

Heloisa da Silva Pitz

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE EXTRATOS DE CASCAS DE JABUTICABA (*Plinia peruviana*) E SUA ATUAÇÃO DURANTE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin.

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pitz, Heloisa da Silva

Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de extratos de cascas de jabuticaba (*Plinia peruviana*) e sua atuação durante o processo de cicatrização / Heloisa da Silva Pitz ; orientador, Marcelo Maraschin, 2018.

165 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Extrato de cascas de jabuticaba. 3. Estresse oxidativo. 4. Cicatrização de feridas. 5. Fibroblastos L929. I. Maraschin, Marcelo . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

“Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos de cascas de jabuticaba (*Plinia peruviana*) e sua atuação durante o processo de cicatrização”

Por

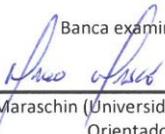
Heloisa da Silva Pitz

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (004/2018/PPGBCD) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.



Prof. (a) Dr. (a) Gelson de Souza Izídio
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

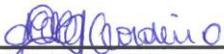
Banca examinadora:



Dr. (a) Marcelo Maraschin (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr. (a) Ricardo Castilho Garcez (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. (a) Mabel Cordeiro (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. (a) Ana Lúcia Bertarello Zeni (Universidade Regional de Blumenau - FURB)

Florianópolis, 09 de abril de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser onipresente e sempre me guiar pelos caminhos da vida.

Aos meus pais, Valério e Neli, por sempre acreditarem nos meus sonhos e na minha capacidade de realizá-los. O amor e a dedicação de vocês me trouxe até aqui.

A minha irmã Helena, por ser esta pessoa tão alegre, motivada e incentivadora.

Ao Rony Paolin Hasckel pela compreensão, apoio e inúmeras ajudas ao longo desta jornada. Esta conquista é tão minha quanto sua.

Ao professor Marcelo Maraschin por todos os ensinamentos passados durante o meu doutoramento. Obrigada pela paciência, confiança e liberdade para construir esse trabalho.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) que tive o prazer de conviver durante esses quatro anos. Aprendi muito com todos vocês e jamais esquecerei isso.

Agradeço em especial a Daniela Sousa Coelho pelo auxílio com os experimentos *in vivo*. Muito obrigada por todo o esforço que você fez para me ajudar, sem você eu não teria conseguido. Foi um prazer trabalhar contigo e te ter como amiga.

A Letícia Mazzarino pela confecção das nanoemulsões de jabuticaba.

Ao André Felipe Rodrigues pelo auxílio com os experimentos envolvendo as enzimas antioxidantes.

Ao meu grande amigo Bruno Bachiega Navarro por todas as ajudas laboratoriais e pela maravilhosa companhia.

As minhas amigas Thaís Barbosa Alberti e Bianca Coelho. Sou muito grata por ter conhecido e convivido com vocês. Obrigada por todo apoio, conselhos e risadas. Thaís, Bianca e Bruno, vocês são especiais!

A equipe do LAMEB, em especial a Vanessa, Camile, Denis, Emily e Chirle, pela ajuda técnica.

A FAPESC, CNPq e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da UFSC.

RESUMO

O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e das defesas antioxidantes. Os metabólitos secundários de plantas podem ser usados como antioxidantes exógenos para prevenir doenças relacionadas ao estresse oxidativo. As cascas da jabuticaba (*Plinia peruviana*) são importantes fontes de moléculas antioxidantes como compostos fenólicos. Esse estudo teve como objetivo determinar o efeito antioxidante e citoprotetor de extratos hidroalcoólicos de cascas dos frutos de jabuticaba contra o estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 em modelo com fibroblastos da linhagem L929 e queratinócitos da linhagem HaCat. Além disso, a capacidade cicatrizante de feridas do extrato de cascas de jabuticaba foi avaliada em modelo de lesão contrátil em camundongos. Estudos da atividade antioxidante *in vitro* revelaram que os extratos foram efetivos no sequestro dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e peroxila. Proliferação dos fibroblastos L929 foi constatada na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ após 48 h de exposição ao extrato. Ação antioxidante foi observada apenas em fibroblastos tratados com extratos de cascas de jabuticaba nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h seguido por exposição ao H_2O_2 durante 3 h. Após esse período, efeito citoprotetor foi observado. Essa ação detoxificante de ERO foi devido ao aumento nas atividades enzimáticas de catalase e de glutatona peroxidase. Os queratinócitos também apresentaram atividade de catalase aumentada. Os compostos cianidina-3-O-glicosídeo e ácido elágico, principais fitoquímicos encontrados nos extratos de cascas de jabuticaba, foram testados em modelo de estresse oxidativo induzido por H_2O_2 em fibroblastos e não foram capazes de promover citoproteção. Esses resultados mostraram que o conteúdo de polifenóis do extrato de jabuticaba tem atividade sinérgica no mecanismo de citoproteção. Estudos *in vivo* mostraram que lesões tratadas com extratos de cascas de jabuticaba não foram capazes de diminuir o tempo de fechamento das feridas de forma significativa. As atividades de superóxido dismutase e catalase das lesões dos camundongos não exibiram diferença significativa em relação aos controles não tratados após 2, 5 e 7 dias do ferimento. Extrato de jabuticaba 10% aumentou a peroxidação lipídica após 2 e 7 dias do ferimento. No conjunto, os resultados demonstraram um efeito positivo das cascas do fruto jabuticaba em fibroblastos linhagem L929 minimizando o dano causado pelo estresse oxidativo e

aumentando a sobrevivência celular. Essas características são adequadas para propósitos cosméticos.

Palavras-chave: Extrato de cascas de jabuticaba. Estresse oxidativo. Fibroblastos L929. Queratinócitos HaCat. Peróxido de hidrogênio. Cicatrização de feridas. Enzimas antioxidantes. Peroxidação lipídica.

ABSTRACT

Oxidative stress is a result of disturbance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidants defenses. Plant secondary metabolites can be used as exogenous antioxidants to prevent human oxidative stress-related diseases. Jaboticaba (*Plinia peruviana*) peels are an important source of antioxidant molecules such as phenolic compounds. This study aimed to determine the antioxidant and cytoprotective effects of hydroalcoholic extracts of jaboticaba fruit peel against H₂O₂-induced oxidative stress in a murine fibroblast (L929 cell line) and keratinocyte (HaCat) model. Besides, jaboticaba fruit peel extract wound healing properties was evaluated in a mouse contractile wound model. Jaboticaba fruit peel extract *in vitro* antioxidant studies showed a strong scavenging of DPPH and peroxy radicals. Fibroblasts L929 proliferation was verified at 100 µg/mL after 48 h of extract exposure. Evaluation of antioxidant activity by H₂O₂-induced oxidative stress was performed in fibroblast L929 and keratinocyte HaCat cells. Cell treatment with jaboticaba fruit peel extract at 25, 50, and 100 µg/mL for 24 h followed by 3h-H₂O₂ exposure showed cytoprotective effect only in fibroblasts. These ROS detoxifying action was due to increased enzymatic activity of catalase and glutathione peroxidase in fibroblasts. Keratinocytes also presented catalase activity increased. Cyanidin-3-O-glucoside and elagic acid, main phytochemicals in jaboticaba fruit peel extract, were tested in H₂O₂-induced oxidative stress model and were not able to promote cytoprotection. This result reveals a synergy activity of jaboticaba extract's polyphenols in fibroblast cytoprotective mechanism. *In vivo* studies showed that jaboticaba extract treated-wounds did not decreased the healing time in a significant way. Wound mouse superoxide dismutase and catalase activity didn't exhibit significant difference of non-treated controls after 2, 5 and 7 days post wound. 10% jaboticaba extract increased lipid peroxidation after 2 and 7 days post wound. These results demonstrate a positive effect against ROS of jaboticaba fruit peels in L929 fibroblasts cell line, minimizing cell damage and increasing its survival. These features are suitable for cosmetic purpose.

Keywords: Jaboticaba peel extract. Oxidative stress. Fibroblasts L929. Keratinocytes HaCat. Hydrogen peroxide. Wound healing. Antioxidant enzymes. Lipid peroxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Atividade antioxidante do EJMO avaliada através do ensaio com o radical DPPH, após 30 min de exposição.....	60
Figura 2 - Viabilidade de fibroblastos, linhagem L929, após 24 e 48 h de tratamento com extrato de cascas de jabuticaba obtidos com o auxílio de radiação micro-ondas..	61
Figura 3 - Histograma representativo da porcentagem de células L929 marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor® picolyl azide após 24 h de exposição ao EJMO.....	64
Figura 4 - Histograma representativo da porcentagem de células L929 marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor® picolyl azide após 48 h de exposição ao EJMO.....	65
Figura 5 - Viabilidade de fibroblastos da linhagem L929 tratados com H ₂ O ₂ durante 24 h.	66
Figura 6 - Viabilidade de fibroblastos L929 tratados com o EJMO após exposição ao H ₂ O ₂ (A), antes da exposição ao H ₂ O ₂ , (B) e concomitante ao H ₂ O ₂ (C)..	67
Figura 7 - Viabilidade de fibroblastos, linhagem L929, após 24 h de tratamento com cianidina-3-O-glicosídeo ou ácido elágico (A). Viabilidade de fibroblastos, linhagem L929, após 24 h de tratamento com cianidina-3-O-glicosídeo ou ácido elágico seguido por exposição ao H ₂ O ₂ (B)	70
Figura 8 - Atividade de catalase (A) e glutaciona peroxidase (GPx) (B) de células L929 tratadas com EJMO por 24 h nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL seguido ou não por exposição ao H ₂ O ₂ por diferentes tempos (15, 30, 60, 120 e 180 minutos)..	74
Figura 9 - Micrografias ópticas de fibroblastos L929 (40x) após o experimento de migração celular. Tempo 0, imediatamente após a ranhura (A), Controle (B), 0,5 µg/mL (C), 5 µg/mL (D), 25 µg/mL (E), 50 µg/mL (F) e 100 µg/mL (G), após 12 h de tratamento com o extrato de cascas de jabuticaba em micro-ondas (n=8)..	77
Figura 10 - Viabilidade de queratinócitos, linhagem HaCat, após 24 e 48 h de tratamento com o EJMO.....	78
Figura 11 - Viabilidade de queratinócitos da linhagem HaCat tratados com EJMO após exposição ao H ₂ O ₂ (A), antes da exposição ao H ₂ O ₂ , (B) e concomitante ao H ₂ O ₂ (C).....	80
Figura 12 - Atividade de catalase (A) e glutaciona peroxidase (GPx) (B) de queratinócitos da linhagem HaCat tratados com EJMO por 24 h, nas	

concentrações de 1, 10 e 50 µg/mL, ou tratados com extrato nessas mesmas concentrações por 2,5 h, seguido por 2 h de exposição ao H ₂ O ₂ ..	82
Figura 13 - Viabilidade de fibroblastos, linhagem L929, após 24 h (A) e 48 h (B) de tratamento com nanoemulsão controle, nanoemulsão EJMO e EJMO..	86
Figura 14 - Taxa de oclusão de lesões no dorso de camundongos tratadas com controle, controle nanoemulsão, nanoemulsão EJMO e EJMO 2,5%; 5% e 10%, durante 12 dias após o ferimento..	88
Figura 15 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após dois dias do ferimento. Controle extrato 200x (A) e 400x (B) de aumento..	90
Figura 16 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após cinco dias do ferimento. Controle extrato 200x (A) e 400x (B) de aumento..	91
Figura 17 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após sete dias do ferimento. Controle extrato 200x (A) e 400x (B) de aumento..	92
Figura 18 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após nove dias do ferimento. Controle extrato 200x (A) e 400x (B) de aumento..	93
Figura 19 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após catorze dias do ferimento. Controle extrato 200x (A) e 400x (B) de aumento..	94
Figura 20 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após dois dias do ferimento. Extrato EJMO 2,5% 200x (A) e 400x (B) de aumento..	95
Figura 21 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após cinco dias do ferimento. Extrato EJMO 2,5% 200x (A) e 400x (B) de aumento..	96
Figura 22 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após sete dias do ferimento. Extrato EJMO 2,5% 200x (A) e 400x (B) de aumento..	97
Figura 23 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após nove dias do ferimento. Extrato EJMO 2,5% 200x (A) e 400x (B) de aumento..	98
Figura 24 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após catorze dias do ferimento. Extrato EJMO 2,5% 200x (A) e 400x (B) de aumento..	99
Figura 25 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após dois dias do ferimento. Extrato EJMO 5% 200x (A) e 400x (B) de aumento..	100

Figura 26 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após cinco dias do ferimento. Extrato EJMO 5% 200x (A) e 400x (B) de aumento..	101
Figura 27 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após sete dias do ferimento. Extrato EJMO 5% 200x (A) e 400x (B) de aumento..	102
Figura 28 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após nove dias do ferimento. Extrato EJMO 5% 200x (A) e 400x (B) de aumento..	103
Figura 29 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após catorze dias do ferimento. Extrato EJMO 5% 200x (A) e 400x (B) de aumento.....	104
Figura 30 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após dois dias do ferimento. Extrato EJMO 10% 200x (A) e 400x (B) de aumento..	105
Figura 31 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após cinco dias do ferimento. Extrato EJMO 10% 200x (A) e 400x (B) de aumento.....	106
Figura 32 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após sete dias do ferimento. Extrato EJMO 10% 200x (A) e 400x (B) de aumento.....	107
Figura 33 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após nove dias do ferimento. Extrato EJMO 10% 200x (A) e 400x (B) de aumento.....	108
Figura 34 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após catorze dias do ferimento. Extrato EJMO 10% 200x (A) e 400x (B) de aumento.....	109
Figura 35 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após dois dias do ferimento. Controle nanoemulsão 200x (A) e 400x (B) de aumento.....	110
Figura 36 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após cinco dias do ferimento. Controle nanoemulsão 200x (A) e 400x (B) de aumento.....	111
Figura 37 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após sete dias do ferimento. Controle nanoemulsão 200x (A) e 400x (B) de aumento.....	112
Figura 38 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após nove dias do ferimento. Controle nanoemulsão 200x (A) e 400x (B) de aumento.....	113

Figura 39 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após catorze dias do ferimento. Controle nanoemulsão 200x (A) e 400x (B) de aumento..	114
Figura 40 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após dois dias do ferimento. Nanoemulsão EJMO 200x (A) e 400x (B) de aumento..	115
Figura 41 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após cinco dias do ferimento. Nanoemulsão EJMO 200x (A) e 400x (B) de aumento..	116
Figura 42 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após sete dias do ferimento. Nanoemulsão EJMO 200x (A) e 400x (B) de aumento..	117
Figura 43 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após nove dias do ferimento. Nanoemulsão EJMO 200x (A) e 400x (B) de aumento..	118
Figura 44 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após catorze dias do ferimento. Nanoemulsão EJMO 200x (A) e 400x (B) de aumento..	119
Figura 45 - Atividade da superóxido dismutase em lesões cutâneas de camundongos tratados com extratos e nanoemulsão de cascas de jabuticaba após o segundo, quinto e sétimo dias da lesão.....	121
Figura 46 - Atividade da catalase em lesões cutâneas de camundongos tratados com EJMO e com a nanoemulsão derivada daquele extrato, após o segundo, quinto e sétimo dia da lesão.....	122
Figura 47 - Quantificação da peroxidação lipídica em lesões cutâneas de camundongos tratados com extrato de EJMO e nanoemulsão derivada, após o segundo, quinto e sétimo dia da lesão.	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantificação de compostos fenólicos e antocianinas deglicosiladas de extrato de cascas de jabuticaba obtidos em microondas (EJMO) determinado por HPLC-DAD. Os valores de delphinidina são expressos em equivalentes de cianidina (EC). Dados expressos em média \pm DP (n = 5).....	59
Tabela 2 - Porcentagem de células em fase proliferativa após tratamento com EJMO por 24 e 48 h. Dados expressos em média \pm DP (n = 3). Letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos avaliados no mesmo período de tempo.	62
Tabela 3 - Largura da ranhura (μm) e taxa de migração celular (%) de fibroblastos L929, nos tempos 0 e 12 h de tratamento com o EJMO. Dados expressos em média \pm DP (n=8). Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos.	77
Tabela 4 - Diâmetro médio (nm), índice de polidispersão e potencial Zeta das nanoemulsões controle e EJMO. Dados expressos em média \pm DP (n = 3).....	84
Tabela 5 - Conteúdos de polifenóis e flavonoides totais (mg/mL) da nanoemulsão controle, nanoemulsão EJMO e somente EJMO. Dados expressos em média \pm DP (n = 3).....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropano)
ANOVA	Análise de Variância Simples
ATP	Adenosina trifosfato
Cb5	Fator complemento-5
CCL18	Quimiocina CCL18
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril hidrazil
MEC	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EdU	5-etinil-2'-deoxiuridina
EGF	Fator de Crescimento Epitelial
EJMO	Extrato hidroalcoólico de cascas de jabuticaba obtido através de micro-ondas
EJUP	Extrato hidroalcoólico de cascas de jabuticaba obtido por alta pressão
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
GPx	Glutationa peroxidase
HCl	Ácido clorídrico
HO	Heme oxigenase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IGF	Fator de Crescimento Insulina-like
IL-1 β	Interleucina -1 β
IL-1	Interleucina -1
IL-6	Interleucina -6
IL-8	Interleucina -8
IL-10	Interleucina -10
IL-12	Interleucina -12
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KCl	Cloreto de potássio
MMP	Metaloprotease de matriz
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
Nrf2/ARE	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2/ elemento de resposta antioxidante
ORAC	Capacidade de absorção de radicais oxigênio

PAF	Fator de ativação de plaquetas
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PGC1- α	Coativador alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
Prdx	Peroxirredoxina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SIRT1	Sirtuína 1
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
TGF- α e - β	Fator de Crescimento Transformante- α e - β
TIMP	Inibidor tecidual de metaloprotease
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
uPA	Ativador de Plasminogênio Uroquinase
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS.....	25
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO DURANTE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	28
2.3	DEFESAS ANTIOXIDANTES CELULARES	31
2.3.1	Superóxido dismutase (SOD).....	31
2.3.2	Catalase	32
2.3.3	Glutathione peroxidase (GPx)	32
2.3.4	Peroxirredoxinas (Prdx).....	33
2.3.5	Heme oxigenases (HO)	33
2.3.6	Antioxidantes não enzimáticos	34
2.4	PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES X PRÓ-OXIDANTES DE COMPOSTOS FENÓLICOS	34
2.5	A JABUTICABA	35
3	OBJETIVO	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS COMPONENTES FITOQUÍMICOS	39
4.2	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS	39
4.3	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONOIDES TOTAIS	40
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS PRESENTES NO EXTRATO DE CASCAS DE JABUTICABA EM MICRO-ONDAS	40
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO NO EXTRATO DE CASCAS DE JABUTICABA EM MICRO-ONDAS	41
4.6	ANÁLISES DE ESPECTROMETRIA DE MASSA DO EXTRATO DE CASCAS DE JABUTICABA EM MICRO-ONDAS	41
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS ATRAVÉS DO RADICAL DPPH	42

4.8	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DO EJMO VIA CAPACIDADE DE NEUTRALIZAÇÃO DE RADICAIS OXIGÊNIO (ORAC)	43
4.9	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR USANDO FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 E QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat	44
4.10	AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO EJMO EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929	44
4.11	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE FIBROBLASTOS L929 E QUERATINÓCITOS HaCat APÓS INDUÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO COM H ₂ O ₂	45
4.12	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 APÓS TRATAMENTO COM CIANIDINA-3-O-GLICOSÍDEO OU ÁCIDO ELÁGICO	46
4.13	INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO MEDIADO POR H ₂ O ₂ EM FIBROBLASTOS L929 E QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat PARA POSTERIOR AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	46
4.14	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 E QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat SUBMETIDOS AO EJMO	48
4.15	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GP _x) EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 E QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat EXPOSTOS AO EJMO	48
4.16	TESTE DE MIGRAÇÃO CELULAR (<i>SCRATCH ASSAY</i>)	49
4.17	PREPARAÇÃO DAS NANOEMULSÕES A PARTIR DO EJMO	50
4.18	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS DA NANOEMULSÃO DO EJMO	50
4.19	CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO DO EJMO	50
4.20	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DA NANOEMULSÃO DO EJMO USANDO FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929	51
4.21	ANÁLISE DA CICATRIZAÇÃO EM MODELO DE ÚLCERA CUTÂNEA EM CAMUNDONGOS	51
4.22	IMAGEAMENTO DAS ÚLCERAS CUTÂNEAS	52
4.23	COLETA DAS PEÇAS	52

4.24	CORTES HISTOLÓGICOS DAS ÚLCERAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS	52
4.25	ANÁLISE DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DURANTE A CICATRIZAÇÃO <i>IN VIVO</i>	53
4.26	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM LESÕES CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS.....	53
4.27	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE EM LESÕES CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS	54
4.28	AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM LESÕES CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS	54
4.29	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1	COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE CASCAS DE JABUTICABA	57
5.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DO EJMO.....	60
5.3	VIABILIDADE CELULAR DE FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 APÓS TRATAMENTO COM EJMO	61
5.4	PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO EJMO EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929	62
5.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EJMO EM CÉLULAS DA LINHAGEM L929	65
5.6	VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 APÓS TRATAMENTO COM CIANIDINA-3-O-GLICOSÍDEO OU ÁCIDO ELÁGICO.....	69
5.7	ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS DA LINHAGEM L929 TRATADAS COM EJMO APÓS INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO POR H ₂ O ₂ ...	72
5.8	MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 APÓS TRATAMENTO COM O EJMO	76
5.9	VIABILIDADE CELULAR DE QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat APÓS TRATAMENTO COM O EJMO... ..	78
5.10	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EJMO EM QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat	79
5.11	ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat TRATADOS COM O EJMO APÓS INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO POR H ₂ O ₂	81
5.12	CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO DO EJMO	83

5.13	CITOTOXICIDADE DA NANOEMULSÃO FEITA COM O EJMO EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929.....	85
5.14	POTENCIAL CICATRIZANTE DE EXTRATOS E NANOEMULSÃO DE CASCAS DE JABUTICABA	87
5.15	ANÁLISE HISTOLÓGICAS DAS LESÕES DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM EXTRATOS E NANOEMULSÃO DE CASCAS DE JABUTICABA	89
5.16	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E NANOEMULSÃO DE CASCAS DE JABUTICABA DURANTE O PROCESSO CICATRICIAL DE CAMUNDONGOS	120
6	CONCLUSÕES	127
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
	APÊNDICE A – CYTOPROTECTIVE EFFECTS OF JABOTICABA (<i>Plinia peruviana</i>, Poir. Govaerts) FRUIT PEEL EXTRACTS AGAINST H₂O₂-INDUCED OXIDATIVE STRESS.....	149
	APÊNDICE B – <i>IN VITRO</i> EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND WOUND HEALING PROPERTIES OF JABOTICABA (<i>Plinia peruviana</i>) FRUIT PEEL HYDROALCOHOLIC EXTRACT	159
	ANEXO A – CERTIFICADO EMITIDO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA	165

1 INTRODUÇÃO

A não cicatrização de lesões cutâneas geralmente resulta da falha em mecanismos coordenados observados na regeneração tissular normal. Lesões crônicas apresentam processos cicatriciais atrasados e incompletos que conduzem a um estado de inflamação patológico. As ocorrências dessas feridas estão usualmente relacionadas à *diabetes mellitus*, estase venosa e hipertensão (ZHAO et al., 2016). Dados da Pesquisa Nacional de Saúde mostraram que dentre os usuários diabéticos das Unidades Básicas de Saúde (UBS), consultórios particulares e clínicas privadas, 5% dos indivíduos diagnosticados com a doença há menos de 10 anos e 5,8% com diagnóstico há mais de 10 anos apresentaram feridas nos pés. A taxa de amputação dentre esses usuários chega a 0,7% e 2,4%, respectivamente, sendo a amputação uma complicação irreversível, com implicações físicas, psicológicas e sociais (BRASIL, 2014).

O interesse em avaliar o potencial medicinal de plantas na cicatrização de feridas cresceu nas duas últimas décadas. Dentre as propriedades de compostos vegetais que podem ser potencialmente ativos na promoção da cicatrização de feridas estão: atividade antimicrobiana, antioxidante, efeito mitogênico e angiogênico, estímulo à produção de colágeno e síntese de DNA (GHOSH; GABA, 2013). Neste sentido, os estudos de componentes fitoquímicos, na forma de extratos vegetais ou compostos isolados, e sua aplicação durante o processo cicatricial parece ser uma alternativa para amenizar a ação de fatores relacionados a não cicatrização de feridas.

As cascas do fruto da jabuticaba são ricas em antocianinas, uma classe de compostos polifenólicos que conferem a coloração vermelha, azul ou roxa a uma variedade de frutos e folhas (WANG; STONER, 2008).

Ácidos polifenóis e antocianinas são considerados eficazes na promoção da cicatrização de feridas, seja pela diminuição do tempo de oclusão de lesões cutâneas (GUPTA et al., 2007, MANOJ; MURUGAN, 2012, XU et al., 2013), ou pela atenuação da inflamação (NEGRÃO et al., 2010, NEGRÃO et al., 2012). Efeitos anti-inflamatórios observados estão relacionados principalmente à inibição do fator de transcrição NF- κ B, importante regulador do processo inflamatório (NEGRÃO et al., 2007, NIZAMUTDINOVA et al., 2009, XU et al., 2013).

Além disso, atividade antioxidante de compostos fenólicos pode ser de grande utilidade no tratamento de lesões teciduais, uma vez que

essas substâncias podem auxiliar nas defesas antioxidantes contribuindo para a neutralização de espécies reativas de oxigênio (ERO) abundantes no local da ferida e que em excesso prejudicam a cicatrização. Durante o processo cicatricial, as enzimas antioxidantes têm sua expressão aumentada, porém a atividade enzimática é prejudicada devido ao ambiente altamente oxidante proporcionado pelas ERO. Antioxidantes não enzimáticos endógenos também sofrem depleção (SHUKLA; RASIK; PATNAIK, 1997, STEILING et al., 1999). Tratamento com curcumina, um composto fenólico obtido a partir dos rizomas de *Curcuma longa* L., foi capaz de reverter essa situação, aumentando a atividade de superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, além de diminuir a peroxidação lipídica em lesões cutâneas excisionais no dorso de ratos (PANCHATCHARAM et al., 2006).

Compostos fenólicos também podem assumir caráter pró-oxidante quando encontrados em grandes quantidades e submetidos a determinadas condições ambientais como pH elevado e presença de metais de transição (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011, PARK; M. PEZZUTO, 2012). Esse comportamento pode ser benéfico, pois promove mudanças no estado de oxirredução da célula preparando-a para futuros desafios envolvendo estresse oxidativo. Além disso, a promoção de atividade pró-oxidante por fitoquímicos foi relacionada à ativação da sinalização Nrf2/ARE, fator de transcrição associado a várias enzimas antioxidantes (CARVALHO et al., 2015).

Neste contexto, como hipótese de trabalho assume-se que extratos ricos em antocianinas da casca de jabuticaba (*P. peruviana*) são potenciais indutores à cicatrização de feridas, devido aos seus reconhecidos efeitos antioxidante/pró-oxidante e anti-inflamatório, relevantes à regeneração tissular cutânea, tanto em quadros de cicatrização de feridas agudas como em crônicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS

A cicatrização é o processo responsável pelo restabelecimento de estruturas celulares e camadas teciduais em tecidos lesados buscando alcançar a proximidade máxima ao tecido em seu estado normal (NAYAK; PINTO PEREIRA, 2006).

O reparo de feridas está dividido nos estágios de inflamação, formação e remodelação de tecido (SINGER; CLARK, 1999).

O reparo tecidual inicia imediatamente após o ferimento. A lesão causa o rompimento de vasos sanguíneos e, por consequência, o vazamento de constituintes do sangue para o local da ferida, assim como a liberação de fatores vasoativos, resultando na ativação da cascata de coagulação e hemostase (BARRIENTOS et al., 2008). As plaquetas liberadas dos vasos sanguíneos rompidos se agregam e, com as moléculas de fibrina, formam o coágulo. Além de conter o sangramento, essa estrutura será a primeira matriz provisória da lesão que facilitará a permanência das células inflamatórias, recrutadas a seguir, no local (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004). Essas plaquetas agregadas são ativadas e liberam mediadores tais como PDGF, TGF- α , TGF- β , FGF, EGF e IGF dando início à fase inflamatória (MOULIN, 1995).

As citocinas pró-inflamatórias promovem a expressão de moléculas de adesão que capturam os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) da corrente sanguínea conduzindo-os para junções intercelulares endoteliais por onde transmigrarão em direção à ferida (EMING et al., 2007), alcançando recrutamento máximo entre 24 e 48 h. A migração de neutrófilos para o local da lesão é estimulada e dirigida por fatores quimiotáticos tais como o fator complemento-5 (Cb5) circulante, produtos do metabolismo de bactérias e fatores liberados por plaquetas tais como IL-1 (BARRIENTOS et al., 2008), fator plaquetário-4 (PF4), PDGF e TGF- β (DIEGELMANN, 2004). A função primária dessas células é o desbridamento do tecido e fagocitose de agentes infecciosos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Para tal função, é necessária a liberação de uma grande variedade de substâncias antimicrobianas como espécies reativas de oxigênio (ERO), proteases (GRINNELL; ZHU, 1994), peptídios catiônicos, eicosanóides e ativador

de plasminogênio uroquinase (uPA) (EPSTEIN; WEISS, 1989). Além disso, neutrófilos foram identificados como importante fonte de fatores pró-angiogênicos, incluindo VEGF-A e IL-8 (LI; ZHANG; KIRSNER, 2003, ANCELIN et al., 2004, OHKI et al., 2005, SCHRUEFER et al., 2005).

Os mastócitos são células que também participam da fase de inflamação através da liberação de grânulos contendo enzimas, histamina e outras aminas bioativas. As aminas ativas liberadas pelos mastócitos tornam os vasos sanguíneos dos arredores da ferida permeáveis e permitem a passagem de células mononucleares (monócitos) à área lesada (ARTUC et al., 1999).

Por muito tempo acreditou-se que os neutrófilos eram as primeiras células inflamatórias a chegarem ao local da lesão, seguidos pelos monócitos. Estudos recentes revelaram que uma onda transiente de monócitos se infiltra na lesão concomitantemente aos neutrófilos durante as primeiras horas após o ferimento. Esses monócitos são recrutados a partir da vasculatura rompida e se locomovem em direção ao leito da ferida até quatro horas após a lesão, quando, então, esse evento cessa e apenas os neutrófilos continuam a infiltrar. É possível que essa onda transiente de monócitos esteja envolvida no mecanismo de extravasamento endotelial de neutrófilos (KREISEL et al., 2010, WANG, B. et al., 2012). Além disso, acredita-se que uma melhora no recrutamento de neutrófilos auxilie na infiltração posterior de monócitos, porém estes mecanismos permanecem desconhecidos (RODERO et al., 2014). Uma segunda onda de infiltração de monócitos acontece dentro de 24 horas e perdura por cinco dias (RODERO et al., 2013).

Há dois tipos de monócitos que invadirão a lesão em momentos diferentes e que auxiliarão no processo cicatricial de formas distintas. O primeiro deles invade a ferida logo nos primeiros dias e tem característica inflamatória e antimicrobiana, diferenciando-se em macrófagos que expressam iNOS, IL-1 β , IL-6 (WILLENBORG et al., 2012), TNF- α , IL-12 e metaloproteases de matriz (MMP) (MACLEOD; MANSBRIDGE, 2016). Já o segundo tipo de monócito chega posteriormente à ferida e promove um ambiente anti-inflamatório, regulatório e reparador, contribuindo ao fechamento da lesão. Após diferenciação, estes macrófagos secretam arginase, TGF- β , quimiocina CCL18, prostaglandina E2 e IL-10 (MACLEOD; MANSBRIDGE, 2016, MINUTTI et al., 2017) Durante a progressão do processo cicatricial, uma mudança de fenótipo do primeiro tipo de monócito para o segundo é observada (MACLEOD; MANSBRIDGE, 2016). Esse

evento marca o final da fase inflamatória e o começo da fase de formação tecidual (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Nesta nova fase, há diminuição das células inflamatórias no local da lesão enquanto ocorrem migração e proliferação de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais. Essas células, juntamente com capilares e moléculas de matriz extracelular (MEC) recém-sintetizadas, formarão o tecido de granulação que substituirá a derme lesada (MARTIN, 1997, GURTNER et al., 2008).

No tecido de granulação, fibroblastos assumem fenótipo contrátil determinado pela expressão de α -actina de músculo liso. Além de serem responsáveis pela síntese e deposição de componentes de matriz extracelular, especialmente colágeno do tipo III, os miofibroblastos auxiliam na contração e maturação do tecido de granulação (HINZ; GABBIANI, 2003).

