Stem Cells**, v. 11, n. 2, p. 89, 2016.

PENNINGTON, T. D. Flora neotropica. Monograph 52. Sapotaceae. **New York Botanical Garden for the Organization for Flora Neotropica**, 1990.

PENNINGTON, T. D.; KRUKOFF, B. A. The genera of Sapotaceae. **London: Royal Botanic Gardens, Kew**, 1991.

PEREIRA, J. V. et al. Antifungal potential of *Sideroxylon obtusifolium* and *Syzygium cumini* and their mode of action against *Candida albicans*. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 10, p. 2312-2319, 2016.

PEREZ-VIZCAINO, F.; FRAGA, C. G. Research trends in flavonoids and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 646, p. 107-112, 2018.

- PHRUEKSANAN, W.; YIBCHOK-ANUN, S.; ADISAKWATTANA, S. Protection of Clitoria ternatea flower petal extract against free radical-induced hemolysis and oxidative damage in canine erythrocytes. **Research in veterinary science**, v. 97, n. 2, p. 357-363, 2014.
- PIETRO, 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. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.
- PIRES, I. F. B. et al. Plantas medicinais como opção terapêutica em comunidade de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 426-433, 2014.
- PIRIZ, M. A. et al. Uso de plantas medicinais: impactos e perspectivas no cuidado de enfermagem em uma comunidade rural. **Revista eletrônica de Enfermagem**, v. 15, n. 4, p. 992-9, 2013.
- PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for total antioxidant activity determination: a review. **Biochem Anal Biochem**, 1(1), 106, 2011.
- POTROKHOV, O. S.; ZINKOVSKIY, O. G.; GORBUNOVA, Z. N. Lipid Peroxidation and Content of Photosynthetic Pigment in the Cells of Some Cyanoprokaryota and Chlorophyta Species under the Impact of Tannins. **Hydrobiological Journal**, v. 56, n. 5, 2020.
- PRATIWI, Y. S. et al. Nutmeg extract increases skeletal muscle mass in aging rats partly via IGF1-AKT-mTOR pathway and inhibition of autophagy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.
- PROKSCH, E. et al. Topical use of dexpanthenol: a 70th anniversary article. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 28, n. 8, p. 766-773, 2017.
- QIAN, Y. et al. Metabolites of flavonoid compounds preserve indices of endothelial cell nitric oxide bioavailability under glucotoxic conditions. **Nutrition & Diabetes**, v. 7, n. 9, p. e286-e286, 2017.
- RAFFA, D. et al. Recent discoveries of anticancer flavonoids. **European journal of medicinal chemistry**, v. 142, p. 213-228, 2017.
- RANI, V. et al. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life sciences**, v. 148, p. 183-193, 2016.
- RANNEH, Y. et al. Crosstalk between reactive oxygen species and pro-inflammatory markers in developing various chronic diseases: a review. **Applied Biological Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 327-338, 2017.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European surgical research**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

- REKHA, S.; ANILA, E. I. *In vitro* cytotoxicity studies of surface modified CaS nanoparticles on L929 cell lines using MTT assay. **Materials Letters**, v. 236, p. 637-639, 2019.
- RIBEIRO, V. P. et al. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. **Pharmaceutical biology**, v. 56, n. 1, p. 253-268, 2018.
- RIZZO, A. M. et al. Endogenous antioxidants and radical scavengers. In: **Bio-Farms for Nutraceuticals**. Springer, Boston, MA, 2010. p. 52-67.
- RODRIGUES, M. et al. Wound healing: a cellular perspective. **Physiological reviews**, v. 99, n. 1, p. 665-706, 2019.
- RODRIGUES, T. et al. Counting on natural products for drug design. **Nature chemistry**, v. 8, n. 6, p. 531, 2016.
- ROMERO-ESTRADA, A. et al. Anti-inflammatory and antioxidative effects of six pentacyclic triterpenes isolated from the Mexican copal resin of *Bursera copallifera*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2016.
- RUELA, H. S. et al. Antibacterial and antioxidant activities and acute toxicity of *Bumelia sartorum* Mart., Sapotaceae, **a Brazilian medicinal plant.**, v. 21, n. 1, p. 86-91, 2011.
- RUPPENTHAL, J. E. Toxicologia. **Santa Mariars: Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Técnico Industrial de Santa Maria; Rede Etec Brasil**, v. 128, 2013.
- RUVANTHIKA, P. N.; MANIKANDAN, S. A study on antioxidant activity, phenol, and flavonoid content of seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. **Drug Invention Today**, v. 11, n. 4, 2019.
- SAFDAR, M. N. et al. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 3, p. 488-500, 2017.
- SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 462-471, 2010.
- SANTOS, E. L. et al. **Flavonoids: Classification, biosynthesis and chemical ecology**. InTech, 2017.
- SANTOS, M. O. et al. Medicinal Plants: versatility and concordance of use in the caatinga area, Northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2767-2779, 2018.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Proximate composition and free radical scavenging activity of edible fruits from the Argentinian Yungas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 8, p. 1357-1364, 2005.

- SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. M. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. **African journal of pharmacy and pharmacology**, v. 7, n. 10, p. 528-539, 2013.
- SHINDE, A. et al. Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review. **Journal of Dental and Allied Sciences**, v. 1, n. 2, p. 63, 2012.
- SHIRMOHAMMADLI, Y.; EFHAMISISI, D.; PIZZI, A. Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 316-332, 2018.
- SIENIAWSKA, E., BAJ, T. Tannins. In: Pharmacognosy. **Academic Press**, 2017. p. 199-232.
- SILVA, F. F. S.; DANTAS, B. F. *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex Roem. & Schult.) TD Penn. quixabeira. **Embrapa Semiárido-Nota Técnica/Nota Científica (ALICE)**, 2017.
- SILVA, J. C et al., Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1790-1795, 2012.
- SILVA, K. B. et al. Caracterização morfológica de frutos, sementes e germinação de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. E Schult.) Penn. (SAPOTACEAE). **Revista Árvore**, v. 36, n. 1, p.59-64, 2012.
- SINGH, J. Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**, v. 67, p. 32-35, 2008.
- SIRIVIBULKOVIT, K.; NOUANTHAVONG, S.; SAMEENOI, Y. based DPPH assay for antioxidant activity analysis. **Analytical Sciences**, v. 34, n. 7, p. 795-800, 2018.
- SONEJA, A.; DREWS, M.; MALINSKI, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacological reports**, v. 57, p. 108, 2005.
- SOUZA, P. A. L. D.; MARCADENTI, A.; PORTAL, V. L. Effects of olive oil phenolic compounds on inflammation in the prevention and treatment of coronary artery disease. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1087, 2017.
- SOUZA, P. M. et al. Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48589, 2012.
- STRUCHKOV, P. et al. Comparison of spectrophotometric methods of total flavonoid assay based on complex formation with aluminum chloride as applied to multicomponent herbal drug angionorm. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 9, n. 1, 2018.
- SUN, F. et al. Studies on the acute toxicity, pharmacokinetics and pharmacodynamics of paliperidone derivatives—comparison to paliperidone and risperidone in mice and rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 107, n. 2, p. 656-662, 2010.

- SWENSON, U.; ANDERBERG, A. A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). **Cladistics**, 21(2), 101-130, 2005.
- TRINDADE, R.; DA SILVA, J. K.; SETZER, W. N. Copaifera of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, 19(5), 1511, 2018.
- TRZECIAK, M. A.; MEISSNER, W. Stability of HCT, HGB and RBC values in the Mute Swan (*Cygnus olor*) blood stored at 4° c and 24° c differs between traditional and multi-parameter automated methods. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 69, n. 3, p. 1141-1147, 2018.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J.L; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: **Cancer cell culture**. Humana Press, 2011. p. 237-245.
- VARIYA, B. C. et al. Acute and 28-days repeated dose sub-acute toxicity study of gallic acid in albino mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 101, p. 71-78, 2019.
- VELU, G.; PALANICHAMY, V.; RAJAN, A. P. Phytochemical and pharmacological importance of plant secondary metabolites in modern medicine. In: **Bioorganic Phase in Natural Food: An Overview**. Springer, Cham, 2018. p. 135-156.
- VO, N. N. Q.; FUKUSHIMA, E. O.; MURANAKA, T. Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and sapogenins. **Journal of natural medicines**, v. 71, n. 1, p. 50-58, 2017.
- WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2° edição. **Nova York: Springer**, 2009. 384 p.
- WANG, H. et al. Baicalin attenuates alcoholic liver injury through modulation of hepatic oxidative stress, inflammation and sonic hedgehog pathway in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 1129-1140, 2016.
- XUE, M.; JACKSON, C. J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. **Advances in wound care**, v. 4, n. 3, p. 119-136, 2015.
- YAN, C. et al. Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  through bone morphogenic protein-2. **The American journal of pathology**, v. 176, n. 5, p. 2247-2258, 2010.
- YU, L. et al. A review of the novel application and potential adverse effects of proton pump inhibitors. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 5, p. 1070-1086, 2017.
- ZHANG, De-Liang *et al.* Ferroportin deficiency in erythroid cells causes serum iron deficiency and promotes hemolysis due to oxidative stress. **blood**, v. 132, n. 19, p. 2078-2087, 2018.

ZHANG, X. et al. Stimulation of wound healing using bioinspired hydrogels with basic fibroblast growth factor (bFGF). **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 3897, 2018.

ZOHRA, M.; FAWZIA, A. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. **Int J Pharm Sci Research**, v. 5, p. 8495-4, 2014.

## ANEXO A – FICHA DE APROVAÇÃO CEUA



**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Biociências**  
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
 50670-420 / Recife – PE – Brasil  
 Fones: 2126 8842  
 ceua@ufpe.br

Recife, 28 de outubro de 2020

Ofício nº 59/20

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Teresinha Gonçalves da Silva**

Departamento de Antibióticos /CB

processo nº0052/2020

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação das atividades antioxidante e Antiulcerogênica dos extratos das folhas de sideroxylon obtusifolium (roem. & schult.) T.D penn”**, registrado com o nº0052/2020 sob a responsabilidade da **Prof. Teresinha Gonçalves da Silva** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 27/10/2020

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Outubro/2020 a novembro/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico
Nº de animais	114
Peso/Idade	25-30g / 60 dias
Sexo	(102) machos + (12) fêmeas
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Antibióticos.
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Antibióticos e Biotério do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco.

Atenciosamente

  
 Prof. Sebastião R. F. Silva  
 Presidente CEUA/UFPE  
 SIAPE 2345691