Durante o processo cicatricial, a demanda por oxigênio e suprimento metabólico aumenta, estimulando a resposta angiogênica dentro da vasculatura da pele machucada. A principal função da neoangiogênese é prover suprimento de sangue à área lesada para atingir as necessidades metabólicas aumentadas do tecido (LI; ZHANG; KIRSNER, 2003). Muitas características do microambiente onde a lesão está inserida, como pH baixo, tensão de oxigênio reduzida e aumento do lactato, favorecem a estimulação de angiogênese (LAVAN; HUNT, 1990).

A re-epitelização da lesão é um evento dependente da migração de queratinócitos que deixam a borda da ferida em direção ao seu leito. Concomitantemente, a proliferação dessas células na região limitante da lesão é estimulada (SONEJA; DREWS; MALINSKI, 2005). Para que eventos como esses ocorram é necessário que aconteça a liberação de fatores como EGF, TGF- α e FGF (RAJA; GARCIA; ISSEROFF, 2007).

O início da degradação da membrana basal e da matriz extracelular circundante por meio de proteases, principalmente metaloproteases, serina e cisteína proteases, permite a migração das células em direção ao estímulo (ROY; ZHANG; MOSES, 2006). Moléculas presentes na matriz extracelular, como o fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, tenascina e heparina, estimulam a migração e a proliferação de células endoteliais e epiteliais (CHETTIBI, S.; FERGUSON, 1999, LI; ZHANG; KIRSNER, 2003). As sinalizações entre essas células e as moléculas de matriz extracelular são mediadas na sua maioria por integrinas (LUSCINSKAS; LAWLER, 1994, EMING et al., 2007).

Durante a remodelação tecidual, o tecido de granulação será substituído de forma gradual por componentes de matriz extracelular mais organizados e elásticos, particularmente colágeno do tipo I (WERNER; GROSE, 2003), principal componente da derme. Os fibroblastos, macrófagos e queratinócitos produzem metaloproteases de matriz que participam da transição dessa matriz provisória em cicatriz colagenosa. A atividade de metaloproteases é regulada nas lesões por fatores de crescimento e citocinas, assim como por inibidores de metaloproteases (TIMPS) (CHETTIBI, S.; FERGUSON, 1999).

Há evidências de que a apoptose de células endoteliais promove o principal mecanismo responsável pela regressão vascular durante a evolução do tecido de granulação em cicatriz (DESMOULIÈRE et al., 1995). Dentre os mecanismos envolvidos na regressão vascular menciona-se a diminuição na expressão de fatores de crescimento essenciais à sobrevivência de células endoteliais, ao aumento da expressão de inibidores angiogênicos (POLVERINI et al., 1995, STREIT et al., 2000) e à transição da matriz extracelular provisória altamente pró-angiogênica em uma matriz permanentemente colagenosa. Durante esse evento, a remodelação do colágeno depende de um balanço entre o catabolismo, síntese continuada e deposição que refletirá diretamente na qualidade da cicatriz (KREIG, 1995). Eventuais distúrbios nesse balanço podem prejudicar gravemente a função da pele devido à contração anormal do tecido e deposição excessiva de matriz extracelular, como observado em cicatriz hipertrófica e esclerodermia, mas também em processos fibróticos nos rins, coração e pulmão (EMING et al., 2007).

Após a epitelização, a proliferação celular e neovascularização cessam, havendo formação de cicatriz. Este novo tecido formado é mecanicamente insuficiente e desprovido de apêndices tais quais folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (WERNER; GROSE, 2003). Por fim, a fase de remodelação perdura por meses.

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO DURANTE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Durante o processo de cicatrização de feridas, uma das primeiras respostas após a lesão é a liberação de cálcio pelas células afetadas (RAZZELL et al., 2013). O cálcio liberado promove a ativação do complexo enzimático NADPH oxidase que, durante a fase de inflamação, é requisitado pelas células inflamatórias para produzir

grandes quantidades de ERO, evento este conhecido como “explosão respiratória” (DARR; FRIDOVICH, 1994, BEDARD; KRAUSE, 2007). O produto da reação catalisada pela NADPH oxidase é o radical altamente reativo superóxido que é rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água pelas enzimas da família superóxido dismutase. Dessa forma, cálcio e H_2O_2 podem ser considerados os primeiros sinais liberados após a lesão tecidual e participam do recrutamento de células epiteliais e células do sistema imune para o local da ferida (NIETHAMMER et al., 2009, WOOD, 2012). Embora o H_2O_2 esteja envolvido em várias etapas que auxiliam no processo normal de cicatrização, essa molécula pode gerar radicais hidroxila via reação com íons de ferro e cobre (reação de Fenton) que causam danos irreparáveis em macromoléculas como proteínas, lipídios e DNA. Exemplos de enzimas antioxidantes que neutralizam os efeitos do H_2O_2 são a catalase, peroxidases e peroxiredoxinas (SCHÄFER; WERNER, 2008).

Fisiologicamente, quantidades de ERO endógena são produzidas pelas próprias células a partir da fosforilação oxidativa mitocondrial durante a produção de ATP, no retículo endoplasmático e através de enzimas oxirredutases, fornecendo quantidades basais requeridas ao funcionamento normal celular e homeostase. O controle dessa taxa é de suma importância, pois quantidades muito baixas de ERO promovem lentidão no ciclo celular (efeito citostático), enquanto valores aumentados estimulam fatores de transcrição que desencadeiam mecanismos de defesa antioxidante das células que em grandes concentrações ativam proteínas pró-apoptóticas que induzem morte ou necrose celular (DUNNILL et al., 2017). Durante o processo de cicatrização de feridas excisionais em ratos observou-se que concentrações de H_2O_2 variaram conforme o momento da lesão, ocorrendo em maiores quantidades durante as primeiras fases da cicatrização (dois dias após a lesão), com menores teores em estágios avançados (depois de cinco dias da lesão) (ROY et al., 2006). Conteúdos de superóxido também alcançaram quantidades máximas na fase inicial após dois dias da lesão (OJHA et al., 2008).

Esse aumento observado na primeira fase da cicatrização não é coincidência: é nesse momento que neutrófilos e macrófagos requerem grandes quantidades de oxigênio molecular, que será reduzido através da NADPH oxidase a radical superóxido e, posteriormente, H_2O_2 nos fagossomos, criando níveis letais à destruição de patógenos que entram em contato com a lesão logo após o ferimento. A difusão do H_2O_2 para espaços extracelulares também ajuda a prevenir o crescimento de

bactérias adjacentes (RACEK; HOLEČEK, 1999, DUNNILL et al., 2017). As células fagocíticas não são as únicas que possuem o complexo enzimático NADPH oxidase. Fibroblastos e células endoteliais também podem gerar ERO através desse mesmo mecanismo. Além disso, fibroblastos estimulados por citocinas inflamatórias (e.g. IL-1 e TNF- α) ou fator de ativação plaquetária (PAF) e células endoteliais ativadas por trombina, PDGF e TNF- α também geram ERO via NADPH oxidase, embora com taxas de produção inferiores àquelas encontradas em fagócitos (DRÖGE, 2002).

Além das ERO há também as espécies reativas de nitrogênio (ERN) que são produzidas a partir da síntese do óxido nítrico por diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase, todas elas presentes na pele e expressadas durante a cicatrização. O óxido nítrico ainda pode ser oxidado por moléculas/radicais como o oxigênio molecular, ERO, metais de transição e grupos tiol, gerando variados tipos de ERN (HUK et al., 1997, BROVKOVYCH et al., 1999, HUK et al., 2000).

No processo cicatricial normal, baixos níveis de ERO e ERN são requeridos à manutenção do reparo tecidual. ERO e, principalmente, o H₂O₂ são mensageiros secundários, desempenhando importante papel na sinalização celular. O que garante essa característica ao H₂O₂ é que essa molécula é de fácil síntese e degradação, estando presente em todas as células. Além disso, é uma molécula pequena, não carregada, com meia-vida mais longa que as ERO, que se difunde facilmente e não reage de forma indiscriminada com moléculas vizinhas como os radicais (FINKEL, 1998, GABBITA et al., 2000). Entre os efeitos benéficos, baixas concentrações de H₂O₂ promovem a proliferação de fibroblastos e células endoteliais vasculares de mamíferos (MURRELL; BROMLEY; FRANCIS, 1990, STONE; COLLINS, 2002), estimulam angiogênese (FINKEL, 1998) e modulam a permeabilidade vascular através da expressão do VEGF (LEE et al., 2006). Também auxilia na migração e proliferação de células epidérmicas (RHEE, 1999, JONES; MORICE, 2000, RHEE et al., 2000) e é quimioatraente para queratinócitos (LOO; HO; HALLIWELL, 2011) e neutrófilos (KLYUBIN; KIRPICHNIKOVA; GAMALEY, 1996). O H₂O₂ ainda induz formação de colágeno do tipo I, III e IV e a ligação cruzada destas moléculas. ERO também age sobre os fibroblastos mediando sua conversão em miofibroblastos (SONEJA; DREWS; MALINSKI, 2005).

O óxido nítrico, quando em níveis controlados, desempenha importantes funções no processo de cicatrização, contribuindo durante a inflamação através da ação vasodilatadora, antimicrobiana, anti-

inflamatória e indutora de permeabilidade vascular (CONNELLY et al., 2001). Ainda promove angiogênese (ZICHE; MORBIDELLI, 2000), além de auxiliar na re-epitelização (STALLMEYER et al., 1999) e na deposição de colágeno.

Quantidades elevadas de ERO e ERN foram relacionadas a não cicatrização em feridas crônicas. Os efeitos deletérios durante a cicatrização incluem a manutenção da via de transcrição de citocinas pró-inflamatórias, que preservam o estado inflamatório no microambiente da ferida, e indução de metaloproteases. Além disso, ERO podem interagir com proteínas de matriz extracelular causando modificação e degradação dessas moléculas ou, ainda, prejudicando o funcionamento de fibroblastos dérmicos e queratinócitos, como a migração e proliferação (O'TOOLE; GOEL; WOODLEY, 1996, MOSELEY et al., 2004 DUNNILL et al., 2017). Assim como as ERO, as ERN são apontadas como responsáveis pelo efeito inflamatório prolongado observado em úlceras crônicas de variadas etiologias (JUDE et al., 1999, ABD-EL-ALEEM et al., 2000).

A ação detoxificante de enzimas e moléculas antioxidantes na diminuição das taxas de ERO e H_2O_2 permite que o processo de cicatrização evolua normalmente (AUF DEM KELLER et al., 2006).

2.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES CELULARES

2.3.1 Superóxido dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido em H_2O_2 e água. Existem basicamente três diferentes tipos de SOD: SOD Cu/Zn-dependente, encontrada no citoplasma das células e no espaço intermembranas das mitocôndrias (SOD1); SOD Mn-dependente, presente na matriz mitocondrial (SOD2) e a SOD extracelular (SOD3) (WLASCHEK; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, 2005).

Estudos mostraram que, embora os níveis de mRNA de SOD1 e SOD2 durante a fase inflamatória do processo cicatricial fossem elevados, suas atividades apresentavam-se diminuídas. Essa diferença encontrada entre a expressão gênica e a atividade de SOD pode ser explicada pela inibição da atividade enzimática causada pela presença de elevados níveis de ERO na ferida (PIGEOLET et al., 1990, VESSEY; LEE; BLACKER, 1992).

Durante o reparo de feridas de camundongos com idade avançada e deficientes em SOD foi observado retardo no fechamento da lesão, enquanto camundongos jovens também deficientes em SOD não apresentaram alterações no curso do processo de cicatrização (PANCHATCHARAM et al., 2006).

2.3.2 Catalase

A catalase é responsável pela neutralização do H_2O_2 em oxigênio e água. A expressão de SOD citosólico e mitocondrial é coordenada com a expressão de catalase para promover a rápida degradação do H_2O_2 , impedindo a geração de radicais hidroxila altamente reativos (STEILING et al., 1999). Sua localização celular é exclusiva nos peroxissomos (KURAHASHI; FUJII, 2015).

Durante a cicatrização de feridas, a expressão de mRNA de catalase não se mostrou alterada (STEILING et al., 1999), contudo os níveis de proteína correspondente estavam diminuídos (ROY et al., 2006). Esse efeito pode ser explicado por possíveis degradações proteicas promovidas pelo excesso de ERO no local da ferida e consequente inativação enzimática (SHUKLA; RASIK; PATNAIK, 1997).

Quantidades aumentadas de catalase durante o reparo prejudicam a angiogênese e o fechamento da lesão devido à supressão dos níveis de H_2O_2 que são importantes à manutenção da angiogênese via VEGF (BRAUCHLE et al., 1996, SEN et al., 2002).

2.3.3 Glutationa peroxidase (GPx)

Assim como a catalase, a glutaciona peroxidase é responsável pela redução do H_2O_2 e de outros peróxidos orgânicos em oxigênio e água utilizando-se da molécula de glutaciona como doadora de elétrons. Existem oito tipos de GPx divididos em selenoenzimas glutaciona peroxidase (SeGPx), que contêm um resíduo selenocisteína em seu centro catalítico, e fosfolípido hidroxiperóxido glutaciona peroxidase (PHGPx) (KURAHASHI; FUJII, 2015).

GPx também se mostrou sensível ao efeito deletério de quantidades exacerbadas de ERO no local da ferida que comprometeram sua atividade, embora os níveis de mRNA mensageiro estivessem aumentados (SHUKLA; RASIK; PATNAIK, 1997). Além disso, devido

à dependência da enzima GPx em relação à glutatona, níveis diminuídos dessa molécula na lesão pode suprimir a atividade da enzima *in vivo* (RASIK; SHUKLA, 2000).

2.3.4 Peroxirredoxinas (Prdx)

São um grupo de seis enzimas que catalisam a redução de H₂O₂, peroxinitrato e outros peróxidos orgânicos usando preferencialmente a tiorredoxina como doador de elétrons (HANSCHMANN et al., 2013).

Dentre essas enzimas, Prdx6 teve expressão aumentada após a lesão (KÜMIN et al., 2007), sendo os queratinócitos detectados como sua maior fonte (MUNZ et al., 1997). Para determinar a participação dessa enzima no processo de reparo, a superexpressão e a ausência de Prdx6 foram estudados. No primeiro caso foi observado que o retardo no fechamento de feridas de ratos com idade avançada foi revertido pela superexpressão da enzima, sugerindo um mecanismo de proteção da mesma contra os efeitos adversos do acúmulo de ERO (KÜMIN et al., 2006). Já na segunda situação, camundongos apresentaram danos em células endoteliais e aumento na taxa de apoptose, resultando em graves hemorragias no tecido de granulação (WANG et al., 2003).

2.3.5 Heme oxigenases (HO)

São enzimas responsáveis pela degradação do grupo heme em monóxido de carbono, ferro e biliverdina que é posteriormente reduzida à bilirrubina, potente molécula antioxidante (BARANANO et al., 2002). Existem três isoformas dessa enzima, sendo a HO-1 a forma induzida em resposta ao estresse oxidativo e à hipóxia (LEE et al., 1997).

Durante o reparo tecidual observou-se aumento na expressão de HO-1 em células inflamatórias e queratinócitos (HANSELMANN; MAUCH; WERNER, 2001) sugerindo o efeito protetor da enzima sobre essas células contra o ambiente rico em ERO através da formação de bilirrubina (WAGENER et al., 2003). A supressão da expressão dessa enzima em camundongos é negativa aos processos de angiogênese e re-epitelização (DESHANE et al., 2007).

2.3.6 Antioxidantes não enzimáticos

Além das enzimas antioxidantes também há moléculas com atividade antioxidante, porém não-enzimáticas, de baixo peso molecular, endógenas e exógenas, que contribuem à detoxificação de ERO. Dentre as moléculas de origem endógena estão a glutatona, ubiquinona, bilirrubina, urato e ácido lipóico, enquanto vitamina C e E, carotenoides e compostos fenólicos são moléculas antioxidantes de origem exógena (SCHÄFER; WERNER, 2008).

Em feridas com cicatrização prejudicada, diminuição nos níveis de moléculas antioxidantes não enzimáticas foram observadas. Por exemplo, em cicatrização de feridas agudas, os teores de vitamina E, ascorbato e glutatona apresentaram redução de 60-70% comparativamente à pele normal (SHUKLA; RASIK; PATNAIK, 1997). Ratos com idade avançada apresentaram baixos conteúdos de vitamina E e glutatona (RASIK; SHUKLA, 2000), enquanto aqueles imunossuprimidos tiveram diminuição na glutatona e das vitaminas E e C (GUPTA; SINGH; RAGHUBIR, 2002). Assim, parece consenso que a melhora nos níveis de antioxidantes durante a cicatrização pode auxiliar no reparo tecidual.

2.4 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES X PRÓ-OXIDANTES DE COMPOSTOS FENÓLICOS

O consumo de frutas e vegetais é relacionado a hábitos saudáveis. Os efeitos benéficos dessa prática devem-se, principalmente, à presença de compostos fenólicos e carotenoides presentes nesses alimentos (EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016). A essas moléculas são atribuídas atividade antioxidante cujos mecanismos são variáveis, e.g., doação de elétrons, atuação como agente redutor e ação quelante de íons metálicos (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997). Além disso, flavonoides e ácidos fenólicos podem apresentar efeito sinérgico com antioxidantes fisiológicos como o ascorbato e tocoferol (CROFT, 1998), sofrerem oxidação por peroxidases e sequestrarem moléculas de H_2O_2 (SAKIHAMA et al., 2002, MICHALAK, 2006).

Devido a essas propriedades, essas moléculas são associadas à prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer (EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016).

Embora os efeitos antioxidantes tenham sido uma das características mais importantes atribuídas aos fitoquímicos, estudos recentes demonstraram uma dualidade nessa ação, tendo essas mesmas moléculas por vezes atividade pró-oxidante. Essa atividade parece estar relacionada às quantidades presentes de fitoquímicos no local e à natureza química das moléculas circundantes no ambiente (VILLANUEVA; KROSS, 2012). O potencial pró-oxidante dessas moléculas varia conforme o número de hidroxilas presentes em seu anel aromático, sendo o número de hidroxilas diretamente proporcional à atividade pró-oxidante (EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016).

O comportamento pró-oxidante de compostos fenólicos pode ser estimulado pela presença de oxigênio e metais de transição, como cobre e ferro, que catalisam o ciclo de oxirredução dessas moléculas resultando na formação de espécies reativas de oxigênio e radical fenoxil (GALATI; O'BRIEN, 2004). Embora a presença de metais de transição gere radicais prejudiciais à célula que causam danos ao DNA e mutagênese, os íons cobre podem ser os responsáveis pela atividade citotóxica seletiva dos polifenóis sobre as células cancerosas, uma vez que essas células apresentam maiores concentrações desse íon (AZMI; BHAT; HADI, 2005). De fato, o estresse oxidativo moderado causado pelo efeito pró-oxidante daqueles metabólitos secundários pode ser benéfico às células, pois aumenta os níveis de defesas antioxidantes e enzimas do metabolismo xenobiótico, provocando citoproteção (HALLIWELL, 2008).

2.5 A JABUTICABA

A jabuticaba é o fruto de uma árvore típica da floresta Atlântica, nativa da região sul e sudeste do Brasil (SOBRAL et al., [s.d.]). Estudos mostraram que as jabuticabas da espécie *Plinia cauliflora* possuem taninos, vitaminas, fibras e sais minerais (SOUZA-MOREIRA et al., 2010). A casca desses frutos mostrou-se rica em pectinas e antocianinas (LIMA et al., 2011, DE OLIVEIRA et al., 2011), das quais foram identificadas a cianidina-3-O-glicosídeo e delphinidina-3-O-glicosídeo (WU et al., 2012), além de outros compostos fenólicos como o ácido elágico (REYNERTSON et al., 2006).

A casca do fruto da jabuticaba tem propriedades adstringentes e é popularmente usada no tratamento de diarreia, irritações na pele, hemoptise, asma e para gargarejo em caso de inflamação crônica da garganta (MORTON, 1987, LORENZI, 1998, CRUZ; KAPLAN, 2004).

Estudos realizados com casca de jabuticaba incorporada na dieta de ratos obesos mostraram que os níveis de estresse oxidativo diminuíram no fígado, cérebro e rins, reduziram os níveis de lipídios saturados circulantes (BATISTA et al., 2014), aumentaram o colesterol HDL e controlaram a resistência à insulina (LENQUISTE et al., 2012, DRAGANO et al., 2013). Além disso, extratos polares e apolares obtidos a partir de cascas de jabuticaba (extração com etanol e diclorometano, respectivamente) exibiram efeito antiproliferativo em linhagens celulares tumorais (o primeiro contra células leucêmicas e o segundo contra células cancerosas de próstata) e atividade antioxidante *in vitro* (LEITE-LEGATTI et al., 2012). BATISTA et al. (2014) fizeram um extrato metanólico com as cascas de jabuticaba utilizadas na alimentação dos animais e identificaram quatro componentes: cianidina-3-O-glicosídeo, ácido gálico, ácido elágico e quercetina. Já LEITE-LEGATTI et al. (2012), além da cianidina-3-O-glicosídeo, identificaram a antocianina delphinidina-3-O-glicosídeo em seu extrato.

Estudos relacionados à atividade cicatrizante com extratos obtidos a partir de cascas de jabuticaba ainda não foram realizados. Porém, alguns trabalhos supracitados demonstraram que componentes presentes na casca desses frutos possuem atividade antioxidante, evidenciando uma propriedade de grande valia se tratando de cicatrização de feridas. Dentre os compostos presentes na casca de jabuticaba, destacam-se as antocianinas presentes em altas concentrações. Estudos envolvendo essa classe de fitoquímicos isolados a partir de cascas de soja, apresentaram redução no tempo de fechamento das lesões devido a promoção de angiogênese, atividade anti-inflamatória e efeito citoprotetor constatado *in vitro* em queratinócitos e fibroblastos (XU et al., 2013).

3 OBJETIVO

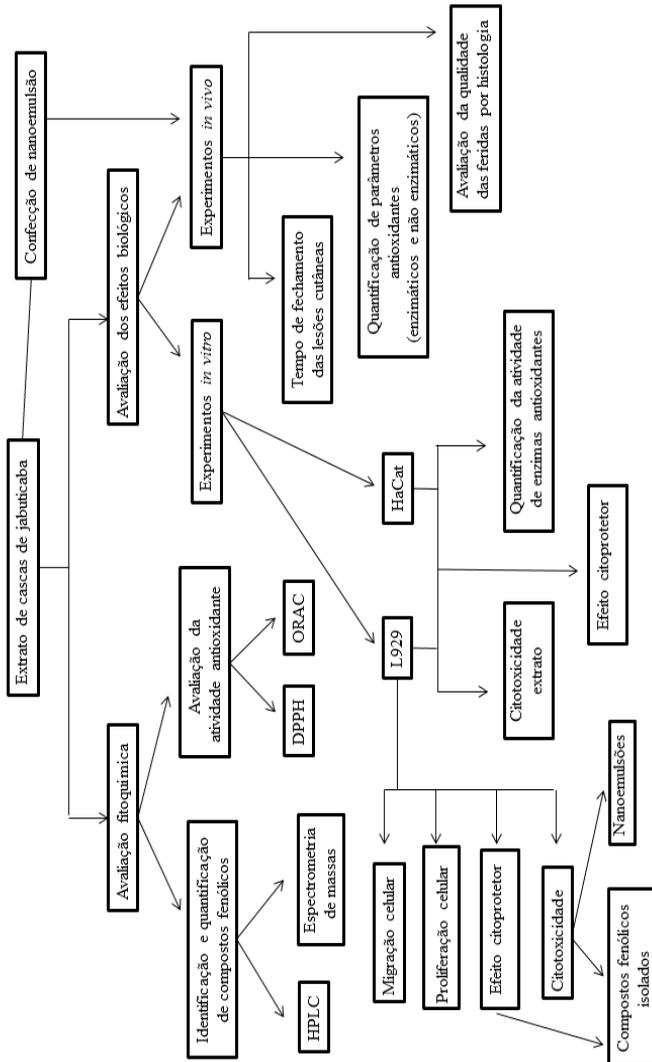
3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o extrato hidroalcoólico de cascas de jabuticaba quanto à sua composição química e seu potencial cicatrizante via determinação da atividade antioxidante e a promoção de proliferação e migração de fibroblastos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e quantificar os principais compostos fenólicos, em especial as antocianinas, presentes no extrato de cascas de jabuticaba através de cromatografia líquida de alta eficiência de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massas;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato determinada pelo sequestro do radical 2, 2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e do radical peroxila (ORAC);
- Determinar a viabilidade de fibroblastos L929 e queratinócitos da linhagem HaCat tratados com extrato de cascas de jabuticaba e nanoemulsão contendo extrato de cascas de jabuticaba;
- Avaliar o efeito citoprotetor de moléculas presentes no extrato de cascas de jabuticaba sob condições de estresse oxidativo induzido por H_2O_2 em fibroblastos L929 e queratinócitos da linhagem HaCat;
- Mensurar e comparar a atividade de enzimas antioxidantes derivadas de homogenatos de fibroblastos L929 e queratinócitos da linhagem HaCat após tratamento com extrato de cascas de jabuticaba e indução de estresse oxidativo por H_2O_2 ;
- Investigar o efeito citoprotetor de compostos fenólicos isolados presentes no extrato de cascas de jabuticaba em fibroblastos L929;
- Verificar o efeito promotor de migração e proliferação do extrato de cascas de jabuticaba sobre fibroblastos L929;
- Determinar a taxa de oclusão e a qualidade da cicatrização de lesões cutâneas dorsais de camundongos tratados com extrato de cascas de jabuticaba e nanoemulsão deste extrato, ao longo de 18 dias, através de avaliação histológica;
- Mensurar a atividade de enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica em homogenatos das lesões cutâneas do dorso de camundongos após tratamento com extrato de cascas de jabuticaba e nanoemulsão deste.

DESENHO EXPERIMENTAL DOS OBJETIVOS



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS COMPONENTES FITOQUÍMICOS

Os frutos de jabuticaba (*Plinia peruviana*) foram coletados em um sistema de plantio de quintal, durante a primavera de 2014, em Guaxupé, Minas Gerais, Brasil. A espécie vegetal foi identificada pelo Dr. Marcos Sobral e uma excisata foi depositada no Herbário Flor (FLOR 55902) do Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

As cascas das jabuticabas foram manualmente separadas das demais estruturas do fruto, liofilizadas e trituradas em um moedor elétrico. Essa biomassa foi adicionada de solução de etanol 50% (v/v), pH 3,6, na proporção 1: 10 (m/v), procedendo-se à extração dos compostos de interesse através de duas técnicas. Na primeira delas, o extrato hidroalcoólico de cascas de jabuticaba foi obtido por ultra-pressão (7 a 10 kg/cm² - EJUP). Nessa metodologia, quatro tempos de exposição foram testados (i.e., 1, 2, 3 e 4 h). Na segunda técnica de extração, a matriz líquido-sólido foi submetida a três pulsos de radiação micro-ondas, em aparelho de uso doméstico, com duração de cinco segundos intervalados por 60 segundos (EJMO) em potência máxima.

Os extratos obtidos através das metodologias de extração supracitadas foram filtrados em membrana de celulose, sob vácuo, e armazenadas em ultra-freezer (-80°C).

4.2 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de fenólicos totais dos extratos investigados foi determinado via espectrofotometria UV-Vis, conforme previamente descrito (RANDHIR; SHETTY; SHETTY, 2002). Os extratos foram previamente diluídos em etanol 50%, pH 3,6 (1: 10, v/v). Posteriormente, 1 mL de cada extrato foi adicionado a 5 mL de metanol 95% (v/v). Após essa segunda diluição, 1 mL de cada amostra foi acrescido de 1 mL de etanol 95% (v/v), 5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, seguido de incubação por 7 minutos.

Após a incubação, 1 mL de bicarbonato de sódio 5% (m/v) foi adicionado à solução, seguido de nova incubação no escuro, a

temperatura ambiente, por 1 h. Uma solução branco da reação foi preparada como descrito acima, porém substituindo o volume do extrato por etanol 50% (v/v), pH 3,6. A absorbância foi medida em 725 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (BEL LGS 53, BEL Engineering, Monza, Itália).

Os compostos fenólicos totais foram quantificados com auxílio de curva padrão de ácido gálico (100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, $y=0,018x$, $r^2=0,99$). Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de peso seco do extrato hidroalcoólico.

4.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONOIDES TOTAIS

A determinação do teor de flavonoides totais baseou-se no método colorimétrico utilizando cloreto de alumínio (ETRY; ORTEGA; SILVA, 2001).

Todos os extratos foram previamente diluídos em etanol 50% (v/v), pH 3,6 (1: 10, v/v). Após essa diluição, 0,5 mL de cada amostra foi adicionado a 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de cloreto de alumínio 2% (m/v), diluído em metanol p.a., seguido de incubação por 1 h.

Uma solução branco da reação foi preparada como descrito acima, porém substituindo os extratos de interesse pela solução de etanol 50%, pH 3,6. A absorbância ($\lambda = 420 \text{ nm}$) foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (BEL LGS 53, BEL Engineering, Monza, Itália).

Os flavonoides totais foram quantificados usando uma curva padrão de quercetina (25 a 300 $\mu\text{g/mL}$, $y=0,066x$, $r^2=0,99$). Os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina (EQ) por grama de peso seco do extrato hidroalcoólico.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS PRESENTES NO EXTRATO DE CASCAS DE JABUTICABA EM MICRO-ONDAS

Para a determinação do perfil cromatográfico de antocianinas utilizou-se a metodologia descrita por CHOUNG et al. (2001).

O extrato de cascas de jabuticaba em micro-ondas (EJMO) foi submetido à hidrólise ácida com HCl 2N (1: 5 v/v), em tubos com tampa selante e com atmosfera interna de nitrogênio, a 100°C, por 90 minutos

(QIN et al., 2010). O conteúdo de cianidina aglicona foi quantificado a partir da integração das áreas dos picos e curva padrão de cianidina (20 a 45 µg/mL, $y=0,7929x$, $r^2=0,99$) (Extrasynthese, França). Os resultados da quantificação de delfinidina aglicona foram expressos como equivalentes de cianidina.

A análise cromatográfica foi realizada injetando-se 10 µL de amostra em cromatógrafo líquido de alta eficiência (UltiMate 3000RS Dual System, Thermo Scientific), equipado com coluna C18 de fase reversa (Thermo Scientific C18, 250 mm x 4,6 mm, Ø interno 5 µm particular), termostatizada à 25°C. O fluxo foi ajustado em 0,6 mL/minuto, com eluição isocrática em solução de H₂O: CH₃OH: HCOOH (75: 20: 5, v/v/v) e monitoramento das absorbâncias dos analitos em 530 nm em detector de arranjo de diodos.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO NO EXTRATO DE CASCAS DE JABUTICABA EM MICRO-ONDAS

A análise cromatográfica foi realizada injetando-se 10 µL de amostra em cromatógrafo líquido de alta eficiência (UltiMate 3000RS Dual System, Thermo Scientific), equipado com coluna C18 de fase reversa (Thermo Scientific C18, 250 mm x 4,6 mm, Ø interno 5 µm particular), termostatizada a 35°C. O fluxo foi ajustado em 0,8 mL/minuto e as fases móveis água Milli-Q, pH 2,5, acidificada com ácido orto-fosfórico (A) e acetonitrila (B) foram utilizadas em gradiente seguindo o seguinte programa: 0-5 min, 5% B; 5-15 min, 60% B; 15-20 min, 60% B, 20-25 min, 5% B. O monitoramento das absorbâncias dos analitos foi em 254 nm em monitor de arranjo de diodos (MAZZARINO et al., 2017).

O conteúdo do ácido elágico do EJMO foi determinado a partir da integração das áreas dos picos e curva padrão de ácido elágico (3,12 a 100 µg/mL, $y=2,1454x$, $r^2=0,99$).

4.6 ANÁLISES DE ESPECTROMETRIA DE MASSA DO EXTRATO DE CASCAS DE JABUTICABA EM MICRO-ONDAS

As análises de espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF MS) foram realizadas em espectrômetro Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), equipado com laser de nitrogênio de 337 nm e

analisador de tempo de voo. Alíquotas de 1 µL das amostras foram adicionadas a 1 µL de solução da matriz ácido alfa-ciano 4-hidroxicinâmico (CHCA) 10 mg/mL, TFA (0,1% v/v) em acetonitrila: água (1:1 v/v) e transferidas para suporte metálico à cristalização e ionização assistida por laser. Os espectros foram adquiridos usando um acelerador de 20KV em refletor, operando em modo positivo, na faixa m/z 20 a 900. No total, 1500 pulsos foram acumulados para cada amostra.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DOS EXTRATOS ATRAVÉS DO RADICAL DPPH

A metodologia baseada no sequestro do radical 2, 2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) mede a capacidade inibitória de compostos quanto à ação de radicais livres, através do decréscimo da absorbância do meio de reação (KIM; GUO; PACKER, 2002).

Uma solução estoque de 7,9 mg de DPPH foi solubilizada em 2,5 mL de metanol. Essa solução foi então diluída na proporção de 1: 100 (v/v) em metanol 80% (v/v). A absorbância desta solução de DPPH situou-se entre 0,5 e 0,6.

As concentrações testadas de EJMO foram 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1 mg/mL baseadas no peso seco do extrato. Já para o EJUP, as concentrações avaliadas foram 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1 mg/mL (peso seco). As amostras foram adicionadas à solução de DPPH/metanol 80% (1:30 v/v) e a capacidade dos extratos testados de inibir o radical DPPH foi mensurada em espectrofotômetro UV-Vis (BEL LGS 53, BEL Engineering, Monza, Itália) à 515 nm, após incubação por 30 min, no escuro, a temperatura ambiente.

O mesmo procedimento realizado acima foi adotado para testar a solução de etanol 50% (v/v), pH 3,6, de modo a garantir que o solvente utilizado nos extratos não interferiu na solução de DPPH/metanol 80%. A porcentagem de inibição dos radicais DPPH foi calculada através da fórmula abaixo (Abs = absorbância):

$$\text{Inibição do DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs DPPH/metanol 80\%} - \text{Abs extratos}}{\text{Abs DPPH/metanol 80\%}} \times 100$$

4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO EJMO VIA CAPACIDADE DE NEUTRALIZAÇÃO DE RADICAIS OXIGÊNIO (ORAC)

Os radicais gerados pelo ataque do oxigênio atmosférico ao dicloreto de 2, 2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) reagem com a fluoresceína originando um produto não fluorescente. O decaimento na fluorescência da reação é medido por espectrometria de fluorescência (ALVES et al., 2010).

O teste foi realizado em placa de 96 poços preta onde 150 µL de fluoresceína sódica (63 mmol/L) diluída em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4, foram adicionados a 75 µL de amostra, tampão fosfato (branco) ou trolox 20 µM (padrão). Essa solução foi incubada a 37°C por 5 min, seguida por adição de 75 µL do reagente AAPH (178 mmol/L), diluído em tampão fosfato (WANG; CAO; PRIOR, 1997, OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001).

A fluorescência ($\lambda_{ex}=485$ nm e $\lambda_{em}=520$ nm) foi medida a cada 5 minutos por 2 horas em leitor de microplacas Spectramax Paradigma (Molecular Device, Califórnia, EUA).

O valor de ORAC foi calculado pela fórmula:

Valor ORAC (µmol) = $20K (S_{amostra} - S_{branco}) / (S_{trolox} - S_{branco})$,
onde:

20 = concentração de trolox;

K = fator diluição da amostra;

S = área sob a curva de decréscimo da fluorescência da amostra, trolox e branco, calculada pela fórmula:

$S = (0,5 + f_5 / f_0 + f_{10} / f_0 + f_{15} / f_0 + \dots + f_{115} / f_0 + f_{120} / f_0) \times 5$,
onde:

f_0 : fluorescência inicial no tempo zero;

f_i : fluorescência medida no tempo i (minutos).

Os resultados da variável em estudo foram expressos em µmol de equivalentes de trolox por grama de amostra baseada no peso seco.

4.9 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR USANDO FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 E QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat

Os EJMO e EJUP foram investigados quanto aos efeitos sobre a viabilidade celular de fibroblastos L929 e queratinócitos HaCat. As células foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Ambas linhagens celulares foram plaqueadas na densidade de 5×10^3 células/poço, em placas de 96 poços, utilizando como meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubados *overnight* a 37°C, em atmosfera de CO₂ 5%. Após esse período de incubação, o meio dos fibroblastos L929 foi substituído por DMEM suplementado com SFB 10%, contendo 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 µg/mL (peso seco) de EJMO, ou 1; 10; 50; 100; 200; 400; 800 e 1000 µg/mL (peso seco) do EJUP. Para o ensaio com queratinócitos HaCat, somente EJMO foi testado (1; 10; 50; 100; 200; 400; 800 e 1000 µg/mL - peso seco). O tratamento controle consistiu somente do meio de cultura DMEM. Após a aplicação dos tratamentos, as células foram incubadas por 24 e 48 h, a 37°C, em atmosfera de CO₂ 5%. Após o tempo de incubação, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de DMEM, acrescido de 10 µL de solução de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2, 5-difeniltetrazólio brometo (MTT - 5 mg/mL em PBS) por poço e incubado no escuro (3 h, 37°C, atmosfera de CO₂ 5%). O controle negativo, desprovido de células, consistiu de meio de cultura DMEM (100 µL) adicionado de 10 µL de solução de MTT. Subsequentemente, 85 µL do meio de cultura foram removidos, seguido da adição de 50 µL de DMSO a cada poço e incubação por 10 min, a 37°C, em atmosfera de CO₂ 5%. Após a homogeneização dos cristais de formazan, a absorbância (540 nm) foi determinada em leitor de microplaca Spectramax 190 (Molecular Devices, Califórnia, EUA). A viabilidade celular foi calculada e comparada ao controle (100% de viabilidade).

4.10 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO EJMO EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929

Os extratos obtidos com auxílio de radiação micro-ondas foram investigados quanto aos efeitos sobre a proliferação de fibroblastos L929. As células foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 células por placa de Petri para cultura celular, contendo 10 mL de meio de cultura

DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubados *overnight* à 37°C, em atmosfera de CO₂ 5%. Após esse período de incubação, o meio foi substituído por DMEM suplementado com SFB 10%, contendo 25; 50 e 100 µg/mL (peso seco) de EJMO. O tratamento controle consistiu somente do meio de cultura DMEM. Após a aplicação dos tratamentos, as células foram incubadas por 24 e 48 h, a 37°C, em atmosfera de CO₂ 5%. Dado o tempo de incubação, as células foram tratadas com *EdU* 10 µM por 2 h, conforme especificações do fabricante (*Click-iT Plus EdU Flow Cytometry Assay Kits – Life Technologies*). As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCANTO II, com excitação em 488 nm e emissão em 530 nm. A quantificação da proliferação a partir dos dados obtidos foi analisada com software FlowJo.

4.11 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE FIBROBLASTOS L929 E QUERATINÓCITOS HaCat APÓS INDUÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO COM H₂O₂

O H₂O₂ foi utilizado para a indução do estresse oxidativo como descrito por BALEKAR et al. (2012) e PONNUSAMY et al. (2015). Inicialmente, o teste de viabilidade celular utilizou os EJMO e EJUP para a definição das concentrações a investigar. Assim, as concentrações que promoveram as maiores taxas de viabilidade celular, após 24 h de exposição aos extratos, foram selecionadas para este experimento.

Fibroblastos L929 e queratinócitos HaCat foram plaqueados na densidade de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços contendo meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os cultivos foram incubados *overnight*, a 37 °C, em atmosfera de CO₂ 5%. Previamente à realização dos experimentos, uma curva de concentrações de H₂O₂ (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 mM) foi construída, a fim de determinar a dose que provocaria a redução da viabilidade celular em 80%, após 24 h de exposição. A concentração 1mM de H₂O₂ demonstrou o efeito referido. Para o tratamento, as células L929 foram inoculadas em meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10% contendo 0,5; 5; 25; 50 e 100 µg/mL (peso seco) de EJMO. Para EJUP, as concentrações testadas foram 1; 10; 50; 100 e 200 µg/mL (peso seco). Por sua vez, o tratamento dos queratinócitos HaCat utilizaram valores de 1; 10; 50; 100 e 200 µg/mL (peso seco). O tratamento foi aplicado em três tempos: (1) células foram tratadas com os extratos por 24 h, seguido por exposição a 1 mM de

H₂O₂ por 3 h; (2) células foram expostas aos extratos e 1 mM de H₂O₂ de forma concomitante e (3) exposição a 1 mM de H₂O₂ por 3 h, seguido por tratamento com extratos por 24 h.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do teste de MTT como descrito no item 4.9.

4.12 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 APÓS TRATAMENTO COM CIANIDINA-3-O-GLICOSÍDEO OU ÁCIDO ELÁGICO

Fibroblastos L929 foram plaqueados (5×10^3 células/poço) em placas de 96 poços contendo meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os cultivos foram incubados *overnight*, a 37 °C, em atmosfera de CO₂ 5%. Para os tratamentos, as células L929 foram inoculadas em meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10% contendo 0,24475 µg/mL, 0,4895 µg/mL e 0,979 µg/mL de cianidina-3-O-glicosídeo ou 0,0412 µg/mL, 0,0823 µg/mL e 0,1646 µg/mL de ácido elágico. Tais concentrações equivalem aos conteúdos desses compostos presentes no EJMO nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL.

O ensaio de viabilidade celular utilizou o reagente MTT, conforme descrito no item 4.9, e a determinação da atividade antioxidante dos compostos, incubados por 24 h seguido pela indução de estresse oxidativo por H₂O₂ durante 3 h, foi realizada como descrito no item 4.11.

4.13 INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO MEDIADO POR H₂O₂ EM FIBROBLASTOS L929 E QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat PARA POSTERIOR AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Fibroblastos L929 foram plaqueados (1×10^6 células/poço) em placas de 6 poços contendo 3 mL meio de cultura DMEM por poço, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os cultivos foram incubados *overnight*, a 37 °C, em atmosfera de CO₂ 5%. Após esse período, as células foram tratadas conforme segue:

- Controle não estressado: tratado somente com meio de cultura DMEM por 24 h;

- Tratamento não estressado: tratado com 25, 50 e 100 µg/mL (peso seco) de EJMO, por 24 h;

- Controle estressado: tratado somente com meio de cultura DMEM por 24 h, seguido por exposição a 1 mM H₂O₂ durante 15, 30, 60, 120 ou 180 minutos;

- Tratamento estressado: tratado com 25, 50 e 100 µg/mL (peso seco) de EJMO por 24 h seguido por exposição a 1 mM H₂O₂ durante 15, 30, 60, 120 ou 180 minutos.

Após a incubação, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura. O conteúdo de três poços da placa de cultura de um mesmo tratamento foi coletado e reunido formando uma única amostra (*pool*).

As amostras foram centrifugadas (2000 rpm, 10 min, à 4°C). Os *pellets* foram ressuspensos em 3 mL de tampão de lise (tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, triton 0,25%, EDTA 1mM) e homogeneizados em Ultra-Turrax® (5 s, 2x).

As amostras foram aliqüotadas e armazenadas em freezer -80°C até o uso para avaliação da atividade enzimática.

O procedimento para avaliação de enzimas antioxidantes de queratinócitos da linhagem HaCat adotou a metodologia descrita por LIU et al. (2016). As células foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/poço, em placas de 6 poços contendo 3 mL meio de cultura DMEM por poço, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os cultivos foram incubados por 24 h, à 37 °C, em atmosfera de CO₂ 5%. Após esse período, as células foram tratadas como descrito a seguir:

- Controle não estressado: tratado somente com meio de cultura DMEM, por 24 h;

- Tratamento não estressado: tratado com 1, 10 e 50 µg/mL (peso seco) de EJMO, por 24 h;

- Controle estressado: tratado somente com meio de cultura DMEM por 2,5 h, seguido por exposição a 150 µM H₂O₂ durante 2 h;

- Tratamento estressado: tratado com 1, 10 e 50 µg/mL (peso seco) de EJMO por 2,5 h, seguido por exposição a 150 µM H₂O₂ durante 2 h.

Após a aplicação dos tratamentos, os procedimentos subsequentes foram os mesmos descritos para os cultivos de fibroblastos da linhagem L929.

4.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 E QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat SUBMETIDOS AO EJMO

Neste teste, a redução da absorvância em $\lambda = 240$ nm no meio de reação indica o consumo de H_2O_2 pela enzima catalase (AEBI, 1984). Foram utilizadas microplacas UV-Star® (Greiner Bio-One), onde 30 μ L das amostras foram adicionados a 270 μ L de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0. Previamente, foram acrescidas à solução tampão quantidades de H_2O_2 necessárias à obtenção de absorvância da solução entre 0,38 e 0,4.

A absorvância ($\lambda = 240$) do meio de reação foi monitorada a cada minuto, durante 10 min, em leitor de microplacas Spectramax 190 (Molecular Devices, Califórnia, EUA) e os resultados foram expressos em U de catalase/ mg de proteína.

O teor de proteínas das amostras foi mensurado conforme descrito por BRADFORD (1976).

4.15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx) EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 E QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat EXPOSTOS AO EJMO

A atividade da enzima GPx foi determinada a partir da oxidação de NADPH na presença de H_2O_2 , monitorada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 340 nm (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984).

O reagente de trabalho utilizado para o ensaio foi preparado utilizando os seguintes reagentes, adicionados na ordem descrita abaixo (volume final = 12 mL):

- 12 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4), contendo EDTA 1 mM e azida sódica 1 mM;
- 48 μ L de NADPH 50 mM;
- 0,360 μ L de solução de glutationa reduzida (GSH) na concentração de 10 mg/mL;
- 0,4 U/mL de glutationa redutase.

Foram pipetados em microplaca UV-Star® (Greiner Bio-One) 40 μ L da amostra e 160 μ L do reagente de trabalho. Em seguida, a leitura basal da absorvância ($\lambda = 340$ nm) foi realizada durante 5 min, com

registros a cada 30 s. Após esse período, 25 μ L de peróxido de *t*-butil (10 mM) foram adicionados à solução na microplaca e uma nova leitura da absorbância foi realizada em intervalos de 30 s, durante 5 min (Spectramax 190, Molecular Devices, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos em U de GPx/ mg de proteína.

O teor de proteínas das amostras foi mensurado utilizando a metodologia descrita por BRADFORD (1976).

4.16 TESTE DE MIGRAÇÃO CELULAR (*SCRATCH ASSAY*)

Este ensaio avaliou o efeito estimulante do EJMO à migração de fibroblastos L929, segundo BALEKAR et al. (2012).

Fibroblastos L929 foram inoculados (5×10^5 células/poço), em placas de 24 poços contendo DMEM como meio de cultura, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os cultivos foram incubados *overnight*, a 37°C, em atmosfera de CO₂ 5%.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e a camada aderente de células sofreu uma ranhura feita com uma ponteira estéril de micropipeta. Os *debris* celulares foram removidos através de lavagem com PBS. As células foram tratadas com meio de cultura DMEM, suplementado com SFB 10%, contendo 0,5; 5; 10; 25; 50 e 100 μ g/mL (peso seco) de EJMO. Controles negativos receberam somente DMEM suplementado com 10% SFB. Para evitar a proliferação celular, mitomicina C (10 μ g/mL) foi adicionada ao meio de cultura e, dessa forma, somente a migração celular foi avaliada. As células foram incubadas por 12 h, a 37°C, em atmosfera de CO₂ 5%. As imagens da área da ranhura foram capturadas imediatamente após a lesão (tempo 0) e após 12 h de incubação, através de câmera fotográfica acoplada ao microscópio (40x de magnitude). As fotos foram analisadas através do programa *ImageJ*, versão 1.42q (*National Institute for Health*, EUA) para determinar a largura da ranhura e a taxa de migração celular, variável esta calculada através da fórmula:

$$\text{Taxa de migração (\%)} = \frac{\text{Distância entre a ranhura (0 h)} - \text{Distância entre a ranhura (12h)}}{\text{Distância entre a ranhura (0 h)}} \times 100$$

4.17 PREPARAÇÃO DAS NANOEMULSÕES A PARTIR DO EJMO

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de homogeneização de alta pressão. Uma fase aquosa contendo 1 % (m/v) do surfactante polissorbato 80 (Tween 80, Vetec) foi vertida sobre uma fase oleosa composta por 5 % (m/v) de triglicerídeos de cadeia média (TCM, Miglyol 812N), sob agitação magnética moderada, e homogeneizada por 15 min. Esta pré-emulsão foi submetida a homogeneizador de alta pressão Homolab (FBF Itália), por 3 ciclos, a 500 bar de pressão. Para a obtenção das nanoemulsões contendo o EJMO, este foi previamente submetido à evaporação sob pressão reduzida para remoção do etanol e filtração em suporte de papel filtro, com tamanho de poro de 14 μm . As soluções extrativas foram adicionadas à fase aquosa na concentração de 10% (v/v) e preparadas conforme descrito anteriormente.

4.18 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS DA NANOEMULSÃO DO EJMO

O conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais da nanoemulsão branca, nanoemulsão contendo EJMO e do extrato utilizado à incorporação na nanoemulsão foi mensurado conforme descrito nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente.

4.19 CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO DO EJMO

A nanoemulsão controle e a nanoemulsão do EJMO tiveram seu tamanho médio de partículas determinado por dispersão de luz dinâmica (DLS), enquanto o potencial Zeta foi mensurado por anemometria laser Doppler, em equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As nanoemulsões foram diluídas em água ultrapura e as quantificações realizadas a 25°C. A determinação do tamanho de partículas utilizou ângulo de dispersão fixo de 90° e para as medidas do potencial Zeta (ζ), as amostras foram colocadas em células eletroforéticas, onde o potencial de ± 150 mV foi estabelecido. Os valores de potencial ζ foram calculados como mobilidade eletroforética média usando a equação de Smoluchowski.

4.20 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DA NANOEMULSÃO DO EJMO USANDO FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929

As nanoemulsões e seu respectivo extrato foram investigados quanto aos efeitos sobre a viabilidade celular de fibroblastos L929 conforme descrito no item 4.9. As concentrações utilizadas neste ensaio de nanoemulsão branca, nanoemulsão EJMO e do extrato utilizado para incorporação na nanoemulsão foram: 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35 e 0,4%.

4.21 ANÁLISE DA CICATRIZAÇÃO EM MODELO DE ÚLCERA CUTÂNEA EM CAMUNDONGOS

Camundongos Swiss (25 ± 5 g peso corpóreo, 4-6 semanas de idade) foram mantidos em caixas de polipropileno acondicionadas dentro de gabinetes para biotério (Bonther, Ribeirão Preto, São Paulo) com temperatura ajustada a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar igual a $50 \pm 10\%$ e 120 trocas de ar por hora. Os animais foram submetidos a ciclos de luz 12h/12h claro/escuro. Comida e água foram fornecidos *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) sob o protocolo CEUA n° 3252200417 (ANEXO A).

No dia do experimento, os camundongos foram anestesiados com quetamina (Dopalen®, 90 mg/kg) e xilazina (Dopaser®, 15 mg/kg) por via intraperitoneal. O dorso desses animais foi depilado e uma única úlcera (6 mm Ø) foi produzida no local. A epiderme e a derme foram removidas (modelo de ferida excisional). Após esse procedimento, os animais foram mantidos individualmente em caixas de polipropileno.

Os animais foram divididos em 4 grupos:

- Grupo controle: as úlceras dos animais foram tratadas topicamente somente com gel a base de Natrosol™ 3% (m/v);

- Grupo tratado com EJMO: as úlceras dos animais foram tratadas topicamente com extrato hidroalcolico 50% (v/v, pH 3,6), proveniente de cascas de jabuticaba preparado em micro-ondas nas concentrações de 2,5; 5 e 10 %, incorporado ao gel base de Natrosol™ 3%;

- Grupo nanoemulsão controle: as úlceras dos animais foram tratadas topicamente com nanoemulsões sem a incorporação do extrato hidroalcolico de cascas de jabuticaba em gel base de Natrosol™ 3%;

- Grupo nanoemulsão extrato: as úlceras dos animais foram tratadas topicamente com extrato hidroalcoólico de cascas de jabuticaba em micro-ondas incorporado em nanoemulsões (concentração final de extrato igual a 10%) em gel base de NatrosolTM 3%.

Os tratamentos foram aplicados com o auxílio de uma espátula diretamente sobre a lesão imediatamente após a confecção das úlceras e também nos dias 3, 5, 7, 9, 12 e 14 pós-ferimento. Primeiramente, o fechamento das feridas foi acompanhado até o 18º dia após a lesão a fim de verificar o tempo total de re-epitelização. Anteriormente a cada nova aplicação do tratamento, a região das úlceras era higienizada com solução salina.

4.22 IMAGEAMENTO DAS ÚLCERAS CUTÂNEAS

A cada aplicação do tratamento, imagens das úlceras foram coletadas com o auxílio de uma câmera digital Sony Cyber-shot DSC-WX50. O cálculo da área das feridas foi realizado com o auxílio do programa *ImageJ* versão 1.42q (*National Institute for Health*, EUA) e a taxa de fechamento das úlceras foi expressa como porcentagem em relação ao tamanho da ferida no dia 0.

4.23 COLETA DAS PEÇAS

Nos dias 2, 5, 7, 9 e 14 após a indução da lesão, animais de cada grupo foram eutanasiados com sobredose dos anestésicos quetamina (Dopalen®) e xilazina (Dopaser®). As úlceras foram removidas do dorso dos animais com o auxílio de um bisturi.

4.24 CORTES HISTOLÓGICOS DAS ÚLCERAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS

Os tecidos fixados em formol 10% passaram pelo processo de desidratação em soluções alcoólicas, diafanização em xilol e inclusão na parafina e posterior corte em micrótomo (5 µm de espessura). Para coloração dos tecidos foram utilizadas soluções de hematoxilina-eosina.

4.25 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DURANTE A CICATRIZAÇÃO *IN VIVO*

As biópsias retiradas nos dias 2, 5 e 7 após a indução da lesão de cada grupo foram congeladas em N₂ líquido e mantidas em freezer -80°C até seu uso.

Para as análises enzimáticas, as biópsias coletadas foram adicionadas a tampão fosfato de sódio 20 mM com cloreto de potássio (KCl) 140 mM e EDTA 5 mM, pH 7,4 (1: 10 m/v), para posterior homogeneização em aparelho Ultra-Turrax®. Após esse procedimento, 10 µL de Triton X-100 10% (m/v) foi acrescido a cada 100 µL de homogenato. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm, 10 min, 4°C), os sobrenadantes recolhidos e mantidos em freezer -80°C para posterior análise da atividade enzimática.

4.26 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM LESÕES CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS

A atividade da enzima SOD foi determinada a partir da sua capacidade de inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio cloreto (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

O reagente de trabalho utilizado para o ensaio foi preparado utilizando os seguintes reagentes:

- 120 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,8;
- 13 mM de metionina;
- 75 mM de NBT;
- 100 nM EDTA
- 2 µM de riboflavina.

O meio de reação permaneceu protegido da luz durante todo o ensaio.

Em microplaca de 96 poços foram preparadas as seguintes soluções:

- Branca: 10 µL do tampão utilizado à homogeneização das amostras, acrescido de 290 µL de reagente de trabalho. Os poços com solução branca foram mantidos no escuro durante incubação e a média de suas absorbâncias foi subtraída das leituras das demais amostras quantificadas;

- Controle: 10 μL da amostra acrescido de 290 μL de reagente de trabalho. Os poços com controle foram mantidos diretamente sob exposição à luz durante incubação;

- Amostra: 10 μL da amostra acrescido de 290 μL de reagente de trabalho. Os poços com amostras foram mantidos no escuro durante a incubação.

Após incubação por 5 min, as absorbâncias foram determinadas em leitor de microplacas Spectramax 190 (Molecular Devices, Califórnia, EUA) em comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram expressos em U de SOD/ mg de proteína, sendo que 1 U foi definida como a quantidade de enzima requerida para inibir 50 % da fotorredução do NBT.

O teor de proteínas das amostras foi mensurado conforme descrito por BRADFORD (1976).

4.27 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE EM LESÕES CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS

A análise da atividade da enzima catalase nas lesões dos dias 2, 5 e 7 foram realizadas conforme descrito no item 4.14.

4.28 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM LESÕES CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS

A quantificação da peroxidação lipídica considerou a reação de produção de compostos secundários do processo de peroxidação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

O ensaio foi realizado adicionando 200 μL de amostra ou tampão de homogeneização dos tecidos (solução branca) a 50 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1% (m/v), 375 μL de ácido acético 20% (v/v), pH 3,5, e 375 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% (m/v).

As amostras foram incubadas a 95°C, por 60 min, seguido de centrifugação a 3500 rpm, durante 10 min. O sobrenadante foi coletado e a absorbância ($\lambda = 535$ nm) foi medida em leitor de microplacas Spectramax 190 (Molecular Devices, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos em nmol de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)/ mg de proteína.

O teor de proteínas das amostras foi determinado conforme metodologia descrita por BRADFORD (1976).

4.29 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey na ocorrência de diferença estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os valores foram expressos como médias \pm desvio padrão, ou medianas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE CASCAS DE JABUTICABA

Vegetais usados pela medicina popular são considerados potenciais agentes terapêuticos na prevenção e tratamento de doenças. Metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, presentes nas plantas e reconhecidos pelos seus efeitos benéficos a saúde, podem ser obtidos através de diversos métodos, sendo possível potencializar seus efeitos dependendo da metodologia de extração utilizada.

Para obter um bom rendimento de extratos vegetais é necessário levar em consideração alguns fatores como o tipo de solvente utilizado, o pH do meio e a metodologia de extração. Solventes como metanol, etanol, acetonitrila e acetona, isoladamente ou misturados à água, são boas opções à extração de polifenóis (TSAO, 2010). Geralmente, extratos com alto conteúdo de antocianinas requerem solventes orgânicos acidificados como metanol e etanol. Esses tipos de solventes, com baixo grau de viscosidade, aceleram a transferência dos metabólitos da biomassa para o extrato (AJILA et al., 2011). Além disso, solventes, ou soluções extratoras com baixo pH favorecem a estabilidade das antocianinas, na medida em que essas assumem a forma mais estável de cátion flavilium. De fato, o solvente utilizado na extração poderá influenciar a capacidade antioxidante do extrato, já que esta atividade geralmente é associada ao conteúdo de compostos fenólicos (BRGLEZ MOJZER et al., 2016).

No presente estudo, extratos hidroalcoólicos de cascas de jabuticaba (pH 3,6) foram obtidos através da exposição das biomassas à radiação por micro-ondas e à ultra-pressão. Embora ambos os extratos tenham apresentado atividade antioxidante frente a fibroblastos da linhagem L929, o extrato submetido à extração assistida por micro-ondas (EJMO) foi o escolhido para o presente trabalho. Além da simplicidade desse método que utiliza apenas um aparelho convencional de micro-ondas, a diminuição no tempo de extração é um fator importante a ser considerado, pois reduz as chances de degradação e oxidação dos compostos. A extração em aparelho de micro-ondas leva em torno de 2,5 min para ser concluída, enquanto o aparelho de ultra-pressão requereu no mínimo 1 h para completar o processo de extração. Embora o micro-ondas submeta os extratos a altas temperaturas, fator

que promove degradação de compostos fenólicos e que não está presente na extração por ultra-pressão, realizada a temperatura ambiente, esta característica pode favorecer a velocidade de transferência de massa e a solubilidade do extrato. Além disso, a alta temperatura também pode diminuir a viscosidade e a tensão superficial do solvente utilizado (BRUNNER, 1994, BRUNNER, 2005).

A extração realizada em extrator de ultra-pressão originou 4 tipos de extratos, consoante aos tempos de exposição à ultra-pressão, i.e. 1, 2, 3 e 4 h. Todos os extratos foram avaliados quanto aos conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante (ensaio com o radical DPPH), citotoxicidade em fibroblastos L929 murinos e também em modelo de indução de estresse oxidativo em células L929. Esses resultados encontram-se compilados no artigo intitulado “*Cytoprotective effects of jaboticaba (Plinia peruviana, Poir. Govaerts) fruit peel extracts against H₂O₂-induced oxidative stress*” anexado na parte final deste trabalho (Apêndice A).

A caracterização química do EJMO mostrou que o conteúdo de polifenóis totais foi igual a $633,42 \pm 66,99$ mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco de extrato. A quantificação de flavonoides totais revelou conteúdo de $11,78 \pm 0,89$ mg equivalentes de quercetina/g de peso seco de extrato. Estudos realizados com vários genótipos de jaboticabas mostram uma grande discrepância nos valores de polifenóis totais da casca deste fruto, e.g., 3,137 mg/g para *Plinia trunciflora* (CALLONI et al., 2015) e 11,38 a 55,63 mg/g para *Myrciaria cauliflora* (NERI-NUMA et al., 2018). O estudo que mais se aproximou dos resultados obtidos neste trabalho foi LEITE-LEGATTI et al. (2012) que encontraram 556,3 mg/g de polifenóis em cascas de *Myrciaria jaboticaba*.

As análises à identificação de compostos fenólicos e antocianinas através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) apontaram a presença de ácido elágico, cianidina e delfinidina no EJMO. A quantificação destes compostos foi realizada (Tabela 1), sendo que no caso das antocianinas o extrato sofreu hidrólise ácida prévia para obtenção da fração aglicona, uma vez que na natureza estes metabólitos secundários encontram-se em sua forma glicosilada, majoritariamente. Desta forma, o conteúdo de cianidina e delfinidina aqui apresentados se refere as suas formas agliconas totais.

Tabela 1 - Quantificação de compostos fenólicos e antocianinas deglicosiladas de extrato de cascas de jaboticaba obtidos em micro-ondas (EJMO) determinado por HPLC-DAD. Os valores de delfinidina são expressos em equivalentes de cianidina (EC). Dados expressos em média \pm DP (n = 5).

Cianidina (mg/g)	Delfinidina (mg EC/g)	Ácido elágico (mg/g)
12,18 \pm 1,71	1,16 \pm 0,16	1,71 \pm 0,09

Comparativamente a esse trabalho, a antocianina cianidina-3-O-glicosídeo foi encontrada na casca de *Myrciaria cauliflora* nas concentrações de 12,61 a 19,64 mg/g, enquanto delfinidina-3-O-glicosídeo apresentou valores em torno de 2,69 a 6,35 mg/g (NERI-NUMA et al., 2018). Em cascas de *Myrciaria jaboticaba*, cianidina-3-O-glicosídeo e delfinidina-3-O-glicosídeo apresentaram valores iguais a 28,663 mg/g e 3,563 mg/g, respectivamente (PLAZA et al., 2016). LEITE-LEGATTI et al. (2012) encontraram valores de cianidina-3-O-glicosídeo iguais a 19,63 mg/g e delfinidina-3-O-glicosídeo iguais a 6,34 mg/g na casca da jaboticaba dessa mesma espécie. O composto fenólico ácido elágico foi encontrado nas concentrações de 1,2 mg/g e 1,428 mg/g em *Plinia jaboticaba* (LAGE et al., 2014, PLAZA et al., 2016) e 3,48 mg/g em *Myrciaria jaboticaba* (BATISTA et al., 2014).

A identidade dos compostos fenólicos do EJMO, determinada por HPLC, foi confirmada através da espectrometria de massa, com padrões típicos de íons moleculares e dos principais fragmentos para a cianidina-3-O-glicosídeo (m/z 449,116 e m/z 287,974), delfinidina-3-O-glicosídeo (m/z 465,196 e m/z 302,928) e ácido elágico (m/z 300,943) (LEITE-LEGATTI et al., 2012, CALLONI et al., 2015, PLAZA et al., 2016). CALLONI et al. (2015) descreveu pela primeira vez a presença do flavonoide kaempferol (m/z 287,056) no extrato de casca de *Plinia trunciflora* através de espectrometria de massa. De interesse, ressalta-se que nesse trabalho, valor similar de massa àquela descrita pelo autor supracitado foi encontrada (m/z 287,974), sugerindo a presença daquele flavonoide no EJMO.

Variações no conteúdo de compostos fenólicos encontrados em extratos vegetais são comuns em decorrência de uma série de fatores bióticos e abióticos que influenciam na produção desses bioativos como, por exemplo, fatores genéticos (BRAVO, 2009), diferenças interespecíficas (DUTHIE et al., 2000), fatores ambientais (intensidade de luz, calor, seca) e até mesmo o sistema de manejo da cultura (MANACH et al., 2004).

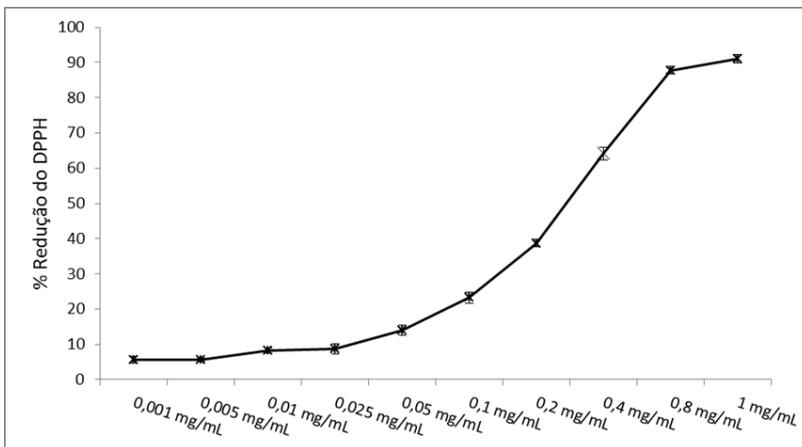
5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO EJMO

A atividade antioxidante do EJMO foi avaliada através do ensaio de inibição do radical 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) após 30 min de incubação.

O valor de EC_{50} observado para o EJMO foi de $0,2335 \pm 0,012$ mg/mL no ensaio com o radical DPPH. Estudos com extratos de cascas de *Myrciaria cauliflora*, *Myrciaria jaboticaba* e *Plinia trunciflora* mostraram valores de IC_{50} à inibição do radical DPPH iguais a 0,04358 mg/mL, 0,04538 mg/mL e 0,35 mg/mL, respectivamente (LEITE-LEGATTI et al., 2012, CALLONI et al., 2015, NERI-NUMA et al., 2018).

Existe uma correlação positiva entre a atividade antioxidante mensurada através do sequestro do radical DPPH e a concentração do extrato ($R^2=0,9699$) (Figura 1).

Figura 1 - Atividade antioxidante do EJMO avaliada através do ensaio com o radical DPPH, após 30 min de exposição. Dados expressos em média \pm DP (n = 3).



Fonte: Elaboração própria.

Um segundo teste para avaliar a atividade antioxidante do EJMO foi realizado através da metodologia ORAC, onde o sequestro do radical peroxila, gerado pela reação entre o dicloreto de 2, 2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) e oxigênio atmosférico, é mensurada.

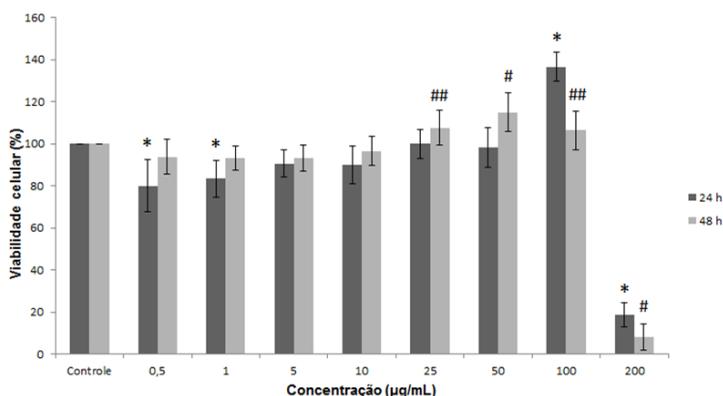
O EJMO apresentou valor de ORAC igual a $2461,14 \pm 126,37$ μmol equivalentes de Trolox/g de extrato (peso seco). Estudos com cascas de jaboticaba da espécie *Myrciaria cauliflora* apresentaram valores de ORAC que variaram de 519,14 até 807 μmol equivalentes de Trolox/g (NERI-NUMA et al., 2018), enquanto extratos com cascas de *Myrciaria jaboticaba* revelaram valores de ORAC iguais a 25514 μmol equivalentes de Trolox/g (LEITE-LEGATTI et al., 2012).

5.3 VIABILIDADE CELULAR DE FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 APÓS TRATAMENTO COM EJMO

Ensaio *in vitro* foram realizados com fibroblastos da linhagem L929. Essas células são fundamentais durante o processo de cicatrização de feridas, pois são elas as únicas responsáveis pela produção de novas moléculas de matriz extracelular no local, em especial colágeno (PONNUSAMY et al., 2015).

Numa primeira abordagem, fibroblastos da linhagem L929 foram testados frente ao EJMO para a determinação da viabilidade celular, após 24 e 48 h de exposição (Figura 2).

Figura 2 - Viabilidade de fibroblastos, linhagem L929, após 24 e 48 h de tratamento com extrato de cascas de jaboticaba obtidos com o auxílio de radiação micro-ondas. Dados expressos em média \pm DP (n=18).



* indica $p < 0,01$ em relação ao controle-24 h;

indica $p < 0,01$ em relação ao controle-48 h;

indica $p < 0,05$ em relação ao controle-48 h.

Fonte: Elaboração própria.

O EJMO gerou acréscimos significativos da viabilidade celular na concentração de 100 µg/mL durante a exposição por 24 h, enquanto as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL mostraram-se positivas após 48 h de incubação. De interesse, destaca-se que a partir da concentração de 200 µg/mL, o extrato de micro-ondas reduziu a viabilidade celular acentuadamente.

Aumentos na taxa da viabilidade celular podem indicar indução de proliferação pelos compostos testados. A metodologia que utiliza o reagente MTT é inespecífica para avaliar tal efeito, já que os resultados obtidos refletem o estado metabólico celular, dado que a redução do MTT é dependente de desidrogenases e agentes redutores tais como nicotinamina adenina dinucleotídeo (NADH) encontrados na mitocôndria (STOCKERT et al., 2012). Por isso, não é correto afirmar que o aumento na viabilidade celular é um indicador de proliferação devido a inespecificidade desse método.

5.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO EJMO EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929

As concentrações de EJMO que provocaram o aumento da viabilidade de células da linhagem L929 no experimento com MTT, foram submetidas ao ensaio utilizando o kit *Click-It® Plus EdU* para citometria de fluxo para avaliar a proliferação celular. Esse método é mais preciso para tal fim, porque quantifica a síntese de DNA das células em replicação. Dentre as três concentrações de EJMO (25, 50 e 100µg/mL) incubadas junto às células por 24 e 48 h, apenas o tratamento 100µg/mL - 48 h aumentou a proliferação celular de forma significativa em relação ao controle (Tabela 2 – Figura 4D).

Tabela 2 - Porcentagem de células em fase proliferativa após tratamento com EJMO por 24 e 48 h. Dados expressos em média ± DP (n = 3). Letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos avaliados no mesmo período de tempo.

	Controle (%)	25 µg/mL (%)	50 µg/mL (%)	100 µg/mL (%)
24h	64,90 ± 3,57 a	63,67 ± 0,55 a	63,60 ± 1,35 a	64,40 ± 2,30 a
48h	49,77 ± 1,06 a	48,70 ± 0,56 a	52,43 ± 0,85 ab	53,77 ± 2,64 b

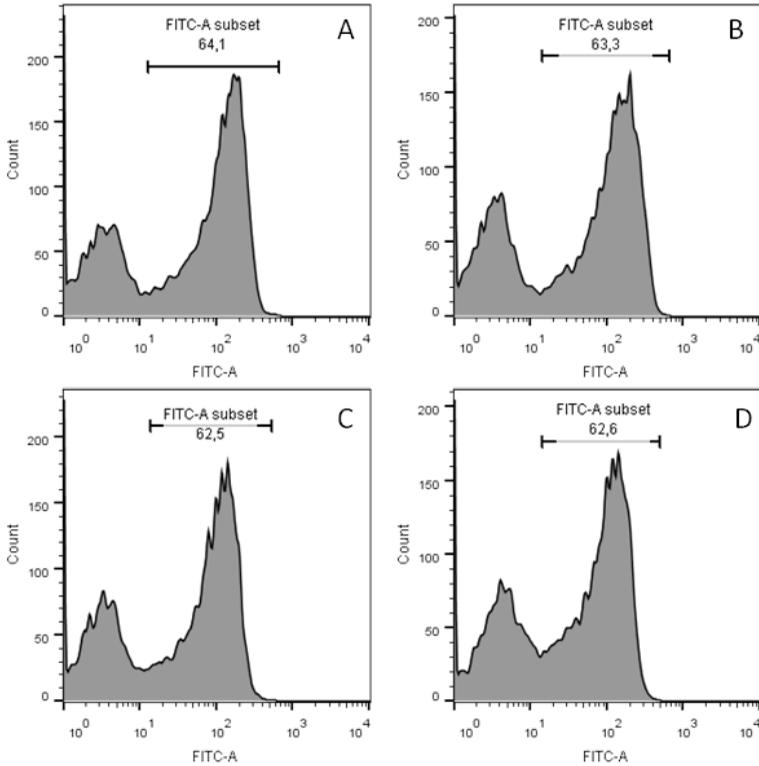
Embora a concentração de 100 µg/mL e as concentrações de 25 e 50 µg/mL tenham aumentado a viabilidade celular após 24 e 48 h de incubação com o EJMO, respectivamente, nenhuma delas promoveu proliferação de fibroblastos L929 (Tabela 2 – Figuras 3 e 4). Esses resultados indicam que o extrato de cascas de jabuticaba, rico em compostos fenólicos, pode estar influenciando o metabolismo celular mitocondrial promovendo alterações nas vias de oxirredução, visto que esses compostos apresentam atividade antioxidante/pró-oxidante dependendo das condições do meio.

Diversos estudos envolvendo polifenóis e sua interação com a cadeia de transporte de elétrons, complexo V (ATP sintase), sistemas antioxidantes endógenos, síntese de ATP, potencial mitocondrial transmembrana e biogênese mitocondrial têm sido realizados (TEIXEIRA et al., 2018). Estudo com o estilbeno resveratrol, isoladamente ou em conjunto com o equol, demonstrou que esses fitoquímicos aumentam a massa mitocondrial, o conteúdo de DNA mitocondrial, a atividade enzimática de SIRT1 e a expressão de PGC1- α em HUVEC; esses últimos conhecidos como fatores diretamente envolvidos no controle do metabolismo e biogênese mitocondrial (DAVINELLI et al., 2013).

Sob o efeito de agentes estressores, extratos ricos em polifenóis são capazes de atenuar a disfunção mitocondrial, protegendo esta organela contra o estresse oxidativo induzido em fibroblastos humanos dérmicos (GIAMPIERI et al., 2014a, GIAMPIERI et al., 2014b, ALVAREZ-SUAREZ et al., 2017).

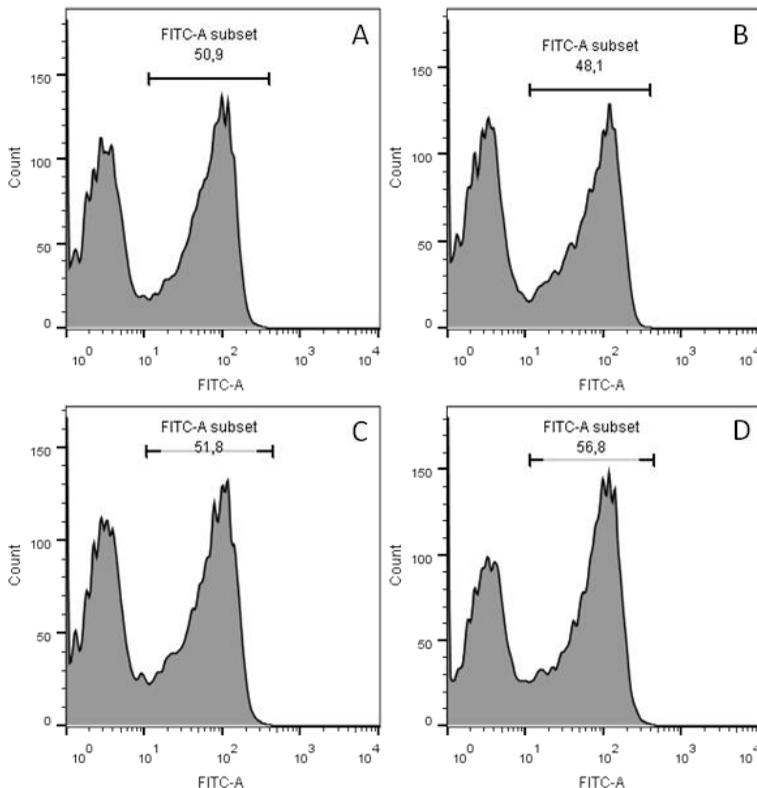
Estudo com fibroblastos da linhagem MRC-5 tratados com extrato de cascas da jabuticaba *Plinia trunciflora* e submetidos a estresse oxidativo por H₂O₂, mostraram valores aumentados da atividade enzimática do complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e síntese de ATP quando comparados ao controle estressado (CALLONI et al., 2015).

Figura 3 - Histograma representativo da porcentagem de células L929 marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor® picolyl azide após 24 h de exposição ao EJMO. (A) Controle, (B) 25 µg/mL de extrato, (C) 50 µg/mL de extrato e (D) 100 µg/mL de extrato.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 - Histograma representativo da porcentagem de células L929 marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor® picolyl azide após 48 h de exposição ao EJMO. (A) Controle, (B) 25 µg/mL de extrato, (C) 50 µg/mL de extrato e (D) 100µg/mL de extrato.



Fonte: Elaboração própria.

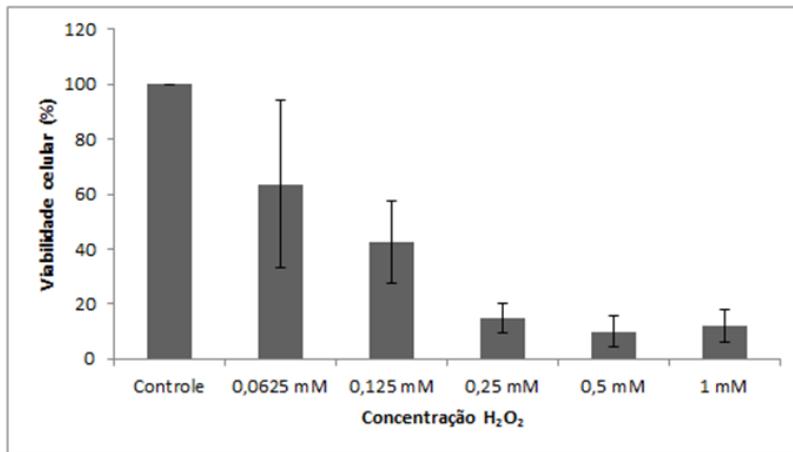
5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EJMO EM CÉLULAS DA LINHAGEM L929

A avaliação do potencial antioxidante dos extratos em cultura celular foi realizada através da indução de estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio. O H₂O₂ é um dos produtos encontrados durante a primeira etapa da cicatrização, resultante da detoxificação das espécies reativas de oxigênio (ERO). Embora seja um importante mensageiro

secundário, seus níveis precisam ser controlados para evitar danos a processos celulares, o que ocorre através de sistemas enzimáticos e moléculas antioxidantes (FINKEL, 1998, STEILING et al., 1999, GABBITA et al., 2000). A produção não controlada de ERO e a falha nas defesas antioxidantes prejudicam a proliferação e a migração de fibroblastos dérmicos (DUNNILL et al., 2017).

Previamente à indução do estresse oxidativo, uma curva de concentrações de H_2O_2 foi construída para auxiliar na definição da dose efetiva à diminuição de, no mínimo, 80% da viabilidade celular (Figura 5). O valor encontrado para tal foi 1 mM.

Figura 5 - Viabilidade de fibroblastos da linhagem L929 tratados com H_2O_2 durante 24 h.

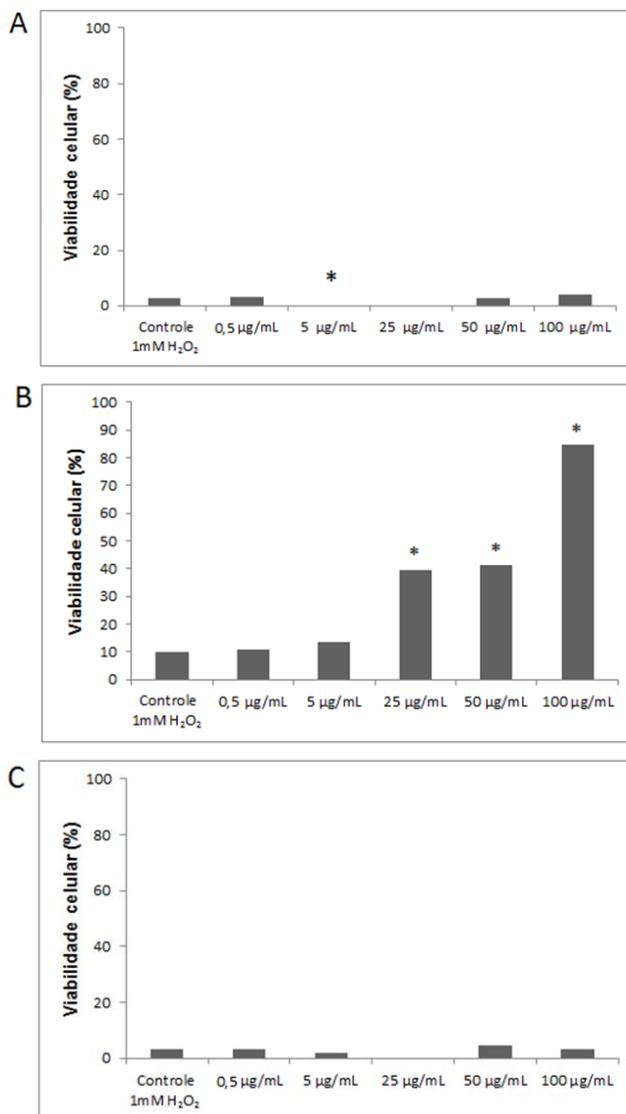


Dados expressos em média \pm DP (n = 18).

Fonte: Elaboração própria.

O EJMO foi testado quanto à atividade antioxidante de três diferentes formas: (a) incubação prévia com H_2O_2 por 3 h, seguido por tratamento com os extratos por 24 h; (b) tratamento com o extrato por 24 h, seguido por incubação com H_2O_2 por 3 h; (c) tratamento concomitante com extrato e H_2O_2 por 24 h. A viabilidade celular dos fibroblastos L929 foi avaliada ao final dos experimentos (Figura 6).

Figura 6 - Viabilidade de fibroblastos L929 tratados com o EJMO após exposição ao H_2O_2 (A), antes da exposição ao H_2O_2 , (B) e concomitante ao H_2O_2 (C). Dados expressos como mediana (n = 16).



* indica $p < 0,01$ em relação ao controle - 1mM H_2O_2 .

Fonte: Elaboração própria.

A indução de estresse oxidativo pelo H_2O_2 é um modelo bastante utilizado para avaliar o efeito citoprotetor de extratos com potencial antioxidante (BALEKAR et al., 2012, XU et al., 2013, PONNUSAMY et al., 2015).

O H_2O_2 é uma molécula pequena, não carregada que se difunde facilmente através da membrana celular (DUNNILL et al., 2017) e que em concentrações de 0,05 a 0,5 mM causa apoptose em fibroblastos (TAKAHASHI et al., 2002). O H_2O_2 se mostrou letal às células quando essas foram expostas a essa substância na ausência de incubação prévia com o EJMO e de forma concomitante ao extrato. A morte celular ocasionada nestes casos pode ser provocada pelo rápido transporte de H_2O_2 para o meio intracelular que age antes do efeito citoprotetor do EJMO.

Mesmo para as células submetidas a altas concentrações de H_2O_2 , o tratamento prévio com o EJMO foi capaz de gerar mudanças no status de oxirredução que resultaram em citoproteção.

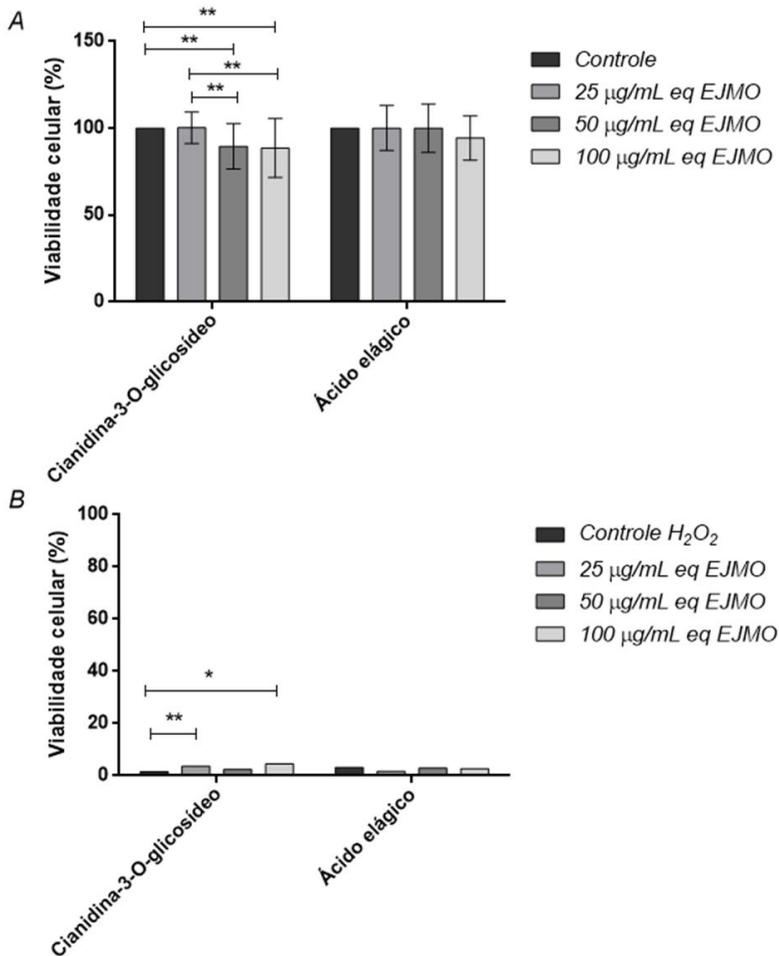
Compostos fitoquímicos podem induzir estresse ameno que provoca uma resposta adaptativa benéfica que prepara as células para uma pronta reação quando submetidas a estresses futuros. Esse processo recebe o nome de hormese e pode explicar os efeitos observados para o EJMO em células L929 (CALABRESE et al., 2007, MATTSON, 2008, LIMA et al., 2011).

CARVALHO et al. (2015) estudaram os compostos fenólicos diterpênicos ácido carnósico (CA) e carnosol (CS) e observaram que a pré-incubação com CS protegeu as células contra a morte induzida por *tert*-butil hidroperóxido. As defesas antioxidantes foram avaliadas e ambos os compostos aumentaram os níveis de glutathiona reduzida (GSH), heme-oxigenase-1 e a subunidade modulatória da glutamato-cisteína ligase através de mudanças no estado de oxirredução da célula. Os autores mostraram que essa mudança no estado redox não foi promovida pela indução de ERO. Além disso, CA e CS aumentaram a atividade de transcrição de Nrf2, fator responsável pela transcrição de genes relacionados a enzimas ligadas a resposta ao estresse oxidativo e citoproteção. Efeito citoprotetor similar foi observado por XU et al. (2013) ao tratar fibroblastos dérmicos de neonatos humanos com antocianinas provenientes da casca de soja preta.

5.6 VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 APÓS TRATAMENTO COM CIANIDINA-3-O-GLICOSÍDEO OU ÁCIDO ELÁGICO

Cianidina e ácido elágico foram identificados como os principais compostos presentes no EJMO. Para verificar se a atividade antioxidante/pró-oxidante daquele extrato sobre fibroblastos L929 mediante estresse oxidativo induzido por H_2O_2 acontece pela influência de um desses dois componentes, os padrões de cianidina-3-O-glicosídeo e ácido elágico foram testados de forma isolada. Antes da avaliação da atividade antioxidante, as células L929 foram submetidas a ensaio de viabilidade celular onde foram expostas por 24 h a esses dois compostos. As concentrações de cianidina-3-O-glicosídeo e ácido elágico utilizadas nos experimentos foram calculadas a partir da quantidade existente desses fitoquímicos no EJMO. As concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de extrato testadas nas células equivalem a 0,24475; 0,4895 e 0,979 $\mu\text{g/mL}$ de cianidina-3-O-glicosídeo, respectivamente, enquanto para o ácido elágico os valores correspondentes são 0,0412; 0,0823 e 0,1646 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 7 - Viabilidade de fibroblastos, linhagem L929, após 24 h de tratamento com cianidina-3-O-glicosídeo ou ácido elálgico (A). Viabilidade de fibroblastos, linhagem L929, após 24 h de tratamento com cianidina-3-O-glicosídeo ou ácido elálgico seguido por exposição ao H_2O_2 (B). Concentrações dadas em equivalentes de EJMO (eq EJMO), onde 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de extrato representam 0,24475; 0,4895 e 0,979 $\mu\text{g/mL}$ de cianidina-3-O-glicosídeo, respectivamente. Para o ácido elálgico, tais valores correspondem a 0,0412; 0,0823 e 0,1646 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Dados expressos como mediana (n = 24).



* indica $p < 0,01$;

** indica $p < 0,05$.

Fonte: Elaboração própria.

A viabilidade das células L929 manteve-se em torno de 100% para as concentrações de ácido elágico equivalentes a 25 e 50 µg/mL de extrato, ocorrendo um declínio não significativo na concentração de 100 µg/mL (Figura 7A). Já para a cianidina-3-O-glicosídeo as concentrações equivalentes a 50 e 100 µg/mL de extrato mostraram uma queda significativa na viabilidade celular comparativamente ao controle e à concentração equivalente a 25 µg/mL de extrato (Figura 7A).

O estudo do potencial antioxidante da cianidina-3-O-glicosídeo e ácido elágico sobre fibroblastos L929 mostrou que a exposição prévia por 24 h a esses compostos, seguida por incubação com H₂O₂, não foi capaz de proteger as células contra o estresse oxidativo como observado para o EJMO. Concentrações de cianidina-3-O-glicosídeo equivalentes a 25 e 100 µg/mL de extrato apresentaram viabilidade celular significativamente maior que o controle, porém não houve citoproteção, já que mais de 95% das células tratadas com essas concentrações sofreram morte celular (Figura 8B). Desta forma, é possível concluir que o efeito citoprotetor apresentado pelo EJMO não é causado por compostos isolados, mas sim pelo conjunto de fitoquímicos que o compõem. Efeito similar foi observado no estudo de DAVINELLI et al. (2013), onde o aumento da massa mitocondrial em HUVEC foi induzido apenas pelo resveratrol e não pelo equol, porém a combinação desses dois compostos produziu efeito melhor que resveratrol testado isoladamente. Ainda nesse estudo, os mesmos resultados foram obtidos quando a atividade enzimática de SIRT1 e a expressão de PGC1- α foram avaliadas. Estes fatores estão envolvidos na biogênese mitocondrial.

Estudos com polifenóis e atividade anticâncer mostraram que combinações desses compostos produzem melhores resultados que compostos isolados (DE KOK; VAN BREDA; MANSON, 2008, FANTINI et al., 2015). Tais combinações preservam os efeitos individuais de cada componente, mas também promovem efeito sinérgico entre os constituintes fazendo com que as doses efetivas requeridas sejam menores (diminuição da toxicidade) (BRGLEZ MOJZER et al., 2016).

5.7 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS DA LINHAGEM L929 TRATADAS COM EJMO APÓS INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO POR H₂O₂

Após constatar o efeito citoprotetor do EJMO frente à exposição ao H₂O₂, a atividade das enzimas catalase e glutatona peroxidase (GPx), obtidas a partir de homogenatos de fibroblastos L929, foi mensurada.

As células L929 foram tratadas somente com EJMO por 24 h, ou com o EJMO, seguido por exposição ao H₂O₂ durante 15, 30, 60, 120 e 180 minutos.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos quando as células L929 não foram expostas ao H₂O₂. As células tratadas com 100 µg/mL de extrato apresentaram atividade de catalase aumentada gradativamente a partir da exposição ao H₂O₂ por 15 min, atingindo o máximo da atividade enzimática aos 60 min de incubação, decaindo subsequentemente até alcançar valor igual ao seu respectivo controle, aos 180 minutos. Essa concentração, aos 30 min de exposição ao H₂O₂, aumentou a atividade de catalase de forma significativa em relação ao controle. Depois de 60 min de incubação com H₂O₂, o tratamento das células com 100 µg/mL de EJMO apresentou valores significativamente aumentados de atividade enzimática quando comparado ao controle e aos outros tratamentos em diferentes concentrações. Aos 120 min de incubação com H₂O₂, os tratamentos com 25 µg/mL e 100 µg/mL revelaram valores similares, elevando de forma significativa a atividade da catalase em relação ao controle e a concentração de 50 µg/mL (Figura 8A).

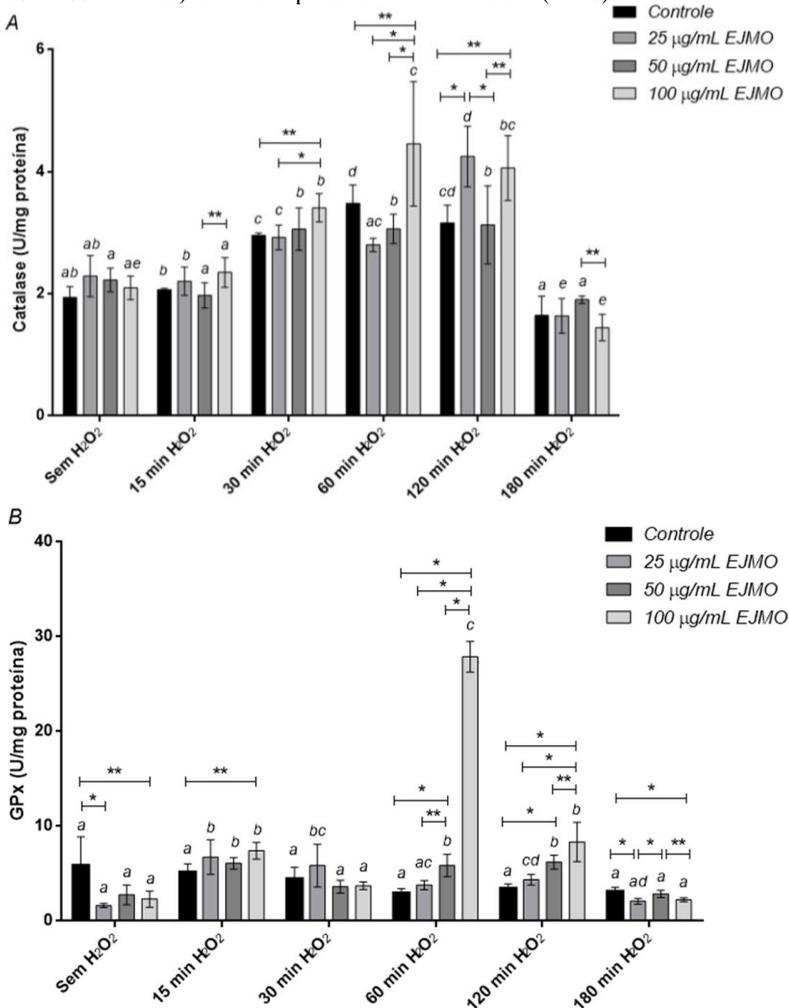
O tratamento de 100 µg/mL de EJMO, subsequente à exposição celular por 60 min ao H₂O₂ foi significativamente superior na atividade enzimática que os demais tratamentos na mesma concentração, quando incubados por 15, 30 e 180 min com H₂O₂ e também aquele não exposto ao agente oxidante. As maiores atividades enzimáticas dos controles e dos tratamentos com EJMO foram observadas nos tempos de incubação com H₂O₂ aos 30, 60 e 120 min, sendo estes controles e as concentrações de 50 e 100 µg/mL significativamente maiores que os outros controles e tratamentos na mesma concentração submetidos à incubação com H₂O₂ durante 15 e 180 minutos e também aqueles não expostos. Nenhuma das concentrações de EJMO testadas nos diferentes tempos de incubação com H₂O₂ e também aquelas não expostas apresentaram atividade enzimática significativamente diminuída em relação aos controles nas mesmas condições (Figura 8A).

O aumento da atividade de catalase após exposição a agentes estressores é uma resposta induzida por compostos fenólicos. Fibroblastos humanos expostos a proantocianidinas de extrato de casca de caqui por 24 h, seguido por desafio com H_2O_2 por 1 h, apresentaram aumento da atividade de catalase e glutatona redutase em relação aos controles como resposta ao estresse oxidativo (YOKOZAWA; SATOH; KIM, 2013). Extratos de acerola mostraram efeito similar sobre a atividade de catalase de fibroblastos quando expostos por 24 h ao extrato, seguido por 24 h de incubação com o indutor de estresse AAPH (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2017).

Quando fibroblastos de aorta de *Psammomys obesus* foram expostos ao H_2O_2 por 6 h, seguido por tratamento com quercetina ou resveratrol por 24 h, a atividade da enzima catalase apresentou-se diminuída em relação ao controle incubado apenas com H_2O_2 e aumentada quando comparada as células tratadas somente com quercetina ou resveratrol (BOUMAZA et al., 2016). Especula-se que a mudança na ordem de exposição ao agente estressor e ao extrato tenha mudado a dinâmica de indução enzimática.

A catalase é uma das enzimas da primeira linha de defesa antioxidante e está envolvida na adaptação, citoproteção e inibição de apoptose em fibroblastos após repetitivas exposições a baixas concentrações de H_2O_2 (SEN et al., 2003).

Figura 8 - Atividade de catalase (A) e glutationa peroxidase (GPx) (B) de células L929 tratadas com EJMO por 24 h nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ seguido ou não por exposição ao H_2O_2 por diferentes tempos (15, 30, 60, 120 e 180 minutos). Dados expressos em média \pm DP (n = 6).



* indica $p < 0,01$, para controle e diferentes concentrações de EJMO sob o mesmo tempo de exposição ao H_2O_2 , ou não expostos.

** indica $p < 0,05$, para controle e diferentes concentrações de EJMO sob o mesmo tempo de exposição ao H_2O_2 , ou não expostos.

Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos iguais expostos ao H_2O_2 por diferentes tempos, ou não expostos.

Fonte: Elaboração própria.

Com relação à atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx), observou-se que as células L929 não expostas ao H₂O₂ apresentaram atividade enzimática aumentada do controle, diferindo este significativamente das concentrações de 25 e 100 µg/mL de EJMO. Este comportamento mudou a partir dos 15 min de exposição das células ao H₂O₂, quando os controles apresentaram valores de atividade enzimática igual ou menor àqueles de células tratadas com diferentes concentrações de EJMO, exceto aos 180 min de exposição ao H₂O₂, quando os tratamentos com 25 e 100 µg/mL de EJMO apresentaram valores significativamente menores que seu respectivo controle. Células tratadas com 50 µg/mL de EJMO apresentaram atividade de GPx significativamente aumentada em relação ao controle e as demais concentrações testadas de EJMO, após 60 min de exposição ao H₂O₂. Essa mesma concentração também aumentou de forma significativa a atividade enzimática para o tempo de exposição de 120 min ao H₂O₂. Já a concentração de 100 µg/mL de EJMO provocou aumento da atividade de GPx em relação ao controle depois de 15 min de estresse oxidativo induzido. Após 60 e 120 min de incubação com H₂O₂, o tratamento com 100 µg/mL de EJMO determinou aumento significativo da atividade da enzima, comparativamente aos demais tratamentos (Figura 8B).

A concentração de 100 µg/mL de EJMO também foi a única que aumentou a atividade de GPx significativamente, em comparação às mesmas concentrações submetidas a diferentes tempos de incubação com H₂O₂ e também aquela não exposta. Assim como observado para a enzima catalase, o tratamento com 100 µg/mL de EJMO promoveu a maior atividade de GPx dentre todos os tratamentos expostos ou não aos diferentes tempos de H₂O₂ (Figura 8A e B). Para ambas as enzimas, esse pico de atividade enzimática ocorreu após 60 min de exposição ao H₂O₂. Todavia, ressalta-se que a atividade de GPx nas células tratadas com 100 µg/mL de EJMO foi seis vezes maior que a observada para catalase.

A atividade da enzima GPx, assim como visto para a catalase, também é modulada por compostos fenólicos em células submetidas ao estresse oxidativo. Estudos com fibroblastos dérmicos de camundongos tratados com o agente estressor nitrato e quercetina simultaneamente por 4 e 6 dias, revelaram aumento na atividade de GPx, enquanto a adição de quercetina ou nitrato de forma isolada não causou tal efeito, comparativamente ao controle (KURZEJA et al., 2014). BARONI et al. (2012) também observou aumento da atividade de GPx em leveduras expostas a diferentes tipos de vinhos na presença de H₂O₂.

A curva de tempo-resposta construída com H₂O₂ nos tempos de 15, 30, 60, 120 e 180 min de exposição, seguida pela quantificação das

atividades das enzimas catalase e glutathiona peroxidase foi inspirada na curva de Michaelis-Menten a fim de descobrir a velocidade de consumo do substrato a partir da atividade enzimática e, dessa forma, determinar o tempo ótimo de ação dessas enzimas.

Os dados obtidos através da atividade enzimática corroboram com aqueles obtidos no experimento onde fibroblastos L929 foram expostos ao H_2O_2 por 180 min e mantiveram altas taxas de viabilidade. O melhor resultado de citoproteção foi obtido com 100 $\mu\text{g/mL}$ de EJMO, a mesma concentração que proporcionou as maiores atividades de catalase e GPx, principalmente aos 30, 60 e 120 min e 15, 60 e 120 min para catalase e GPx, respectivamente, após exposição ao H_2O_2 .

Os resultados das medidas de atividades enzimáticas evidenciam que a citoproteção ocasionada pelo extrato em células L929, após 180 min de exposição ao H_2O_2 , é resultado das atividades aumentadas de catalase e GPx, iniciada ao 30 e 15 minutos, respectivamente, após adição do agente estressor.

O conceito de hormese parece apropriado para explicar o comportamento das enzimas antioxidantes em células tratadas apenas com extrato, ou com extrato e H_2O_2 . Os grupos onde fibroblastos L929 foram submetidos apenas ao EJMO apresentaram atividade de catalase e GPx igual ou menor àquela observada no controle. Quando expostas ao H_2O_2 , as células apresentaram aumento da atividade enzimática para alguns tratamentos. Isso reforça a ideia de que os extratos de cascas de jabuticaba podem provocar um estresse brando nas células que, no primeiro momento, não causa aumento na atividade enzimática, porém ativa as defesas antioxidantes das células. Em um segundo momento, quando desafiadas pelo H_2O_2 , as células prontamente se protegem contra o estresse oxidativo induzindo o aumento de suas defesas enzimáticas.

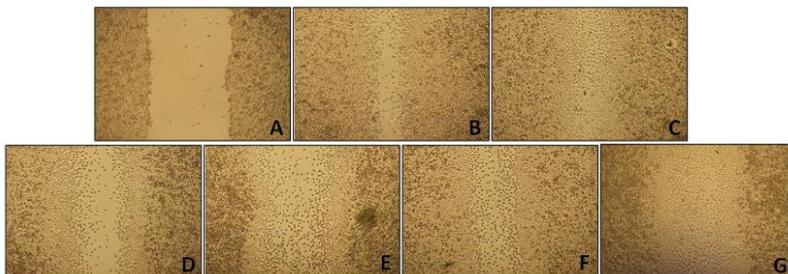
5.8 MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929 APÓS TRATAMENTO COM O EJMO

A capacidade de induzir a migração celular do EJMO foi investigada em fibroblastos L929 após rompimento da monocamada celular, seguido por 12 h de tratamento.

Este experimento é amplamente utilizado como método de análise da atividade cicatrizante já que a lesão causada nas células *in vitro* mimetiza aquela de lesões cutâneas, desencadeando o aumento dos teores de fatores de crescimento e citocinas no local da lesão, os quais

induzem à migração e proliferação celular nas bordas da ferida (LIANG et al., 2007).

Figura 9 - Micrografias ópticas de fibroblastos L929 (40x) após o experimento de migração celular. Tempo 0, imediatamente após a ranhura (A), Controle (B), 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (C), 5 $\mu\text{g/mL}$ (D), 25 $\mu\text{g/mL}$ (E), 50 $\mu\text{g/mL}$ (F) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (G), após 12 h de tratamento com o extrato de cascas de jabuticaba em micro-ondas (n=8).



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 - Largura da ranhura (μm) e taxa de migração celular (%) de fibroblastos L929, nos tempos 0 e 12 h de tratamento com o EJMO. Dados expressos em média \pm DP (n=8). Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos.

	Largura da ranhura (μm)	Taxa de migração (%)
Tempo 0	859,97 \pm 113,9	0
Controle	246,73 \pm 62,84	71,31 \pm 7,3
0,5 $\mu\text{g/mL}$	157,56 \pm 53,58	81,68 \pm 6,23
5 $\mu\text{g/mL}$	261,91 \pm 99,32	69,54 \pm 11,55
25 $\mu\text{g/mL}$	263,36 \pm 73,4	71,42 \pm 8,53
50 $\mu\text{g/mL}$	245,79 \pm 138,65	69,37 \pm 16,12
100 $\mu\text{g/mL}$	183,31 \pm 91,15	78,57 \pm 10,6

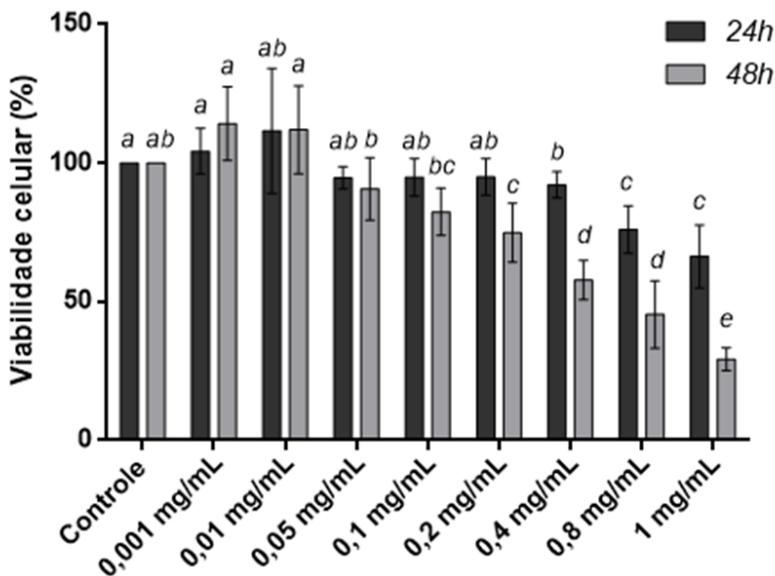
Embora as concentrações de 0,5 e 100 $\mu\text{g/mL}$ tenham aumentado a taxa de migração celular (Tabela 3; Figura 9), a diferença não foi significativa comparativamente ao controle. Dessa forma, o EJMO não

promoveu migração celular, porém induziu a proliferação de fibroblastos L929 como constatado através do experimento com o EdU (Tabela 2). Estes dois eventos são muito importantes durante o processo cicatricial, principalmente durante a segunda fase, i.e., a etapa de formação tecidual (SCHÄFER; WERNER, 2008).

5.9 VIABILIDADE CELULAR DE QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat APÓS TRATAMENTO COM O EJMO

Queratinócitos da linhagem HaCat foram expostos ao EJMO para determinação da viabilidade celular após 24 e 48 h de tratamento (Figura 10).

Figura 10 - Viabilidade de queratinócitos, linhagem HaCat, após 24 e 48 h de tratamento com o EJMO. Dados expressos em média \pm DP (n = 18).



Letras distintas nas barras cinzas escuras indicam diferenças significativas entre os tratamentos incubados por 24 h, enquanto as letras diferentes nas barras cinzas claras revelam discrepâncias significativas entre os tratamentos incubados por 48 h.

Fonte: Elaboração própria.

Neste ensaio nenhuma das concentrações testadas de EJMO induziu aumento significativo da viabilidade de queratinócitos da linhagem HaCat, durante 24 e 48 h de incubação.

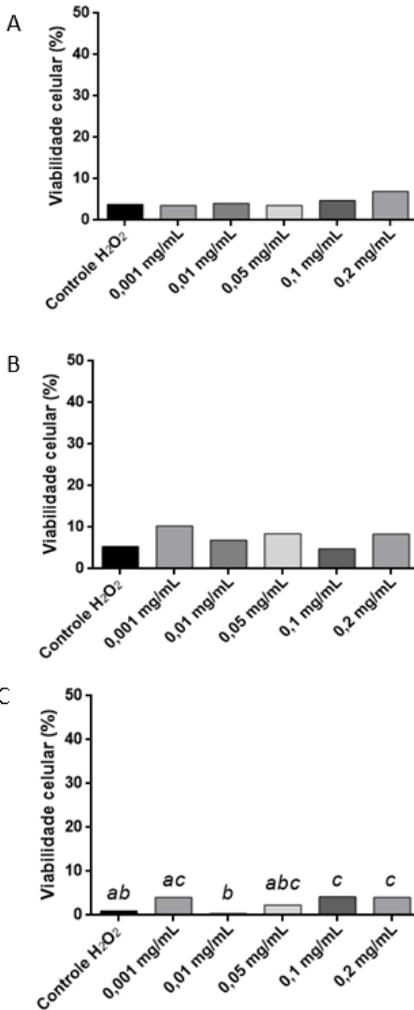
Concentrações iguais ou maiores que 0,4 mg/mL de EJMO diminuíram significativamente a viabilidade celular, comparativamente ao controle, após 24 horas de incubação. Por outro lado, conteúdos iguais ou maiores a 0,2 mg/mL do extrato reduziram significativamente a viabilidade de queratinócitos quando expostos por 48h em relação ao controle. O tratamento com 1 mg/mL de EJMO – 48h determinou 70% de redução da viabilidade dos queratinócitos, diferindo de forma significativa do controle e das demais concentrações de extrato testadas neste mesmo tempo.

De interesse, ressalta-se que o EJMO mostrou-se menos tóxico aos queratinócitos quando comparado aos fibroblastos L929. Fibroblastos quando expostas ao EJMO na concentração de 0,2 mg/mL por 24 e 48 h, apresentaram viabilidade celular menor que 20%.

5.10 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EJMO EM QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat

Variadas concentrações do EJMO foram testadas quanto à atividade antioxidante em queratinócitos da linhagem HaCat. A metodologia adotada foi a mesma em relação aos fibroblastos da linhagem L929, onde as células foram submetidas a três tratamentos: (a) incubação prévia com H₂O₂ por 3 h seguido por exposição ao extrato por 24 h; (b) incubação com o extrato por 24 h seguido por exposição ao H₂O₂ por 3 h; (c) incubação com extrato e H₂O₂ por 24 h de forma concomitante. A viabilidade celular foi avaliada ao final dos experimentos.

Figura 11 - Viabilidade de queratinócitos da linhagem HaCat tratados com EJMO após exposição ao H₂O₂ (A), antes da exposição ao H₂O₂ (B) e concomitante ao H₂O₂ (C). Dados expressos como mediana (n = 12).



Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os grupos testados.

Fonte: Elaboração própria.

Embora a exposição concomitante do extrato ao H₂O₂ tenha apresentado diferença significativa entre algumas concentrações e o controle, os três diferentes tempos de exposição ao EJMO não

alcançaram valores de sobrevivência celular maior que 20%. Nesse experimento, valores iguais ou menores que 20% de viabilidade celular foram declarados como morte celular (Figura 11).

Os resultados obtidos com fibroblastos L929 neste experimento de avaliação da atividade citoprotetora diferiram em relação ao observado para os queratinócitos, visto que a citoproteção não ocorreu quando as células foram previamente expostas ao extrato e em seguida ao agente estressor. Desta forma, a hipótese de que os extratos estariam ocasionando uma mudança no estado de oxirredução da célula que a prepara para estresses futuros, i.e. hormese, não é válida quando se trata de queratinócitos da linhagem HaCat.

Resultados de citoproteção com queratinócitos submetidos ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 foram encontrados por XU et al. (2013) com extratos de cascas de semente de soja e LIU et al. (2016) que testou curcuminóides de forma isolada. Esse último autor relata que a indução de estresse oxidativo mediada por H_2O_2 mimetiza a apoptose induzida por radiação ultravioleta (UV), via aumento dos conteúdos de ERO em queratinócitos. Devido ao fato dessas células comporem a camada mais externa da pele e, por isso, estarem diretamente expostas a radiação UV, grande parte dos estudos envolvendo estresse oxidativo e queratinócitos utiliza como agente estressor os raios ultravioleta.

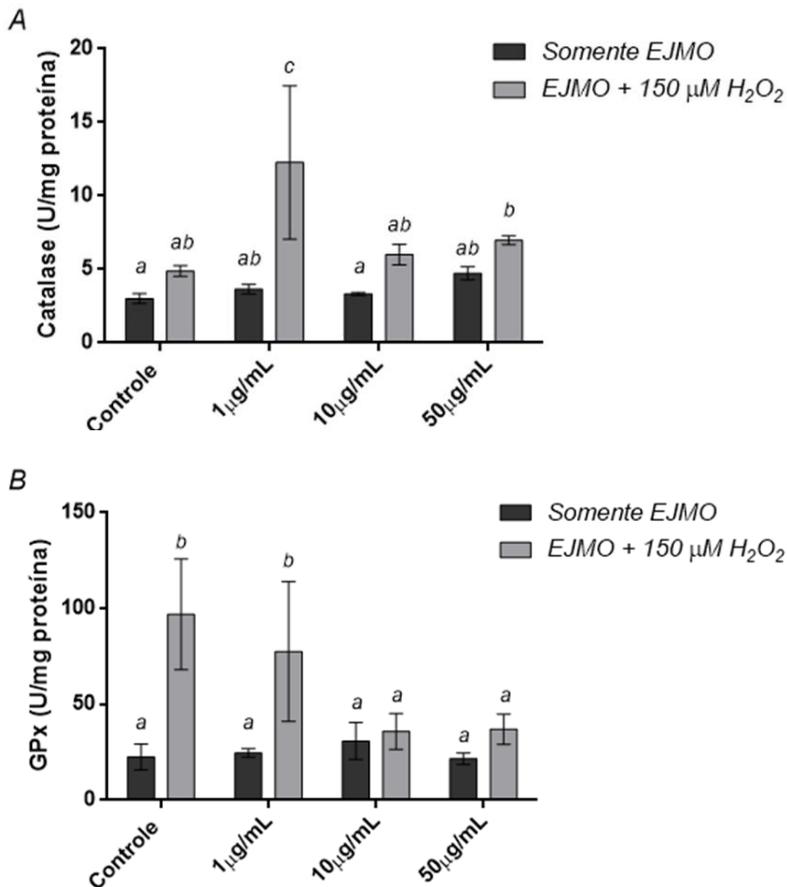
5.11 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM QUERATINÓCITOS DA LINHAGEM HaCat TRATADOS COM O EJMO APÓS INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO POR H_2O_2

O estudo da atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutatona peroxidase (GPx) também foi realizado com os queratinócitos. Para este experimento as células foram submetidas a dois tipos de tratamentos: (a) exposição ao EJMO por 24h, ou (b) incubação com o extrato por 2,5 h seguido por exposição ao H_2O_2 por 2 h.

A atividade da catalase mensurada em homogenatos de queratinócitos apresentou valores aumentados quando exposta ao EJMO, seguido por H_2O_2 . Nessas condições, as concentrações de 1 e 50 $\mu\text{g/mL}$ promoveram aumento significativo da atividade da catalase. A exposição das células a 1 $\mu\text{g/mL}$ EJMO alterou a atividade da catalase de modo significativo em relação aos demais tratamentos, expostos ou não ao H_2O_2 . Enquanto o tratamento das células com 50 $\mu\text{g/mL}$ de EJMO mostrou-se distinto na atividade catalítica em relação ao controle

e à concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, sem exposição ao H_2O_2 . A atividade da catalase do grupo controle e dos tratamentos de células expostos somente ao EJMO por 24 h foi estatisticamente igual (Figura 12A).

Figura 12 - Atividade de catalase (A) e glutatona peroxidase (GPx) (B) de queratinócitos da linhagem HaCat tratados com EJMO por 24 h, nas concentrações de 1, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$, ou tratados com extrato nessas mesmas concentrações por 2,5 h, seguido por 2 h de exposição ao H_2O_2 . Dados expressos em média \pm DP (n = 6).



Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos expostos ou não ao H_2O_2 .

Fonte: Elaboração própria.

A glutathiona peroxidase também apresentou valores de atividade inferiores nas células não estressadas com H_2O_2 , não havendo diferença estatística entre este grupo. Já as células expostas ao H_2O_2 mostraram aumento significativo na atividade de GPx quando tratadas com controle e extrato na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. Embora estes dois tratamentos não tenham diferido entre si, ambos foram significativamente diferentes de todos os outros testados expostos ou não ao H_2O_2 (Figura 12B).

Assim como o observado no comportamento das enzimas antioxidantes mensuradas em fibroblastos L929, uma mesma concentração de EJMO propiciou os maiores valores de atividade enzimática tanto para catalase como para GPx em queratinócitos expostos ao H_2O_2 (concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ para fibroblastos e 1 $\mu\text{g/mL}$ para queratinócitos). Os extratos nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ para fibroblastos e 1 $\mu\text{g/mL}$ para queratinócitos apresentaram maiores valores de atividade para GPx, sendo os valores 6 e 6,5 vezes maiores que o observado para catalase em fibroblastos e queratinócitos, respectivamente. Entretanto, diferentemente do observado em fibroblastos L929, a atividade de GPx se mostrou igual ou significativamente menor àquela observada para o controle em queratinócitos expostos ao H_2O_2 . LIU et al. (2016) estudaram a atividade de GPx em queratinócitos após tratamento com curcuminóides, seguido por indução de estresse oxidativo por H_2O_2 , e encontraram valores aumentados desta enzima em relação ao controle. Os autores atribuíram o efeito citoprotetor dos curcuminóides em queratinócitos à redução dos teores intracelulares de ERO proporcionado pela GPx.

Queratinócitos induzidos ao estresse oxidativo através de radiação UVB e tratados com formulações de *Silybum marianum* apresentaram atividades de catalase, GPx e superóxido dismutase aumentadas (FEHÉR et al., 2016).

5.12 CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO DO EJMO

Uma nanoemulsão foi desenvolvida a partir do EJMO a fim de avaliar se essas estruturas podem potencializar os efeitos biológicos do extrato, quando aplicadas topicamente a lesões cutâneas no dorso de camundongos.

Para a caracterização da nanoemulsão, propriedades como diâmetro médio da partícula, índice de polidispersão e potencial Zeta foram avaliadas (Tabela 4). Além disso, também foram mensurados os

conteúdos de polifenóis totais e flavonoides da nanoemulsão controle (sem adição de EJMO), nanoemulsão contendo EJMO e do extrato utilizado à confecção da nanoemulsão (Tabela 5).

Tabela 4 - Diâmetro médio (nm), índice de polidispersão e potencial Zeta das nanoemulsões controle e EJMO. Dados expressos em média \pm DP (n = 3).

	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)
Nanoemulsão controle	196,10 \pm 3,24	0,137 \pm 0,043	-15,20 \pm 0,55
Nanoemulsão EJMO	177,30 \pm 0,40	0,150 \pm 0,024	-43,30 \pm 1,30

Tabela 5 - Conteúdos de polifenóis e flavonoides totais (mg/mL) da nanoemulsão controle, nanoemulsão EJMO e somente EJMO. Dados expressos em média \pm DP (n = 3).

	Polifenóis totais (mg/mL)	Flavonoides totais (mg/mL)
Nanoemulsão controle	0,1 \pm 0,0	0,00013 \pm 0,00015
Nanoemulsão EJMO	1,65 \pm 0,12	0,26 \pm 0,03
EJMO	19,05 \pm 1,08	1,33 \pm 0,07

O potencial Zeta é um parâmetro indicador de estabilidade que leva em consideração a carga superficial das nanoemulsões. Muitas cargas presentes na superfície da nanoemulsão podem gerar repulsão entre as gotas de óleo, por isso valores acima de 30 mV (valor absoluto) apontam boa estabilidade da suspensão coloidal, prevenindo agregação e desestabilização (AMIJI, 2006, JADHAV; KATE; PAYGHAN, 2015).

O índice de polidispersão é uma variável indicativa da homogeneidade dos tamanhos de nanoemulsão obtidos. Para essa medida, valores menores que 0,2 indicam monodispersão, ou seja, a predominância de apenas um intervalo de tamanhos. A nanoemulsão EJMO mostrou-se dentro de todos esses parâmetros, i.e., potencial Zeta e índice de polidispersão.

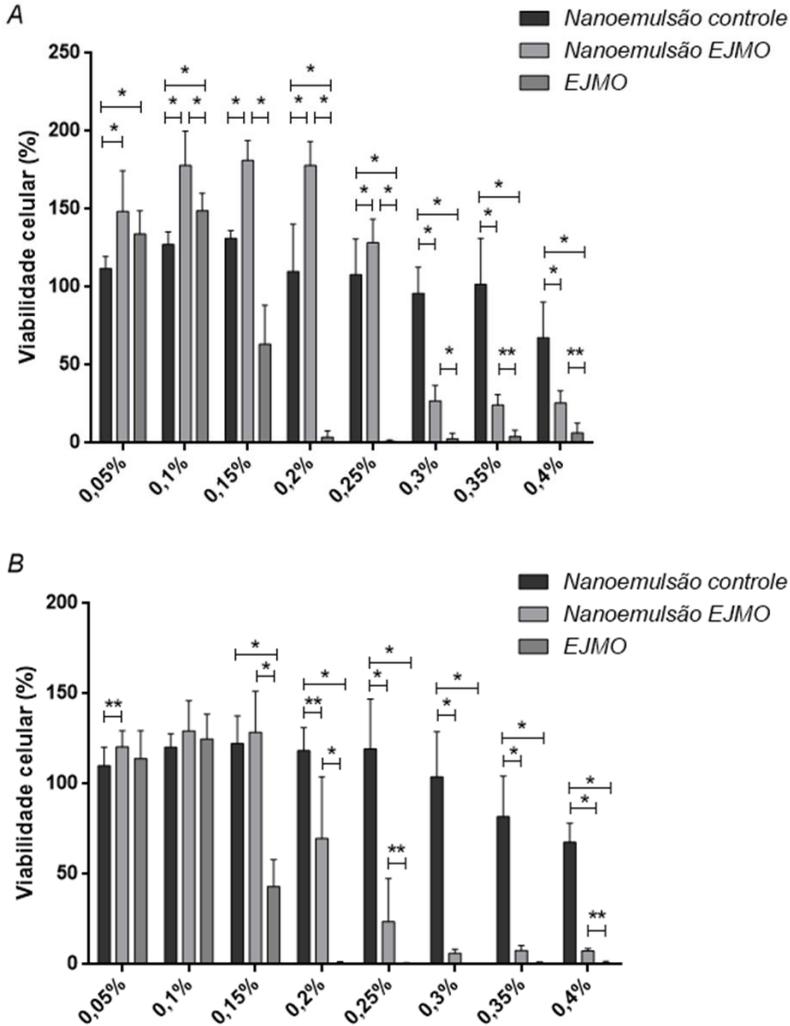
A nanoemulsão do extrato de jabuticaba obtido com o auxílio de extrator de ultra-pressão (3h) apresentou valores de compostos fenólicos totais igual a 0,293 mg/mL e de flavonoides igual a 0,0213 mg/mL (MAZZARINO et al., 2017). O extrato utilizado à formulação da nanoemulsão supracitada mostrou valores de polifenóis e flavonoides iguais a 2,181 mg/mL e 0,515 mg/mL, respectivamente. Os resultados das análises químicas para a nanoemulsão incorporada com EJMO

evidenciaram que essa foi bastante superior à nanoemulsão produzida com extrato de cascas de jabuticaba obtido por ultra-pressão.

5.13 CITOTOXICIDADE DA NANOEMULSÃO FEITA COM O EJMO EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929

Quando as nanoemulsão controle, nanoemulsão EJMO e EJMO foram incubados por 24 h com fibroblastos L929, todas as concentrações testadas de nanoemulsão EJMO diferiram significativamente dos demais tratamentos, exceto na concentração de 0,05%, onde a nanoemulsão EJMO mostrou-se semelhante ao EJMO. Ambas as nanoemulsões aumentaram a viabilidade celular acima de 100% até a concentração de 0,25%. Na concentração de 0,3%, a nanoemulsão EJMO reduziu drasticamente a viabilidade de fibroblastos L929, enquanto a nanoemulsão controle manteve a viabilidade celular em torno de 100% até a concentração de 0,35%. A nanoemulsão EJMO aumentou significativamente a viabilidade celular quando comparada aos outros dois tratamentos nas concentrações iguais a 0,1%, 0,15%, 0,2% e 0,25%. Por fim, o EJMO também aumentou a viabilidade celular acima de 100% nas concentrações de 0,05% e 0,1%, diferindo de forma significativa da nanoemulsão controle. Na concentração igual a 0,15% a viabilidade dos fibroblastos decaiu para 60% (Figura 13A).

Figura 13 - Viabilidade de fibroblastos, linhagem L929, após 24 h (A) e 48 h (B) de tratamento com nanoemulsão controle, nanoemulsão EJMO e EJMO. Dados expressos em média \pm DP (n = 9).



* indica $p < 0,01$, para concentrações iguais de nanoemulsão controle, nanoemulsão EJMO e EJMO.

** indica $p < 0,05$, para concentrações iguais de nanoemulsão controle, nanoemulsão EJMO e EJMO.

Fonte: Elaboração própria.

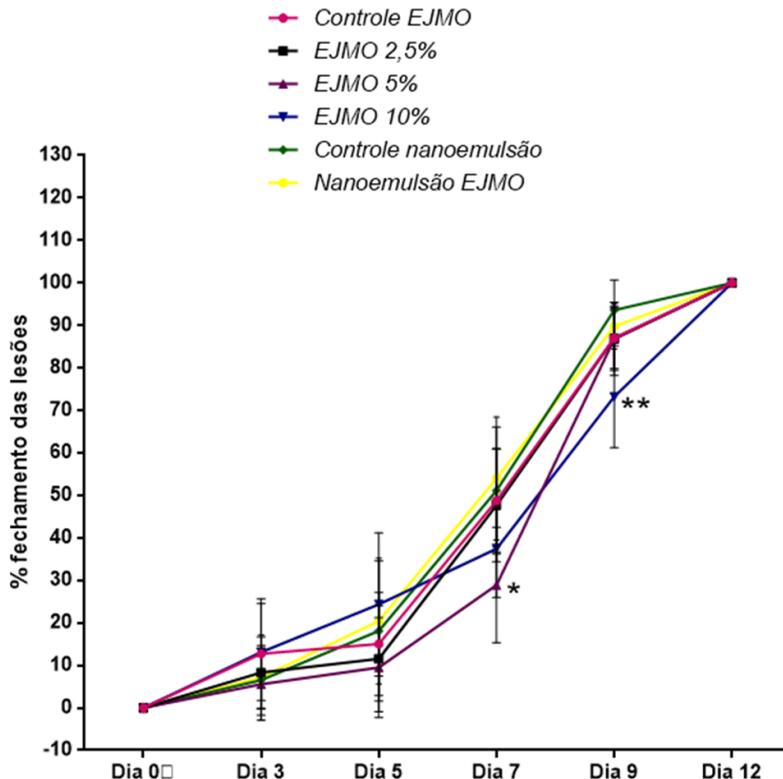
Quando as células foram expostas por 48 h à nanoemulsão EJMO nas concentrações de 0,05% e 0,15% um aumento significativo na viabilidade celular foi observado, a primeira somente em relação à nanoemulsão controle e a segunda em relação aos outros tratamentos testados. Quando os fibroblastos foram expostos por 48 h à nanoemulsão EJMO, a concentração necessária para diminuir 30% da viabilidade celular foi menor que aquela observada durante incubação por 24 h. Já para o EJMO, o decréscimo na viabilidade dos fibroblastos, tanto para 24 como para 48 h de exposição, continuou sendo na concentração igual a 0,15% (Figura 13A e B).

A nanoemulsão controle diferiu significativamente daquela contendo o EJMO e também desse extrato a partir da concentração 0,2%, com valores de viabilidade celular aumentados (Figura 13B). Desta forma é possível constatar que a nanoemulsão EJMO é menos citotóxica que o EJMO. Estes resultados são considerados relevantes, na medida que a utilização de fibroblastos L929 para a avaliação de citotoxicidade de nanoemulsões é um modelo bastante difundido na literatura (BENNET; KIM, 2013, HONG et al., 2017).

5.14 POTENCIAL CICATRIZANTE DE EXTRATOS E NANOEMULSÃO DE CASCAS DE JABUTICABA

Os efeitos dos extratos e nanoemulsão de cascas de jabuticaba foram avaliados em modelo de ferida cutânea contrátil em dorso de camundongo. Foram feitas lesões de 6 mm de diâmetro e a taxa de fechamento foi mensurada durante os dias 0, 3, 5, 7, 9 e 12 após a lesão.

Figura 14 - Taxa de oclusão de lesões no dorso de camundongos tratadas com controle, controle nanoemulsão, nanoemulsão EJMO e EJMO 2,5%; 5% e 10%, durante 12 dias após o ferimento. Dados expressos em média \pm DP (n = 16).



* indica diferença estatística entre EJMO 5% e nanoemulsões controle e EJMO ($p < 0,05$) no sétimo dia após lesão;

** indica diferença estatística entre EJMO 10% e nanoemulsões controle ($p < 0,01$) e EJMO ($p < 0,05$) no nono dia após lesão.

Fonte: Elaboração própria.

Nenhum dos tratamentos testados aumentou a taxa de oclusão das lesões ao longo do tempo estudado. Os tratamentos EJMO 5% e 10% apresentaram feridas significativamente maiores em relação às aquelas tratadas com as nanoemulsões controle e EJMO, nos dias 7 e 9 após a indução da lesão, respectivamente (Figura 14). Extratos de *Artemisia campestris*, *Rhodiola imbricata*, *Leea macrophylla* e o composto isolado

curcumina, aplicados de forma tópica em roedores, promoveram a cicatrização das úlceras de forma mais rápida que os controles não tratados através de melhora na contração das feridas e diminuição do tempo de re-epitelização (PANCHATCHARAM et al., 2006; GUPTA et al., 2007; GHLISSI et al., 2016; JOSHI et al., 2016).

5.15 ANÁLISE HISTOLÓGICAS DAS LESÕES DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM EXTRATOS E NANOEMULSÃO DE CASCAS DE JABUTICABA

As lâminas histológicas das lesões no dorso de camundongos tiveram como finalidade o acompanhamento da regeneração tecidual a nível celular. Por isso as biópsias foram coletadas em diferentes dias após a lesão para que todas as fases do processo cicatricial pudessem ser avaliadas através da observação da presença de infiltrado inflamatório, neovascularização e fibroblastos migratórios.

O leito da ferida compreendeu o local delimitado pelas bordas da lesão.

No 2º e 5º dia após a lesão, a ferida possui baixa densidade celular a não ser pela presença de infiltrado inflamatório que chega até o local lesionado a partir das bordas da ferida e se dispõe pela hipoderme.

A neovascularização começou a ficar evidente nas imagens a partir do 5º, 7º e 9º dia após a lesão para os grupos EJMO 10%, nanoemulsão extrato e nanoemulsão controle, respectivamente. No restante dos tratamentos, tais estruturas não foram identificadas.

Todos os tratamentos apresentaram presença de fibroblastos desde o início da lesão, aumentando a densidade dessas células geralmente a partir do 7º dia após ferimento.

É possível observar que nos dias 9 e 14 após a lesão a derme apresenta-se mais espessada sobre a hipoderme.

No 14º dia as feridas encontram-se totalmente re-epitelizada.

Figura 15 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após dois dias do ferimento. Controle extrato 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida; H: hipoderme. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).

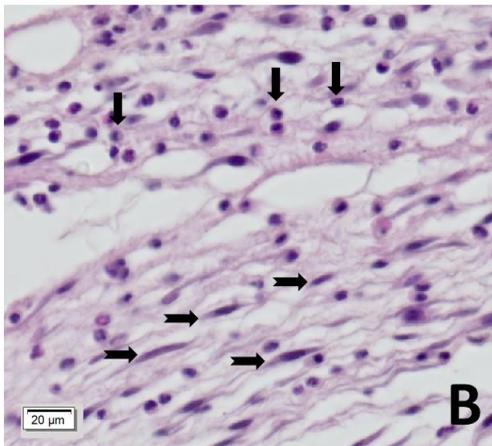
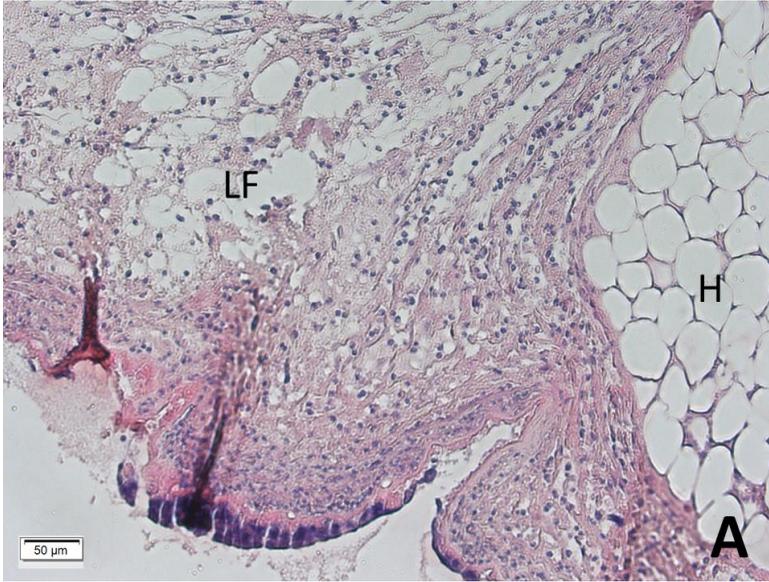


Figura 16 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após cinco dias do ferimento. Controle extrato 200x (A) e 400x (B) de aumento. Bo: borda da ferida; H: hipoderme. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).

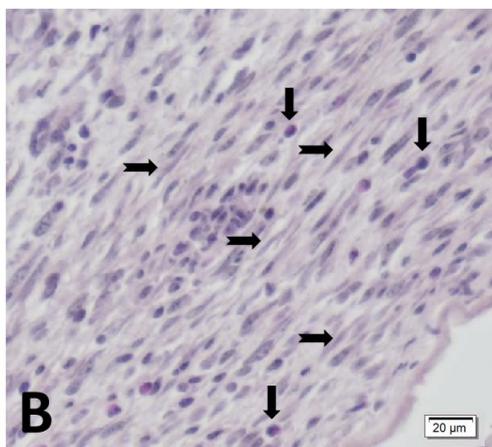
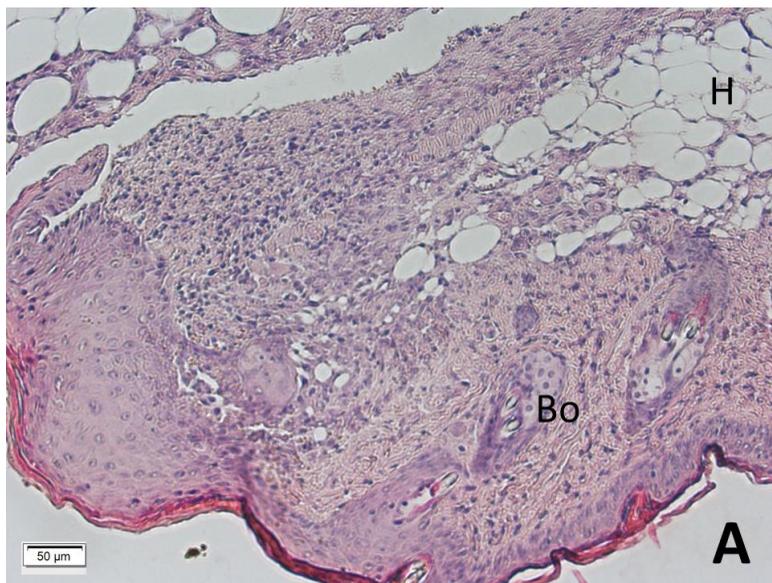


Figura 17 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após sete dias do ferimento. Controle extrato 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).

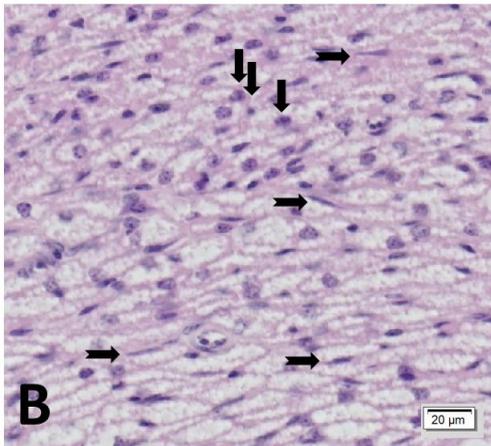
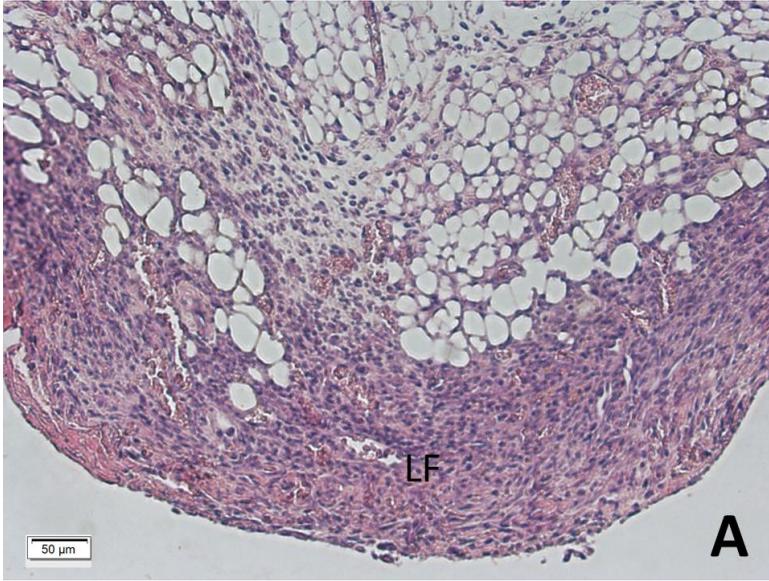
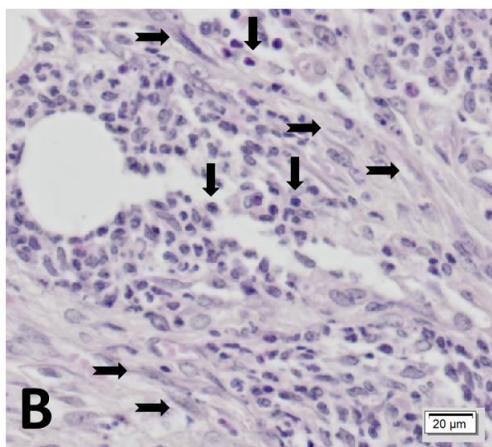
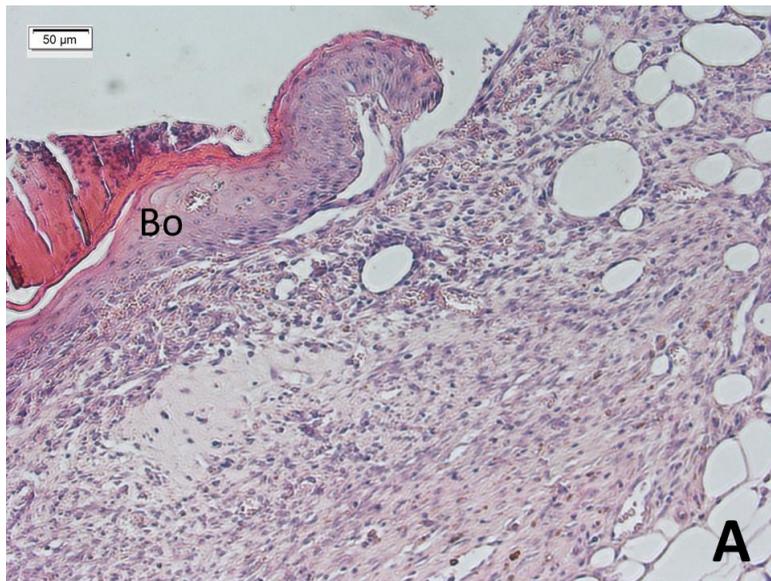


Figura 18 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após nove dias do ferimento. Controle extrato 200x (A) e 400x (B) de aumento. Bo: borda da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 19 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após catorze dias do ferimento. Controle extrato 200x (A) e 400x (B) de aumento. De: derme; Ep: epiderme. Setas pretas horizontais apontam fibroblastos; setas vermelhas mostram neovascularização (n = 3).

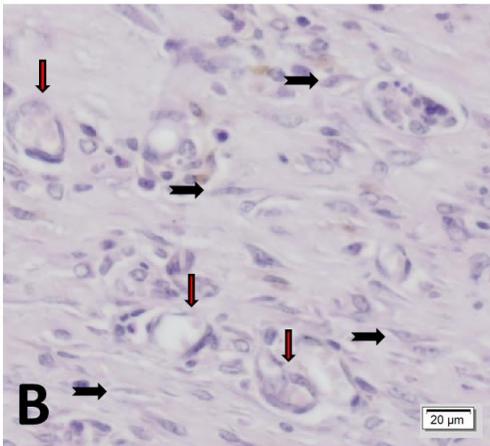
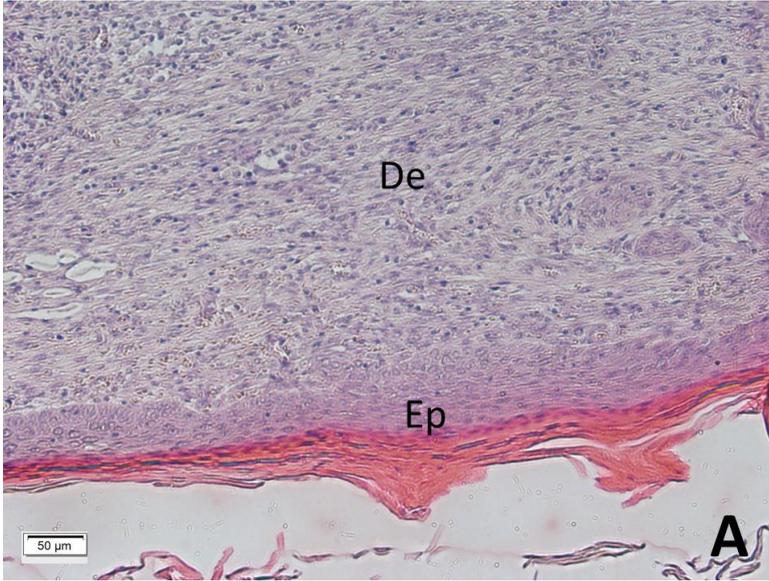
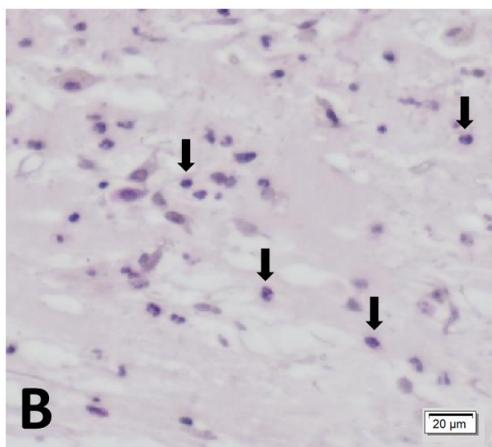
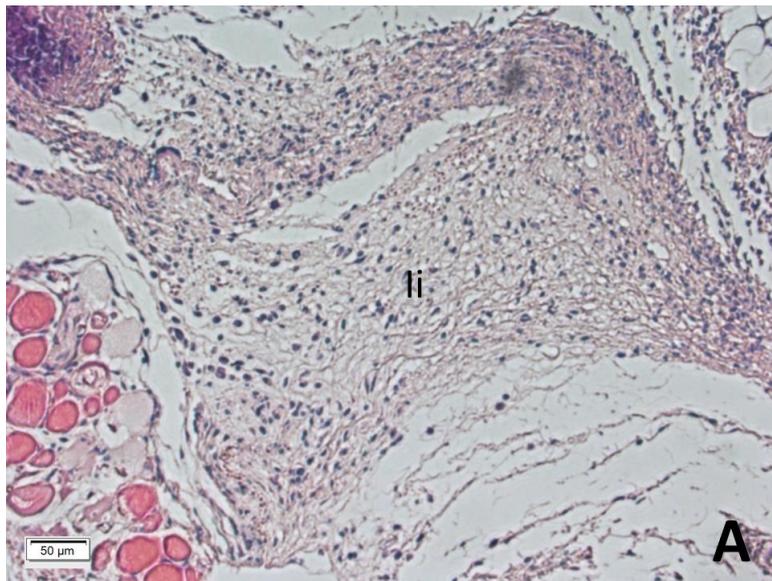


Figura 20 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após dois dias do ferimento. Extrato EJMO 2,5% 200x (A) e 400x (B) de aumento. li: infiltrado inflamatório. Setas pretas indicam a presença de células inflamatórias (n = 3).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 21 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após cinco dias do ferimento. Extrato EJMO 2,5% 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida; Bo: borda da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).

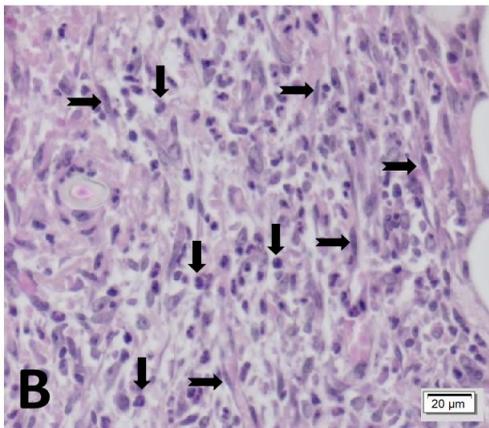
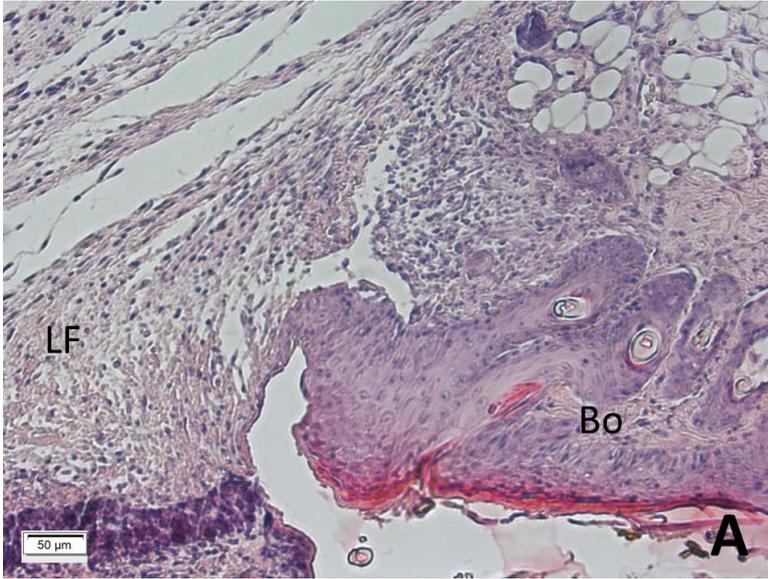
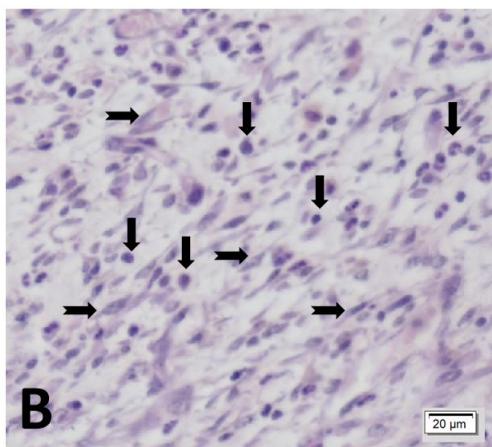
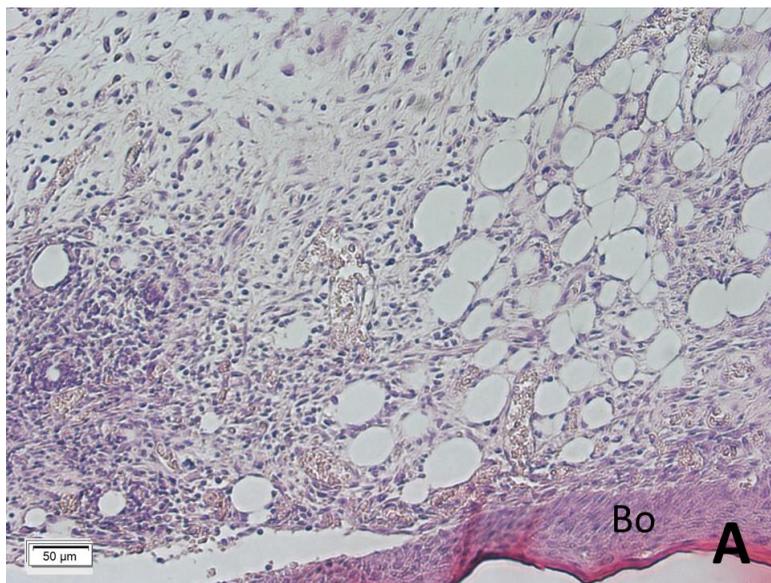


Figura 22 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após sete dias do ferimento. Extrato EJMO 2,5% 200x (A) e 400x (B) de aumento. Bo: borda da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 23 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após nove dias do ferimento. Extrato EJMO 2,5% 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).

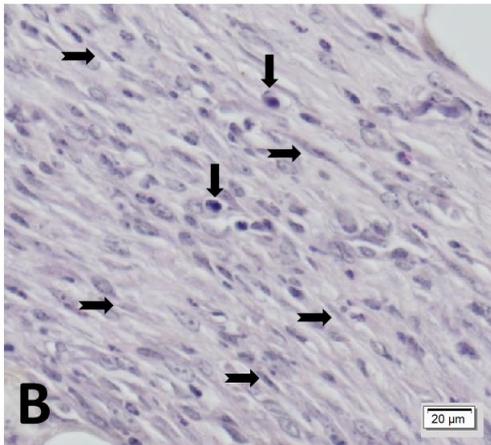
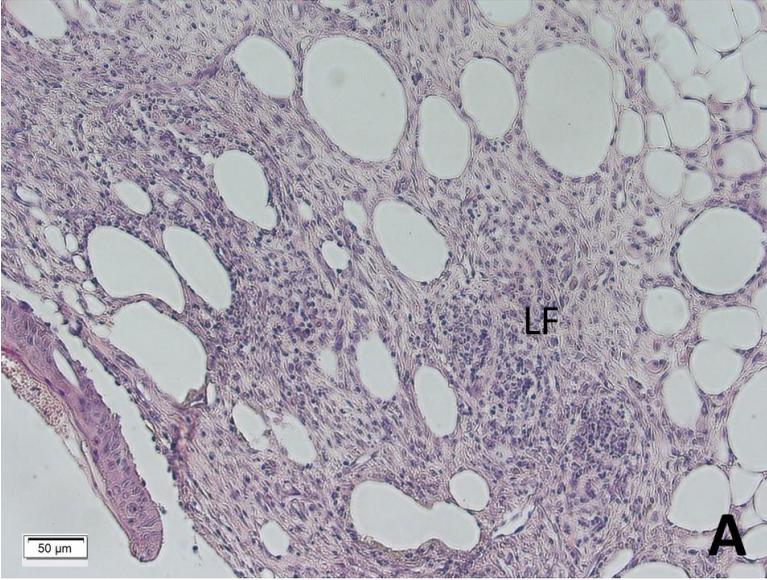


Figura 24 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após catorze dias do ferimento. Extrato EJMO 2,5% 200x (A) e 400x (B) de aumento. De: derme; Ep: epiderme. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).

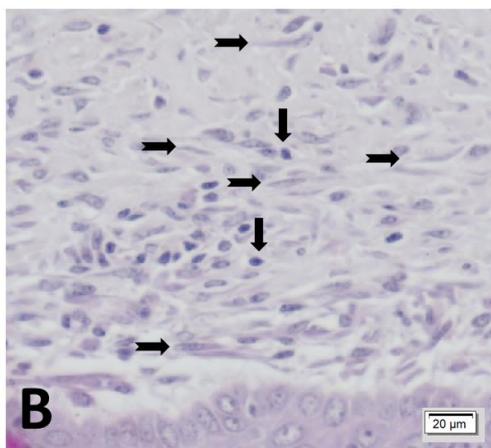
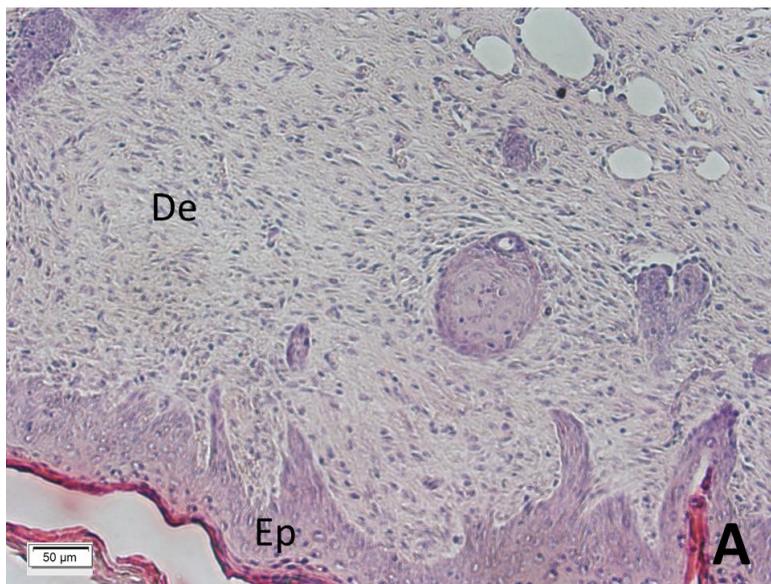
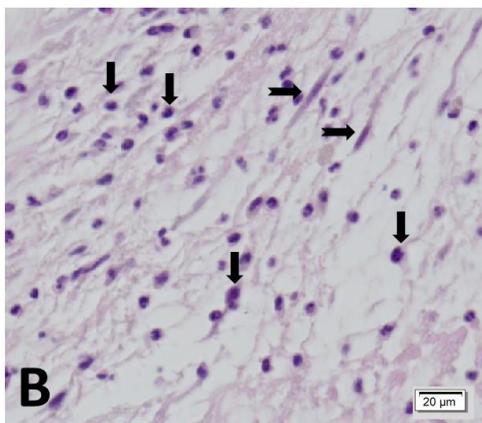
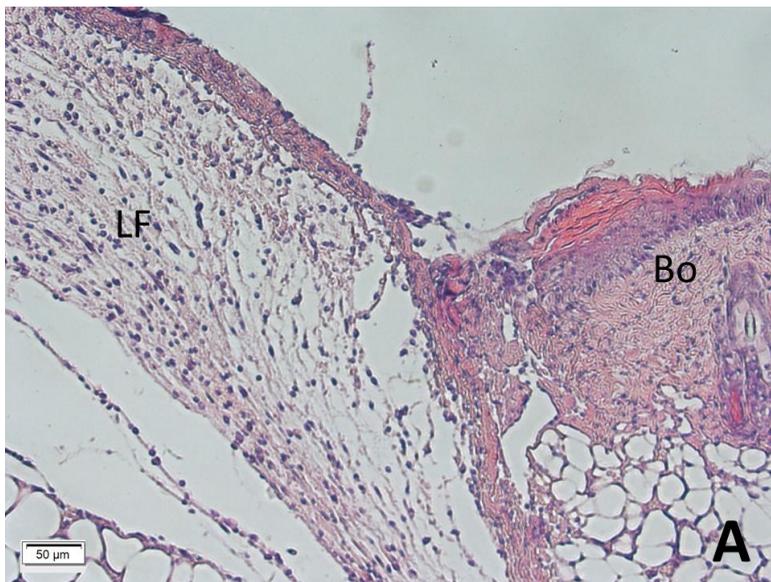


Figura 25 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após dois dias do ferimento. Extrato EJMO 5% 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida; Bo: borda da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 26 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após cinco dias do ferimento. Extrato EJMO 5% 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida; Bo: borda da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).

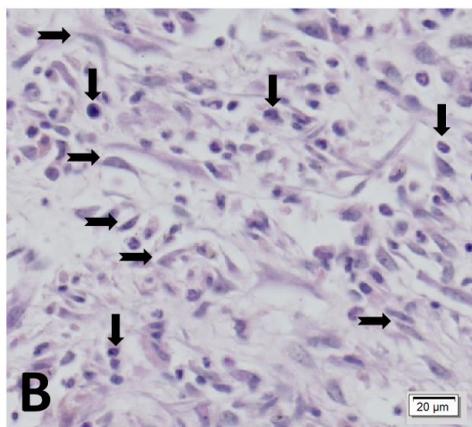
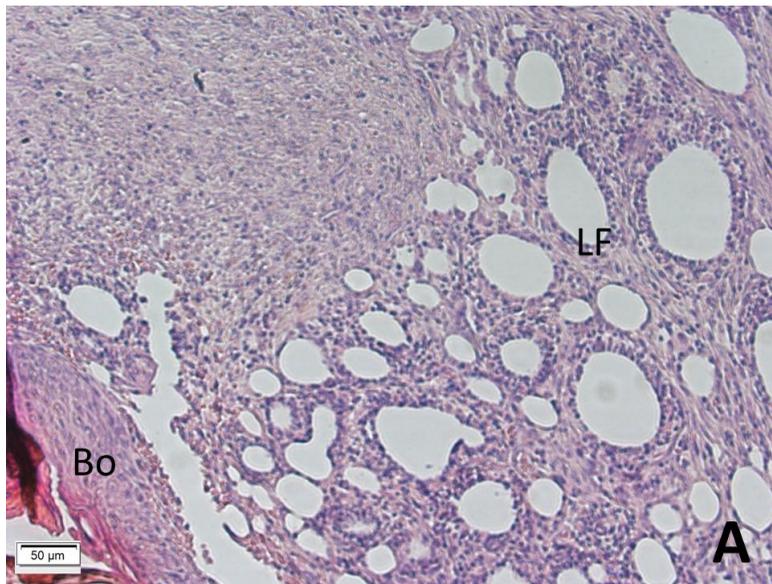


Figura 27 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após sete dias do ferimento. Extrato EJMO 5% 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).

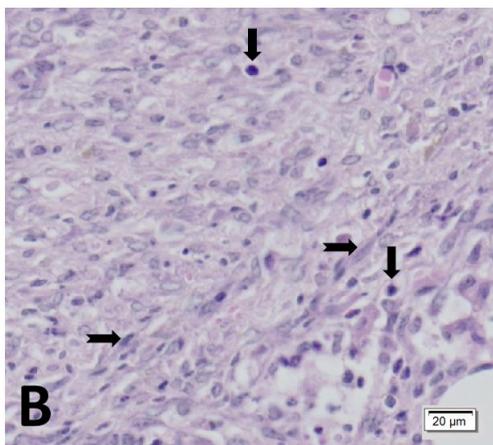
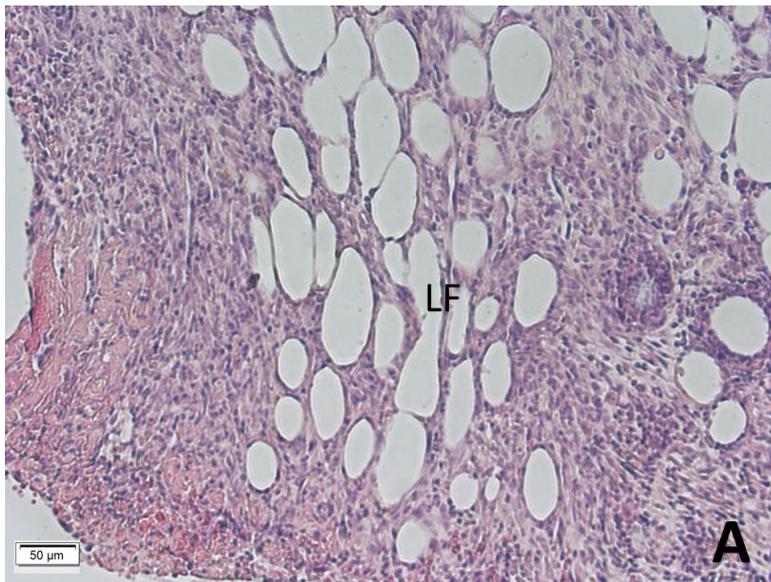
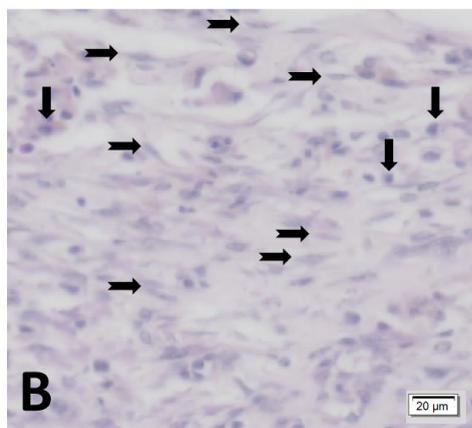
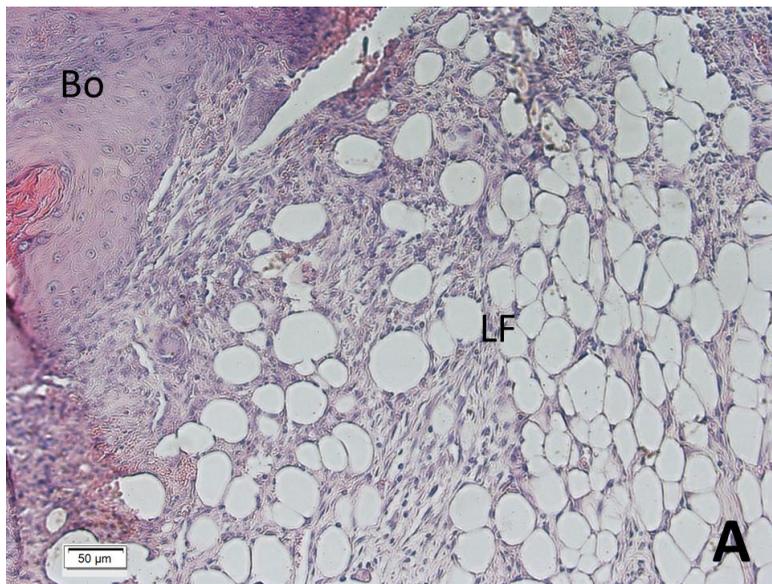


Figura 28 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após nove dias do ferimento. Extrato EJMO 5% 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida; Bo: borda da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 29 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após catorze dias do ferimento. Extrato EJMO 5% 200x (A) e 400x (B) de aumento. De: derme; Ep: epiderme. Setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).

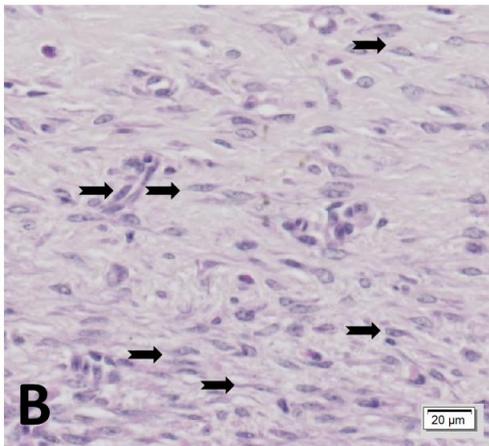
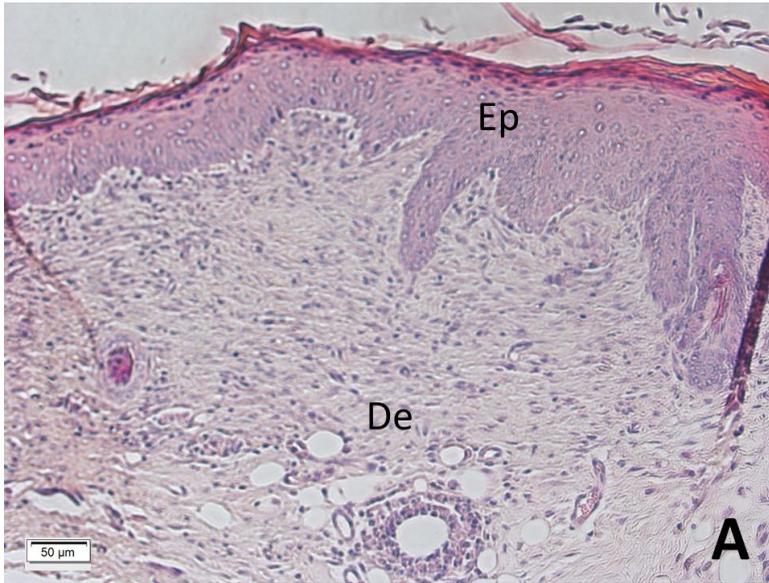
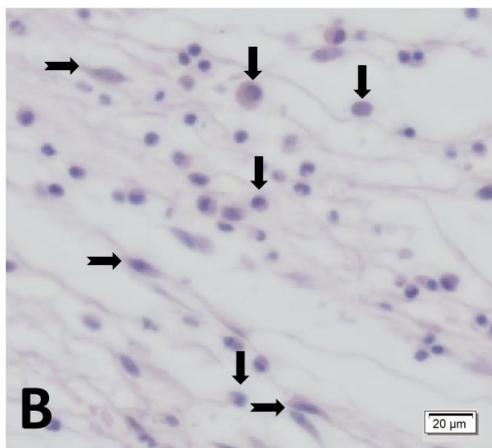
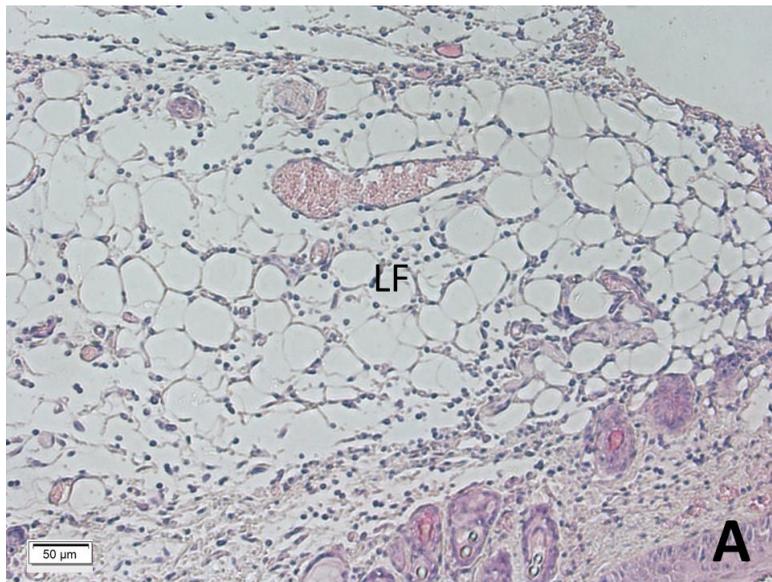


Figura 30 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após dois dias do ferimento. Extrato EJMO 10% 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 31 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após cinco dias do ferimento. Extrato EJMO 10% 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida; Bo: borda da ferida. Setas pretas verticais indicam células inflamatórias; setas pretas horizontais apontam fibroblastos; setas vermelhas mostram neovascularização (n = 3).

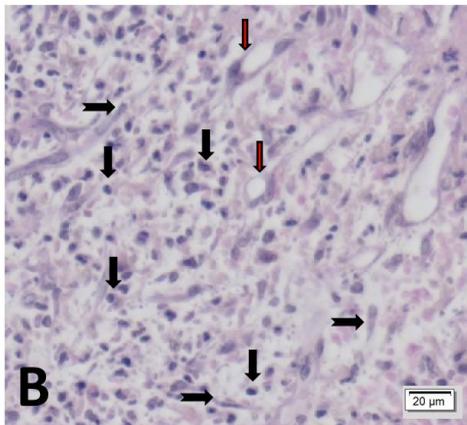
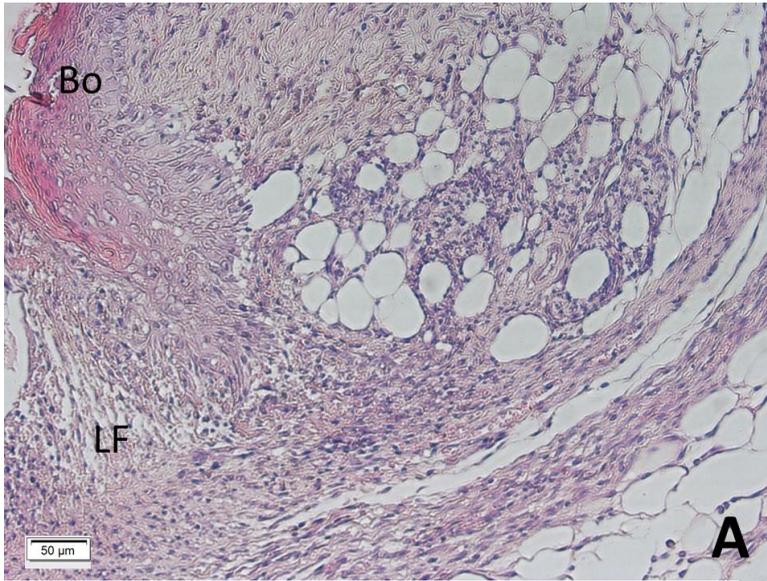
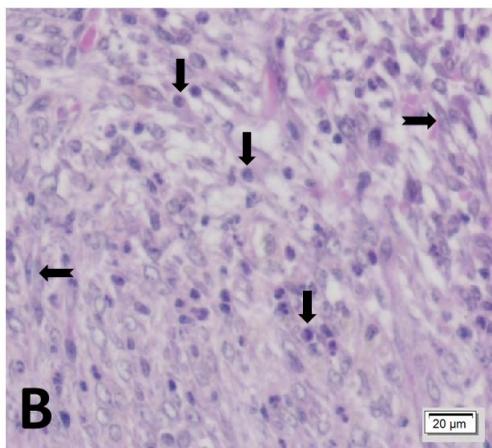
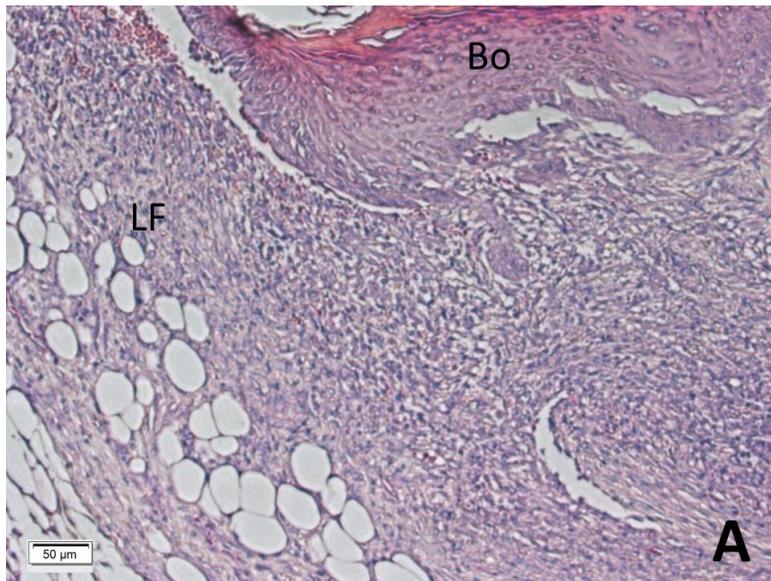


Figura 32 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após sete dias do ferimento. Extrato EJMO 10% 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida; Bo: borda da ferida. Setas pretas verticais indicam células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 33 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após nove dias do ferimento. Extrato EJMO 10% 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida. Setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).

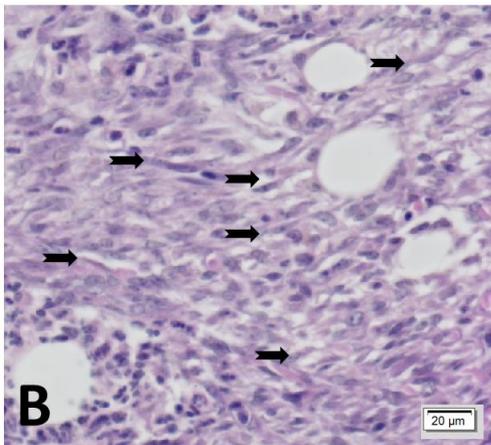
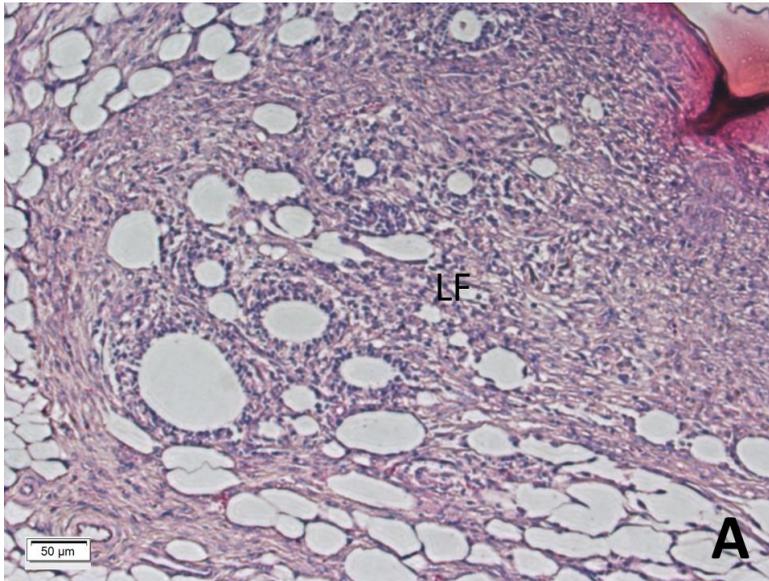
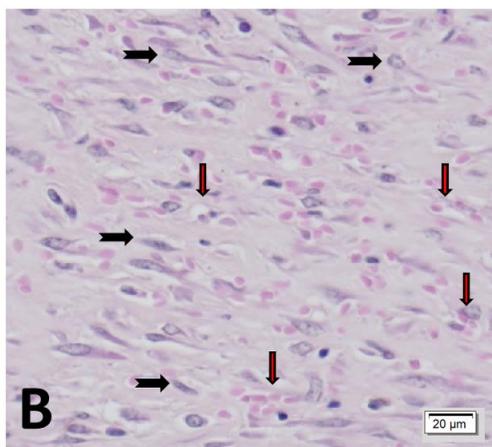
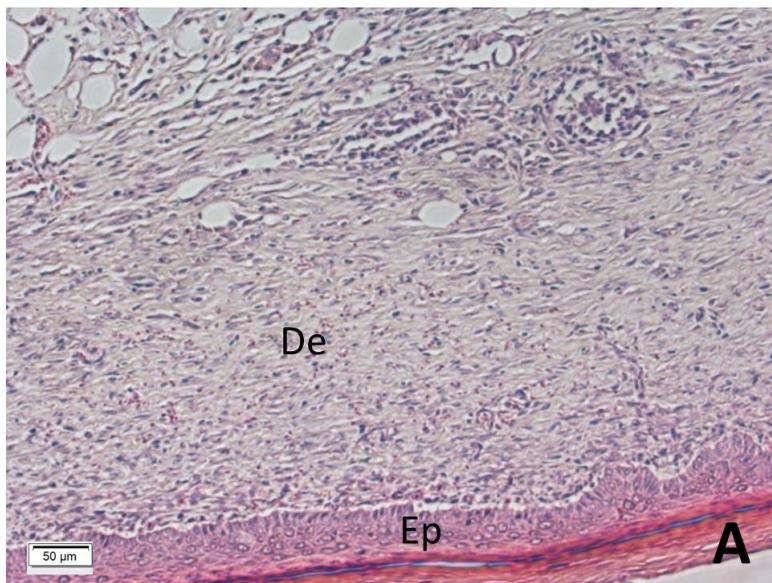


Figura 34 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após catorze dias do ferimento. Extrato EJMO 10% 200x (A) e 400x (B) de aumento. De: derme; Ep: epiderme. Setas pretas horizontais apontam fibroblastos enquanto setas vermelhas mostram neovascularização (n = 3).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 35 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após dois dias do ferimento. Controle nanoemulsão 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida; Bo: borda da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias (n = 3).

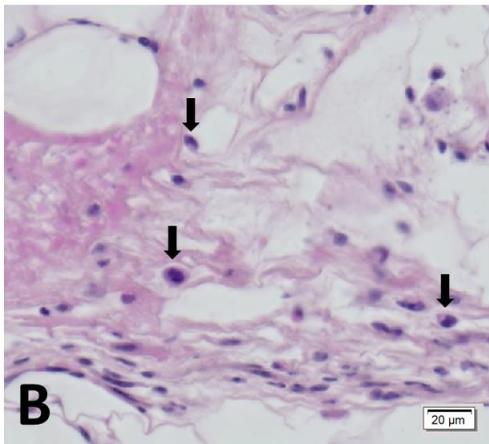
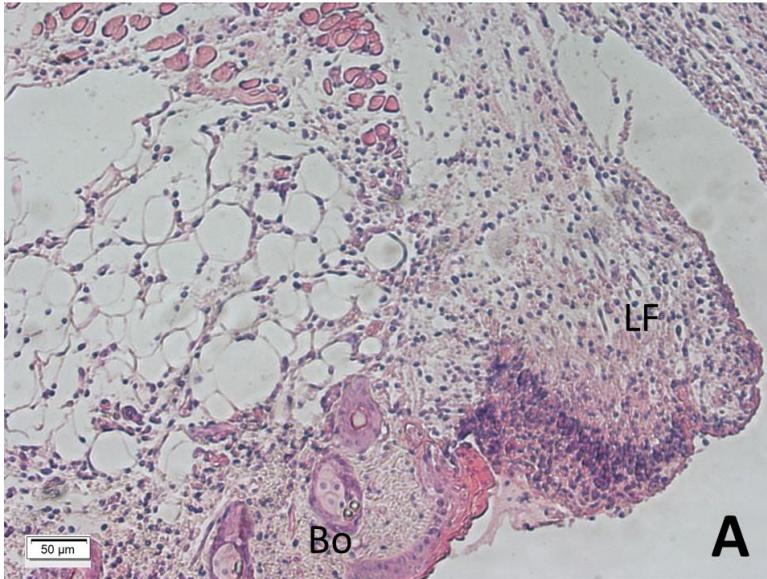
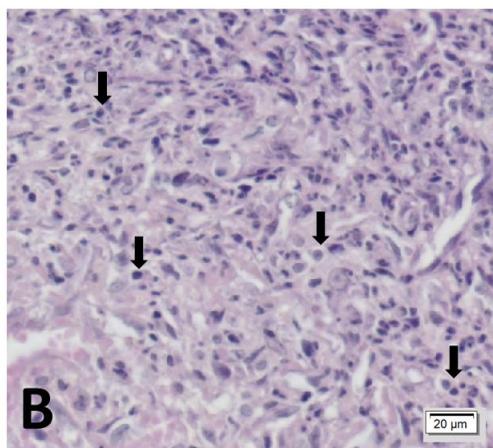
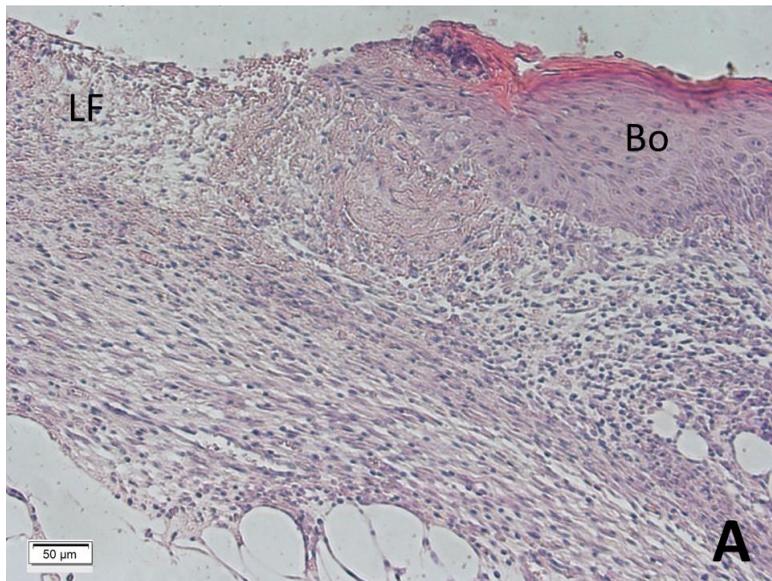


Figura 36 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após cinco dias do ferimento. Controle nanoemulsão 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida; Bo: borda da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias (n = 3).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 37 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após sete dias do ferimento. Controle nanoemulsão 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).

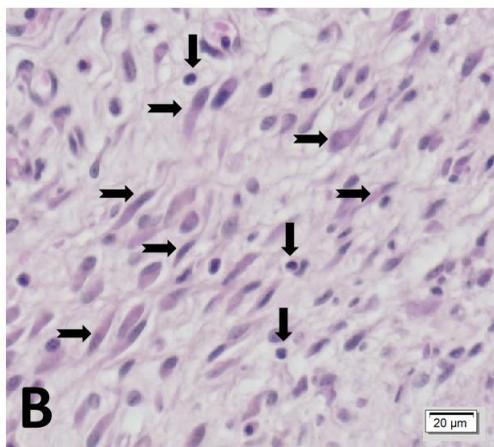
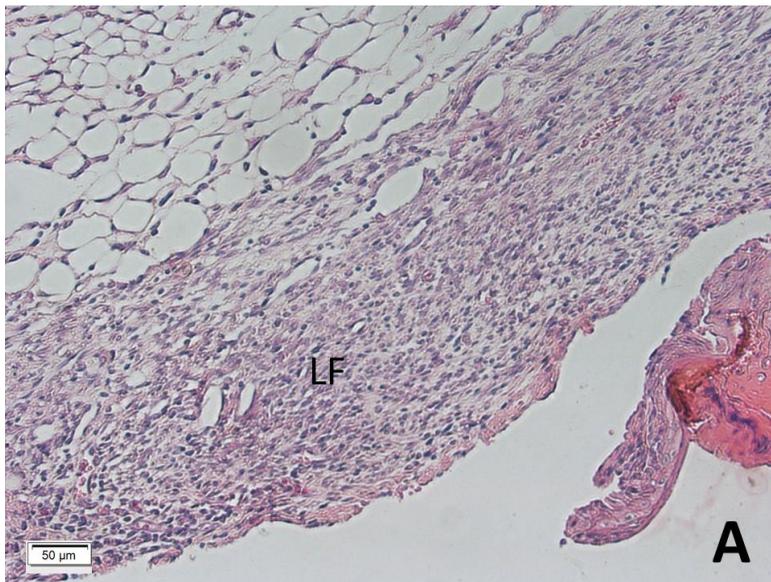


Figura 38 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após nove dias do ferimento. Controle nanoemulsão 200x (A) e 400x (B) de aumento. De: derme; Ep: epiderme. Setas pretas horizontais apontam fibroblastos enquanto setas vermelhas mostram neovascularização (n = 3).

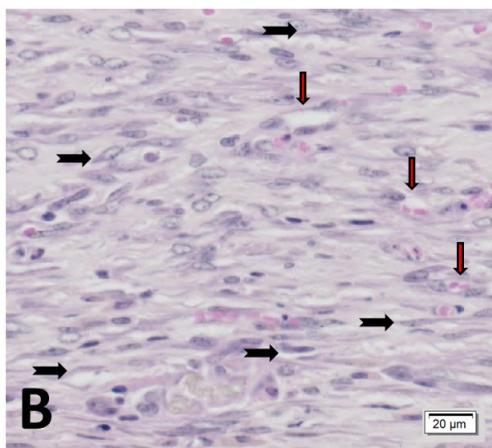
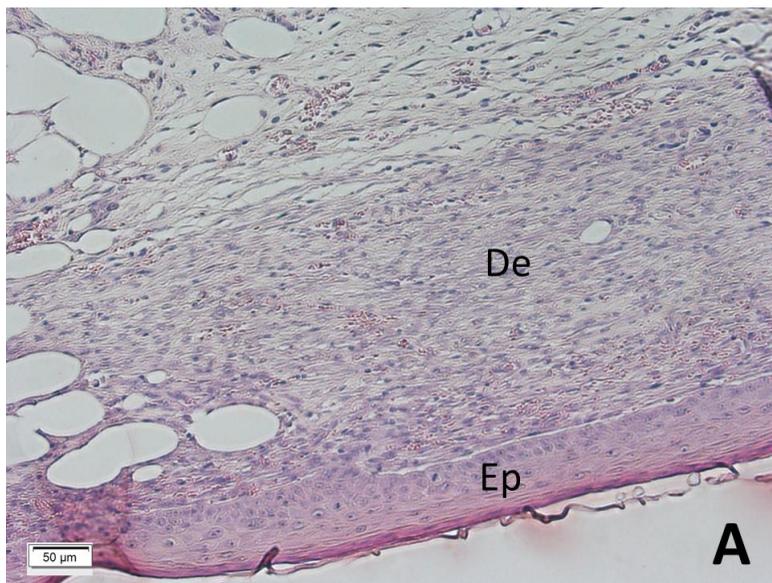


Figura 39 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após catorze dias do ferimento. Controle nanoemulsão 200x (A) e 400x (B) de aumento. De: derme; Ep: epiderme. Setas pretas horizontais apontam fibroblastos enquanto setas vermelhas mostram neovascularização (n = 3).

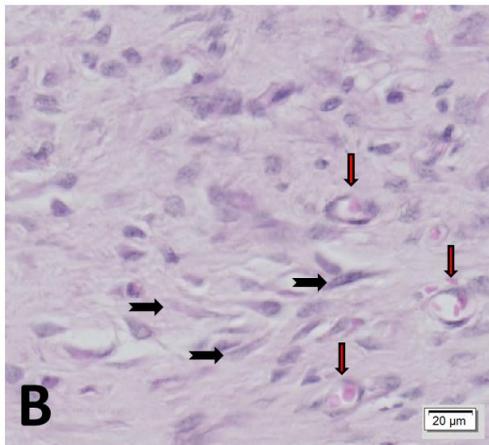
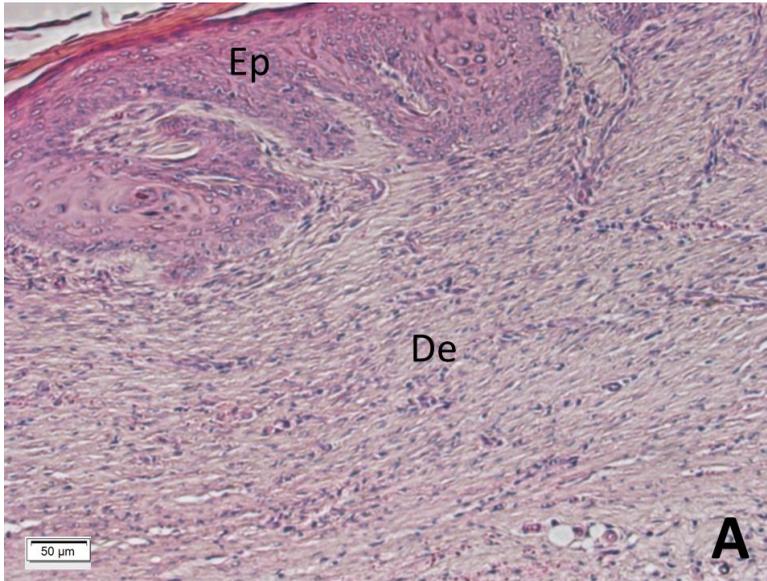


Figura 40 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após dois dias do ferimento. Nanoemulsão EJMO 200x (A) e 400x (B) de aumento. Bo: borda da ferida; Ii: infiltrado inflamatório. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).

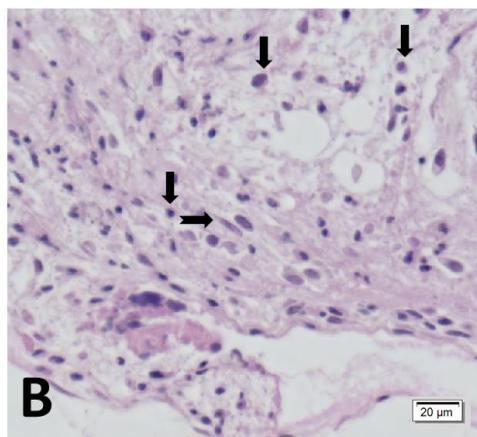
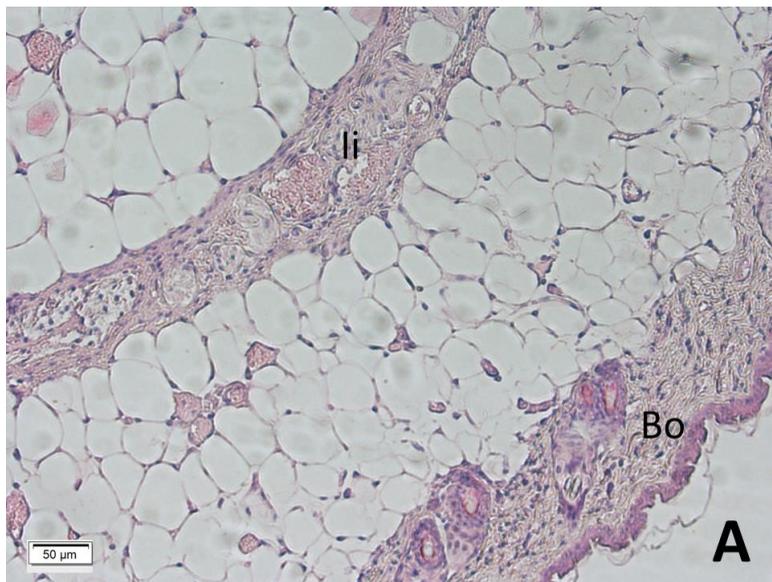
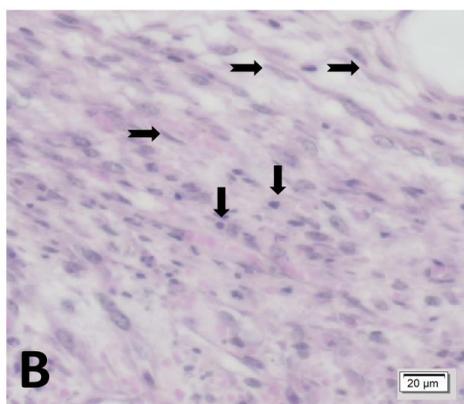
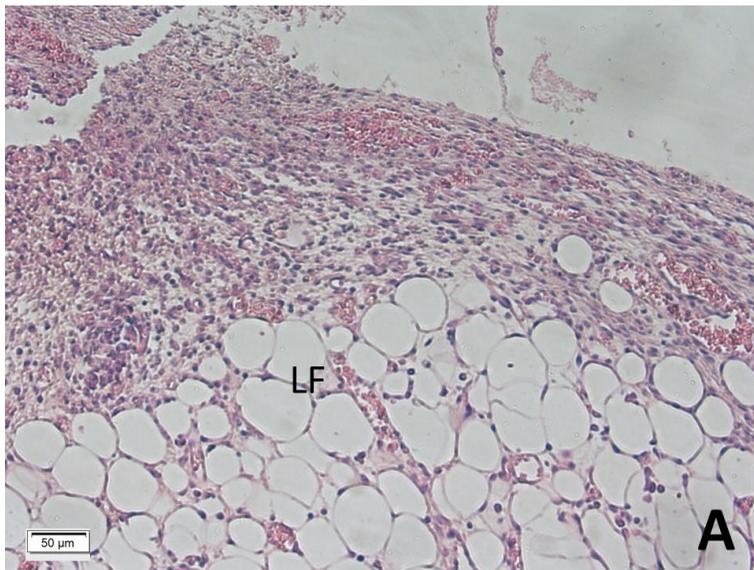
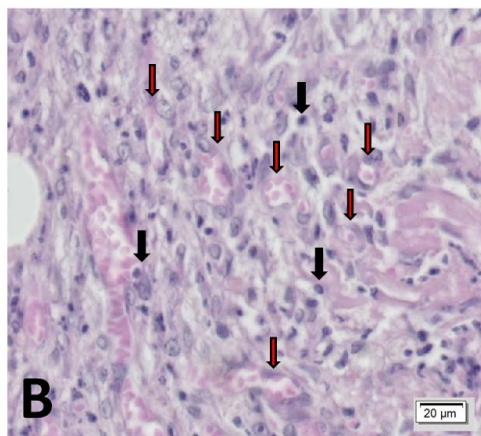
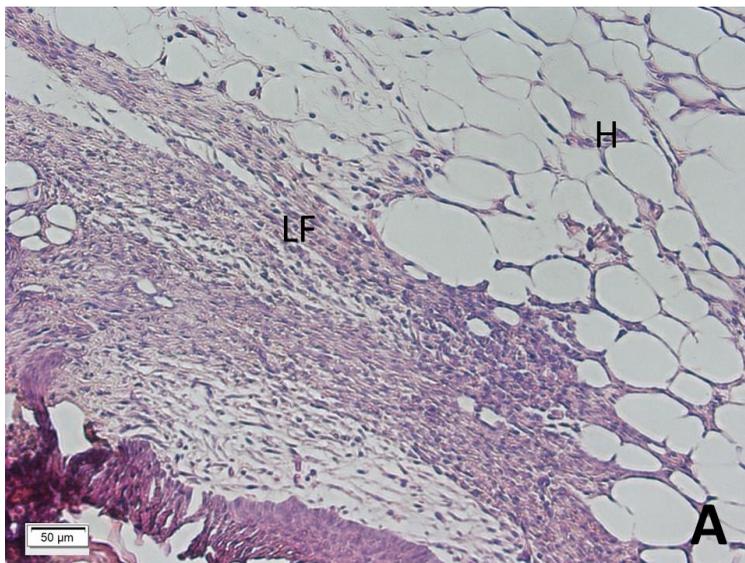


Figura 41 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após cinco dias do ferimento. Nanoemulsão EJMO 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida. Setas pretas verticais indicam a presença de células inflamatórias enquanto setas pretas horizontais apontam fibroblastos (n = 3).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 42 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após sete dias do ferimento. Nanoemulsão EJMO 200x (A) e 400x (B) de aumento. LF: leito da ferida; H: hipoderme. Setas pretas verticais indicam presença de células inflamatórias enquanto setas vermelhas mostram neovascularização (n = 3).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 43 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após nove dias do ferimento. Nanoemulsão EJMO 200x (A) e 400x (B) de aumento. De: derme; Ep: epiderme. Setas pretas horizontais apontam fibroblastos enquanto setas vermelhas mostram neovascularização (n = 3).

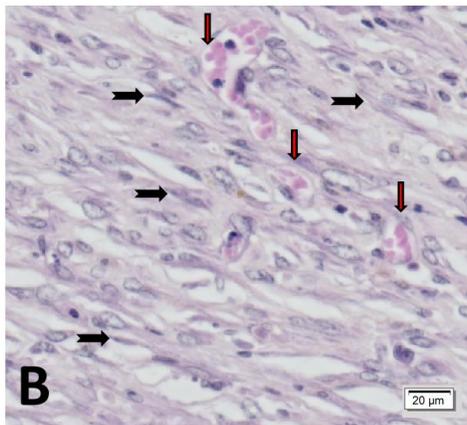
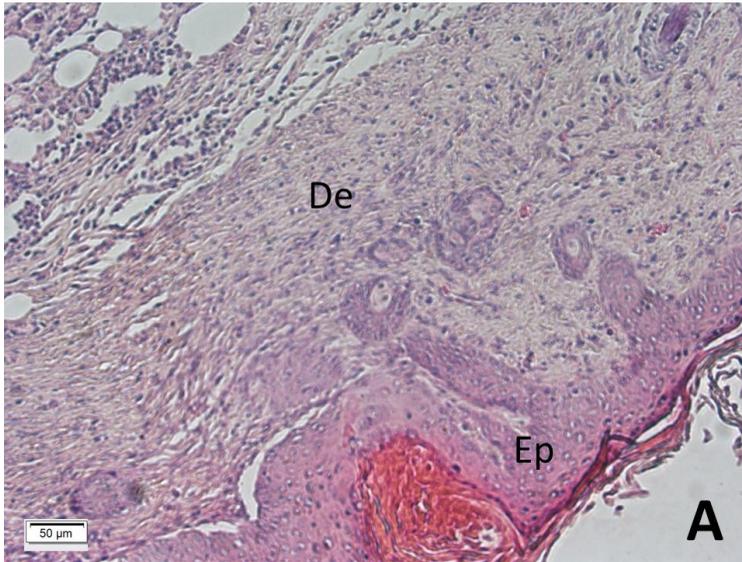
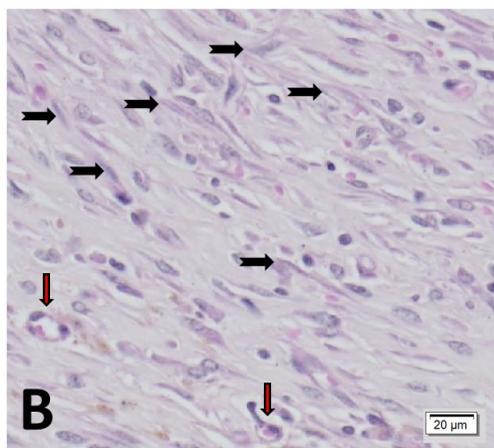
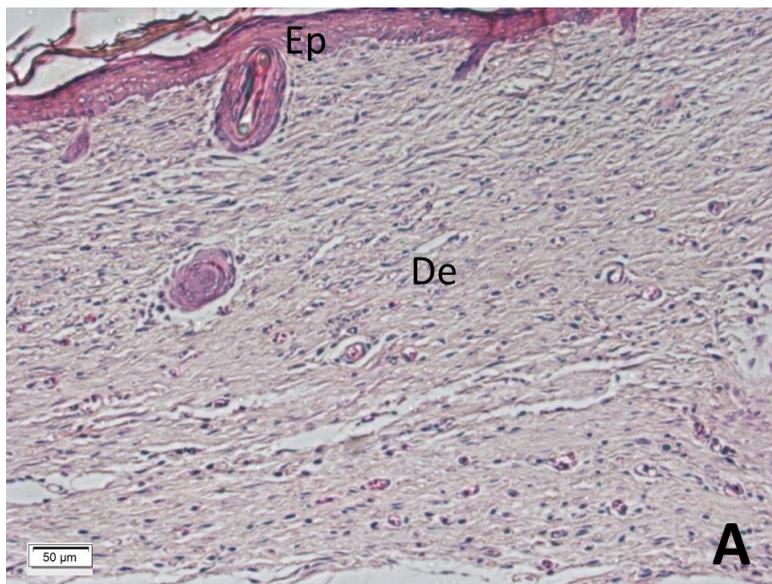


Figura 44 - Micrografias ópticas das lesões cutâneas do dorso de camundongos após catorze dias do ferimento. Nanoemulsão EJMO 200x (A) e 400x (B) de aumento. De: derme; Ep: epiderme. Setas pretas horizontais apontam fibroblastos enquanto setas vermelhas mostram neovascularização (n = 3).

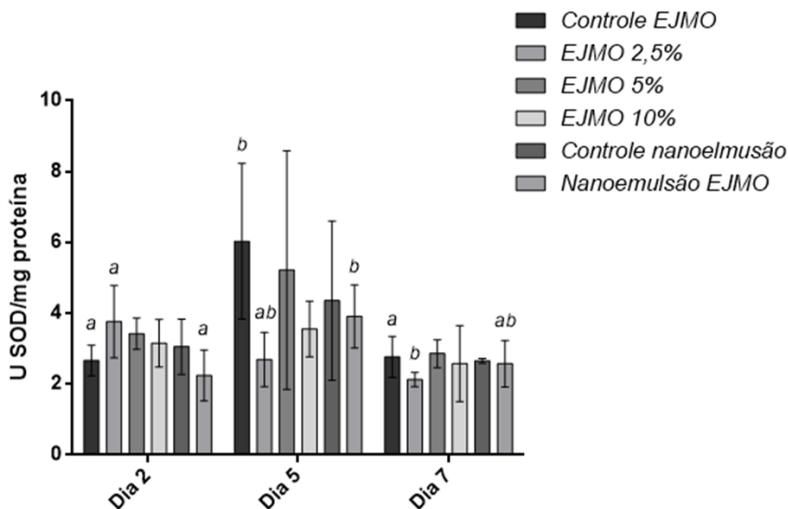


5.16 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E NANOEMULSÃO DE CASCAS DE JABUTICABA DURANTE O PROCESSO CICATRICIAL DE CAMUNDONGOS

A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase e a peroxidação lipídica foram avaliadas em biopsias de pele coletadas dos animais nos dias 2, 5 e 7 após a lesão.

Não houve diferença estatística à atividade da SOD entre os tratamentos avaliados nos dias 2, 5 e 7 após a lesão. Porém, os controles analisados no transcurso do experimento evidenciaram aumentos significativos da atividade enzimática no dia 5 após a lesão, comparativamente ao 2º e 7º dias, descrevendo a atividade de SOD uma parábola decrescente ao longo do processo cicatricial. O EJMO 2,5% elevou a atividade de SOD significativamente no 2º dia, quando comparado ao 7º dia. Nesse tratamento foi observado um decréscimo linear da atividade enzimática com o passar do tempo de cicatrização. Já a nanoemulsão EJMO apresentou efeito similar a parábola descrita para os controles, com valores significativamente maiores de atividade enzimática no 5º dia em relação ao dia 2 (Figura 45).

Figura 45 - Atividade da superóxido dismutase em lesões cutâneas de camundongos tratados com extratos e nanoemulsão de cascas de jabuticaba após o segundo, quinto e sétimo dias da lesão. Dados expressos em média \pm DP (n = 4).

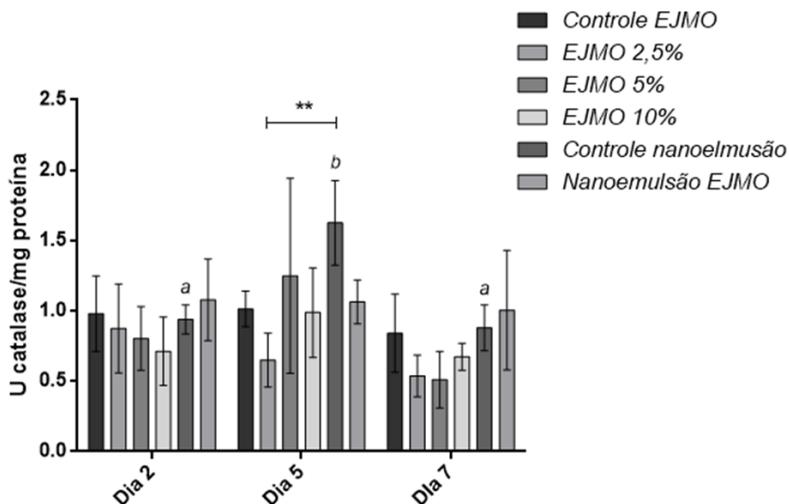


Letras distintas revelam diferenças estatísticas entre tratamentos iguais analisados em diferentes dias.

Fonte: Elaboração própria.

A atividade da enzima catalase mostrou-se significativamente aumentada nos animais tratados com nanoemulsão controle em relação ao EJMO 2,5% no quinto dia após a lesão. Ainda no quinto dia foi possível observar que a atividade enzimática ocasionada pela nanoemulsão controle aumentou de forma significativa em relação a este mesmo tratamento nos dia 2 e 7 (Figura 46).

Figura 46 - Atividade da catalase em lesões cutâneas de camundongos tratados com EJMO e com a nanoemulsão derivada daquele extrato, após o segundo, quinto e sétimo dia da lesão. Dados expressos em média \pm DP (n = 4).



** indica $p < 0,05$ para diferenças estatísticas entre tratamentos diferentes analisados em um mesmo dia. Letras distintas informam diferenças estatísticas entre tratamentos iguais analisados em diferentes dias.

Fonte: Elaboração própria.

As enzimas SOD e catalase são coexpressas no local da lesão, isto porque o produto da reação enzimática catalisada por SOD, o H_2O_2 , é o substrato da reação catalisada pela catalase ou outras peroxidases (STEILING et al., 1999). Essa reação em cadeia garante eficiência no processo de detoxificação de moléculas nocivas.

SHUKLA et al. (1997) estudaram a atividade enzimática de SOD, catalase, glutatona peroxidase e glutatona redutase em modelo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Este estudo elaborou um perfil da atividade de enzimas antioxidantes mensuradas após 2, 4, 7 e 14 dias da lesão. SOD, catalase e GPx apresentaram diminuição em suas atividades enzimáticas nos dias 2, 4 e 7 após a indução do ferimento, recuperando suas atividades de forma parcial (SOD) e total (catalase) após 14 dias. Resultado similar foi observado com o malondialdeído, principal produto da peroxidação lipídica, que foi detectado em menores concentrações nos dias 2, 4 e 7 após a lesão. A única enzima que

mostrou atividade inalterada durante todo o processo cicatricial estudado foi a glutatona redutase.

Por outro lado, a expressão de SeGPx, assim como a MnSOD e Cu/ZnSOD, foram fortemente induzidas após o ferimento, atingindo picos de mRNA entre os dias 3 e 5 após a lesão. A expressão gênica associada à catalase e PhGPx não apresentou aumento (STEILING et al., 1999).

Essas discrepâncias entre a atividade e a expressão de mRNA de enzimas podem ocorrer por interferência de fatores inerentes do local da ferida que influenciam a regulação da tradução dessas enzimas, a degradação de proteínas e/ou inibição da atividade enzimática. Acredita-se que um dos principais fatores que ocasionaria essas alterações seriam as ERO que encontram-se em grandes quantidades na primeira fase da cicatrização. Dessa forma, a detoxificação de ERO parece ser crucial para que o processo de cicatrização de feridas siga de forma normal (STEILING et al., 1999).

O tratamento de lesões cutâneas com compostos fenólicos tem sido estudado como alternativa contra os efeitos negativos de ERO, já que esses fitoquímicos são reconhecidos pelo seu potencial oxirredutor, se comportando como agentes redutores e, às vezes, agindo como quelantes de metais (JOSHI et al., 2016).

Muitos estudos já demonstraram que a ação de extratos vegetais ou compostos fenólicos isolados de plantas utilizados de forma tópica durante a cicatrização de feridas em roedores reflete no aumentando da atividade das enzimas antioxidantes. PANCHATCHARAM et al. (2006) utilizaram curcumina no tratamento de lesões e observaram aumento na atividade de SOD e CAT no 8º dia após o ferimento, enquanto GHLISSI et al. (2016) e JOSHI et al. (2016) constataram aumento na atividade dessas mesmas enzimas em lesões de 12 dias tratadas com extrato aquoso de *Artemisia campestris* e depois de 10 dias de tratamento com extrato etanólico de *Leea macrophylla*, respectivamente. O presente trabalho não corrobora com esses resultados, visto que nenhum dos tratamentos com o extrato de cascas de jabuticaba diferiu dos controles. As discrepâncias observadas entre os tratamentos com EJMO 2,5% e nanoemulsão EJMO nos dias 2, 5 e 7 após a lesão para a atividade da SOD resultam de modulação no balanço oxirredutor celular causado pelos extratos. Isso pode ocorrer devido a mudanças na secreção de ERO ao longo do processo de cicatrização. Os resultados obtidos para o controle de SOD diferem daqueles obtidos por SHUKLA et al. (1997), onde a atividade dessa enzima se manteve inalterada após 2, 4 e 7 dias da lesão. Por outro lado, o aumento significativo observado no 5º dia da

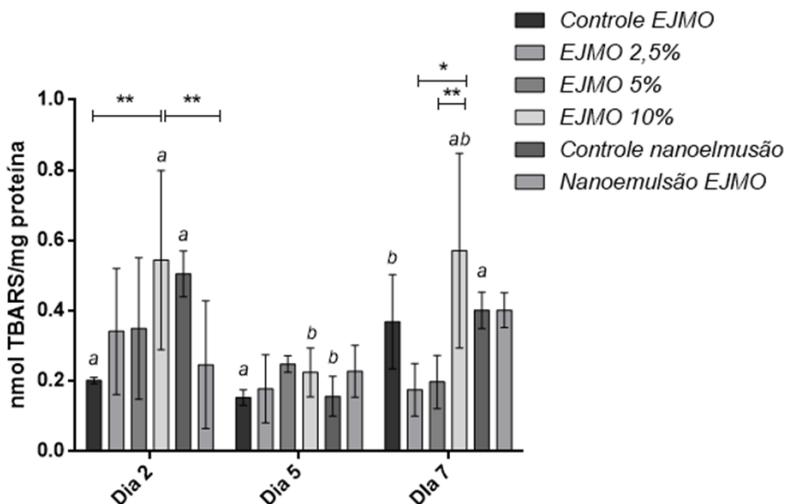
lesão condiz com o pico de expressão de MnSOD e Cu/ZnSOD observados por (STEILING et al., 1999).

No que concerne à atividade da catalase, menores variações foram detectadas. Tal fato pode ser atribuído, segundo alguns autores, à localização subcelular desta enzima que pode interferir na sua resposta durante a cicatrização em relação a outras peroxidases que se encontram prontamente disponíveis (KURAHASHI; FUJII, 2015).

Quanto à peroxidação lipídica, o EJMO 10% aumentou de forma significativa os valores desta variável no segundo dia após a lesão, quando comparado ao controle do extrato e nanoemulsão EJMO, e também no sétimo dia, onde maiores valores foram encontrados em relação aos observados para os extratos 2,5% e 5%.

Entre os controles, a peroxidação lipídica foi aumentada de forma significativa no 7º dia após a indução da lesão, diferentemente do constatado nos períodos anteriores, i.e., 2º e 5º dias. Os animais tratados com EJMO 10% e nanoemulsão controle apresentaram significativa diminuição da peroxidação lipídica no quinto dia após o ferimento (Figura 47), ambos descrevendo uma parábola crescente da peroxidacão ao longo da cicatrização das lesões.

Figura 47 - Quantificação da peroxidação lipídica em lesões cutâneas de camundongos tratados com extrato de EJMO e nanoemulsão derivada, após o segundo, quinto e sétimo dia da lesão. Dados expressos em média \pm DP (n = 4).



*indica $p < 0,01$, para diferenças estatísticas entre tratamentos analisados em um mesmo dia.

** indica $p < 0,05$ para diferenças estatísticas entre tratamentos analisados em um mesmo dia.

Letras distintas informam diferenças estatísticas para os mesmos tratamentos em diferentes momentos amostrais (dias).

Fonte: Elaboração própria.

Moléculas como a vitamina E, β -caroteno, coenzima Q e bilirrubina, devido a sua natureza química, são antioxidantes mais efetivos em membranas e meios hidrofóbicos (KANTA, 2011). Por sua vez, os compostos fenólicos costumam ser mais hidrofílicos do que lipofílicos, característica esta dependente do número de grupos hidroxilas presentes na molécula. Em razão disso, a interação entre polifenóis e membranas está restrita aos domínios polares da bicamada (HENDRICH, 2006).

Extratos de *Leea macrophylla*, *Artemisia campestris*, *Rhodiola imbricata* e curcumina demonstraram valores diminuídos de malondialdeído quando utilizados no tratamento de feridas cutâneas de roedores em lesões de 10, 12, 7 e 8 dias, respectivamente

(PANCHATCHARAM et al., 2006, GUPTA et al., 2007, GHLISSI et al., 2016, JOSHI et al., 2016).

Dentre os extratos testados de cascas de jabuticaba, o EJMO 10% parece promover a peroxidação lipídica durante cicatrização de feridas cutâneas.

A incorporação do extrato de cascas de jabuticaba em nanoemulsão foi realizada com base na premissa de que compostos fenólicos nessas condições estão mais protegidos contra degradação, aumentam a biodisponibilidade e permitem que maiores concentrações do composto atinjam as células alvo (BRGLEZ MOJZER et al., 2016). O uso tópico de nanoemulsões já vem sendo usado em feridas infectadas, através da incorporação de antimicrobianos (CAO et al., 2017), na área cosmética, com compostos que promovem proteção da pele contra danos induzidos por radiação UV (BROWNLOW et al., 2015), e na liberação de fármacos com atividade analgésica e anti-inflamatória (ABDULLAH et al., 2011).

Os resultados dos tratamentos com nanoemulsão e extrato de cascas de jabuticaba durante a cicatrização de feridas não foram promissores. O comportamento da atividade enzimática não demonstrou que os extratos e nanoemulsão tenham ação antioxidante. Com relação a peroxidação lipídica, o extrato 10% mostrou-se indutor desse processo, efeito esse que pode ser justificado pela alta concentração de compostos fenólicos que assumiram característica pró-oxidante no local. Porém resultados *in vitro* realizados com o extrato e os radicais DPPH e peroxila revelaram um grande potencial desses componentes como sequestradores dessas moléculas. Controvérsias entre estudos *in vitro* e *in vivo* existem porque o uso terapêutico dessas substâncias está sujeito a uma série de processos fisiofarmacológicos tais como absorção, distribuição, metabolismo, armazenamento e excreção, fatores estes que não podem ser preditos *in vitro* (KASOTE et al., 2015).

A utilização de extratos de cascas de jabuticaba com o intuito de promover melhora no processo cicatricial *in vivo* não foi bem sucedida. Porém, MATSUO et al. (2004) demonstraram que fibroblastos de pele de doadores mais velhos (idade entre 72 e 81 anos), tiveram maiores percentuais de sobrevivência sob estresse oxidativo induzido por H₂O₂, hidroperóxido de ácido linoleico e UVB quando comparados a fibroblastos de doadores jovens (idade entre 21 e 39 anos). Esses resultados foram atribuídos ao aumento da atividade de glutatona peroxidase em células de doadores mais velhos. Uma vez que EJMO consegue induzir aumento na atividade não só de glutatona peroxidase mas também de catalase em fibroblastos, esse extrato pode ser benéfico em pele íntegra, evitando o estresse oxidativo causador de envelhecimento, como a radiação UV.

6 CONCLUSÕES

O extrato proveniente de cascas de jabuticaba obtido através de exposição à radiação micro-ondas apresentou uma grande concentração de compostos fenólicos. Esta característica é determinante para a atividade antioxidante, o que foi evidenciado pela alta taxa de sequestro dos radicais DPPH e peroxila. Além disso, a exposição ao extrato seguido por estresse oxidativo mediado por H_2O_2 promoveu citoproteção de fibroblastos da linhagem L929. O mesmo efeito não foi observado em queratinócitos da linhagem HaCat. Porém, em ambas as linhagens celulares houve aumento das defesas enzimáticas antioxidantes. Queratinócitos tiveram a atividade de catalase aumentada enquanto fibroblastos apresentaram aumento na atividade de catalase e glutatona peroxidase. Este efeito ocasionado pelo extrato sobre as enzimas antioxidantes explica o mecanismo utilizado pelos fibroblastos para promover a citoproteção contra o estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 .

O extrato e nanoemulsão de cascas de jabuticaba em micro-ondas não afetaram a ação enzimática de superóxido dismutase e catalase em lesões cutâneas no dorso de camundongos. O extrato de cascas de jabuticaba em micro-ondas 10% testado nesse mesmo modelo parece induzir peroxidação lipídica após 2 e 7 dias da lesão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-EL-ALEEM, S. A et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers. **The Journal of pathology**, v. 191, n. 4, p. 434–42, 2000.

ABDULLAH, G. Z. et al. *In vitro* permeation and *in vivo* anti-inflammatory and analgesic properties of nanoscaled emulsions containing ibuprofen for topical delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 387–396, 2011.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.

AJILA, C. M. et al. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends **Critical Reviews in Biotechnology**, 2011.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. The protective effect of acerola (*Malpighia emarginata*) against oxidative damage in human dermal fibroblasts through the improvement of antioxidant enzyme activity and mitochondrial functionality. **Food and Function**, v. 8, n. 9, p. 3250–3258, 2017.

ALVES, C. Q. et al. Revisão. v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

AMIJI, M. M. **Nanotechnology for cancer therapy**. Boca Raton ed. [s.l: s.n.].

ANCELIN, M. et al. Vascular endothelial growth factor VEGF189 induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism. **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 4, p. 502–512, 2004.

ARTUC, M. et al. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? **Experimental dermatology**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 1999.

- AUF DEM KELLER, U. et al. **Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds**. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings. **Anais...**2006
- AZMI, A. S.; BHAT, S. H.; HADI, S. M. Resveratrol-Cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: Implications for anticancer properties. **FEBS Letters**, v. 579, n. 14, p. 3131–3135, 2005.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.
- BALEKAR, N. et al. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 817–824, 2012.
- BARANANO, D. E. et al. Biliverdin reductase: A major physiologic cytoprotectant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 25, p. 16093–16098, 2002.
- BARONI, M. V. et al. How good antioxidant is the red wine? Comparison of some *in vitro* and *in vivo* methods to assess the antioxidant capacity of Argentinean red wines. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 1–7, 2012.
- BARRIENTOS, S. et al. Growth factors and cytokines in wound healing *Wound Repair and Regeneration*, 2008.
- BATISTA, Â. G. et al. Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. **Journal of Functional Foods**, v. 6, n. 1, p. 450–461, 2014.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.
- BENNET, D.; KIM, S. A transdermal delivery system to enhance quercetin nanoparticle permeability. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 24, n. 2, p. 185–209, 2013.

BOUMAZA, S. et al. Therapeutic Role of Resveratrol and Quercetin on Aortic Fibroblasts of *Psammomys obesus* After Oxidative Stress by Hydrogen Peroxide. **American Journal of Therapeutics**, n. January, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRAUCHLE, M. et al. Ultraviolet B and H₂O₂ are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 36, p. 21793–21797, 1996.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 2009.

BRGLEZ MOJZER, E. et al. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 7, 2016.

BRVKOVYCH, V. et al. **Nitric oxide release from normal and dysfunctional endothelium**. *Journal of Physiology and Pharmacology*. **Anais...**1999

BROWNLOW, B., NAGARAJ, V.J., NAYEL, A., JOSHI, M., ELBAYOUMI, T. Development and *In Vitro* Evaluation of Vitamin E-Enriched Nanoemulsion Vehicles Loaded with Genistein for Chemoprevention Against UVB-Induced Skin Damage. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, p. 3510–3523, 2015.

BRUNNER, G. Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. **Ed. Darmstadt, Germany**, n. 1, 1994.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1–2, p. 21–33, 2005.

CALABRESE, E. J. et al. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 222, n. 1, p. 122–128, 2007.

CALLONI, C. et al. Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5). **Food Research International**, v. 70, p. 15–22, 2015.

CAO, Z. et al. Nanoemulsion is an effective antimicrobial for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in infected wounds. **Nanomedicine**, v. 12, n. 10, p. 1177–1185, 2017.

CARVALHO, A. C. et al. Redox-dependent induction of antioxidant defenses by phenolic diterpenes confers stress tolerance in normal human skin fibroblasts: Insights on replicative senescence. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 83, p. 262–272, 2015.

CHETTIBI, S. & FERGUSON, M. W. J. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. In: SNYDERMAN, J. I. G. & R. (Ed.). . **Wound Repair: An Overview**. 3rd ed ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

CHOUNG, M. et al. Isolation and Determination of Anthocyanins in Seed Coats of Black Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). v. 18, p. 5848–5851, 2001.

CONNELLY, L. et al. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. **J Immunol**, v. 166, n. 6, p. 3873–3881, 2001.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Anais...1998

CRUZ, A.V.M., KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, p. 47–52, 2004.

DARR, D.; FRIDOVICH, I. Free Radicals in Cutaneous Biology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 5, p. 671–675, 1994.

DAVINELLI, S. et al. Enhancement of mitochondrial biogenesis with polyphenols: Combined effects of resveratrol and equol in human endothelial cells. **Immunity and Ageing**, v. 10, n. 1, p. 1, 2013.

DE KOK, T. M.; VAN BREDA, S. G.; MANSON, M. M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: A review *European Journal of Nutrition*, 2008.

DE OLIVEIRA, L. A. et al. Design of antiseptic formulations containing extract of *Plinia cauliflora*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 525–533, 2011.

DESHANE, J. et al. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 3, p. 605–618, 2007.

DESMOULIÈRE, A. et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 1, p. 56–66, 1995.

DIEGELMANN, R. F. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n. 1–3, p. 283, 2004.

DRAGANO, N. R. V. et al. Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 3, p. 447–455, 2013.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

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.

DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, n. 1, p. 79, 2000.

EGHBALIFERIZ, S.; IRANSHAHI, M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated

Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. **Phytotherapy Research**, v. 1391, n. March, p. 1379–1391, 2016.

EMING, S. A. et al. Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 115–170, 2007.

EPSTEIN, F. H.; WEISS, S. J. Tissue Destruction by Neutrophils. **New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 6, p. 365–376, 1989.

ETRY, R.D., ORTEGA, G.G., SILVA, W. B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminum chloride-flavonoid complex. **Pharmazie**, v. 56, p. 465–470, 2001.

FANTINI, M. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment *International Journal of Molecular Sciences*, 2015.

FEHÉR, P. et al. Efficacy of pre- and post-treatment by topical formulations containing dissolved and suspended *Silybum marianum* against UVB-induced oxidative stress in guinea pig and on HaCat keratinocytes. **Molecules**, v. 21, n. 10, 2016.

FINKEL, T. Oxygen radicals and signaling *Current Opinion in Cell Biology*, 1998.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 105, n. July, p. 114–120, 1984.

GABBITA, S. P. et al. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties *Free Radical Biology and Medicine*, 2004.

GHLISSI, Z. et al. ScienceDirect Antioxidant , antibacterial , anti-inflammatory and wound healing effects of *Artemisia campestris* aqueous

extract in rat. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 84, p. 115–122, 2016.

GHOSH, P. K.; GABA, A. Phyto-Extracts in Wound Healing. **J Pharm Pharm Sci**, v. 16, n. 5, p. 760–820, 2013.

GIAMPIERI, F. et al. An anthocyanin-rich strawberry extract protects against oxidative stress damage and improves mitochondrial functionality in human dermal fibroblasts exposed to an oxidizing agent. **Food & Function**, v. 5, n. 8, p. 1939, 2014a.

GIAMPIERI, F. et al. Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and improves mitochondrial functionality. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7798–7816, 2014b.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1977.

GRINNELL, F.; ZHU, M. Identification of neutrophil elastase as the proteinase in burn wound fluid responsible for degradation of fibronectin. *The Journal of investigative dermatology*, 1994.

GUPTA, A. et al. Effects of *Rhodiola imbricata* on dermal wound healing. **Planta Medica**, v. 73, n. 8, p. 774–777, 2007.

GUPTA, A.; SINGH, R. L.; RAGHUBIR, R. Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 241, n. 1–2, p. 1–7, 2002.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration *Nature*, 2008.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008.

HANSCHMANN, E.-M. et al. Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 13, p. 1539–1605, 2013.

HANSELMANN, C.; MAUCH, C.; WERNER, S. Haem oxygenase-1: a novel player in cutaneous wound repair and psoriasis? **The Biochemical journal**, v. 353, n. Pt 3, p. 459–66, 2001.

HENDRICH, A. B. Flavonoid-membrane interactions: Possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds *Acta Pharmacologica Sinica*, 2006.

HINZ, B.; GABBIANI, G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: Role in connective tissue remodeling *Thrombosis and Haemostasis*, 2003.

HONG, L. et al. Development of a carboxymethyl chitosan functionalized nanoemulsion formulation for increasing aqueous solubility, stability and skin permeability of astaxanthin using low-energy method. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 8, p. 707–721, 2017.

HUK, I., BROVKOVYCH, V., NANOBASHVILI, J., NEUMAYER, C., POLTERAUER, P., PRAGER, M., PATTON, S., MALINSKI, T. Prostaglandin E1 reduces ischemia/reperfusion injury by normalizing nitric oxide and superoxide release. **Shock**, v. 14, p. 234–242, 2000.

HUK, I., NANOBASHVILI, J., NEUMAYER, C., PUNZ, A., MUELLER, M., AFKHAMPOUR, K., MITTLBOECK, M., LOSERT, U., POLTERAUER, P., ROTH, E., PATTON, S., MALINSKI, T. . L-arginine treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. **Circulation**, v. 96, p. 667–675, 1997.

JADHAV, C.; KATE, V.; PAYGHAN, S. A. Investigation of effect of non-ionic surfactant on preparation of griseofulvin non-aqueous nanoemulsion. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 107–113, 2015.

JONES, R. D.; MORICE, A. H. Hydrogen peroxide - an intracellular signal in the pulmonary circulation: involvement in hypoxic pulmonary vasoconstriction. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, n. 2, p. 153–161, 2000.

JOSHI, A. et al. Systematic investigation of ethanolic extract from *Lea macrophylla*: Implications in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 95–106, 2016.

JUDE, E. B. et al. The role of nitric oxide synthase isoforms and arginase in the pathogenesis of diabetic foot ulcers: Possible modulatory effects by transforming growth factor beta 1. **Diabetologia**, v. 42, n. 6, p. 748–757, 1999.

KANTA, J. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. **Acta medica (Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové**, v. 54, n. 3, p. 97–101, 2011.

KASOTE, D. M. et al. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 8, p. 982–991, 2015.

KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. **Toxicology**, v. 172, n. 2, p. 149–156, 2002.

KLYUBIN, I. V; KIRPICHNIKOVA, K. M.; GAMALEY, I. A. Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. **European journal of cell biology**, v. 70, n. 4, p. 347–51, 1996.

KREIG, T. Collagen in the wound healing. **Wounds Compendium Clin Res Pract**, v. 7, p. 5–12, 1995.

KREISEL, D. et al. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 42, p. 18073–18078, 2010.

KÜMIN, A. et al. Peroxiredoxin 6 is a potent cytoprotective enzyme in the epidermis. **American Journal of Pathology**, v. 169, n. 4, p. 1194–1205, 2006.

- KÜMIN, A. et al. Peroxiredoxin 6 is required for blood vessel integrity in wounded skin. **Journal of Cell Biology**, v. 179, n. 4, p. 747–760, 2007.
- KURAHASHI, T.; FUJII, J. Roles of Antioxidative Enzymes in Wound Healing. **Journal of Developmental Biology**, v. 3, n. 2, p. 57–70, 2015.
- KURZEJA, E. et al. Studies on the effect of quercetin and nitrates on the redox homeostasis using *in vitro* model. v. 8, p. 24–30, 2014.
- LAGE, F. F. et al. Jaboticaba [Pliniajaboticaba (Vell.) Berg] skins decrease lipid peroxidation: Hepatoprotective and antihyperlipidemic effects. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 11, p. 1295–1302, 2014.
- LAVAN, F. B.; HUNT, T. K. Oxygen and wound healing. **Clinics in plastic surgery**, v. 17, n. 3, p. 463–72, 1990.
- LEE, K. S. et al. Hydrogen peroxide induces vascular permeability via regulation of vascular endothelial growth factor. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 35, n. 2, p. 190–197, 2006.
- LEE, P. J. et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 9, p. 5375–5381, 1997.
- LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596–603, 2012.
- LENQUISTE, S. A. et al. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 153–160, 2012.
- LI, J.; ZHANG, Y. P.; KIRSNER, R. S. Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microscopy Research and Technique**, 2003.

- LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.
- LIMA, A. DE J. B. et al. Sugars, organic acids, minerals and lipids in jaboticaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 540–550, 2011.
- LIMA, C. F.; PEREIRA-WILSON, C.; RATTAN, S. I. S. Curcumin induces heme oxygenase-1 in normal human skin fibroblasts through redox signaling: Relevance for anti-aging intervention. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. 3, p. 430–442, 2011.
- LIU, Y. H. et al. Protective Effects of Minor Components of Curcuminoids on Hydrogen Peroxide-Treated Human HaCat Keratinocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 18, p. 3598–3608, 2016.
- LOO, A. E. K.; HO, R.; HALLIWELL, B. Mechanism of hydrogen peroxide-induced keratinocyte migration in a scratch-wound model. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 4, p. 884–892, 2011.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2.ed ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998.
- LUSCINSKAS, F. W.; LAWLER, J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 8, n. 12, p. 929–38, 1994.
- MACLEOD, A. S.; MANSBRIDGE, J. N. The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 5, n. 2, p. 65–78, 2016.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: Food sources and bioavailability *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004.
- MANOJ, G. S.; MURUGAN, K. Wound healing activity of methanolic and aqueous extracts of *Plagiochila beddomei* Steph. thallus in rat model. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 50, n. 8, p. 551–558, 2012.

MARTIN, P. Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75–81, 1997.

MATSUO, M. et al. Resistance of cultured human skin fibroblasts from old and young donors to oxidative stress and their glutathione peroxidase activity. **Gerontology**, v. 50, n. 4, p. 193–199, 2004.

MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing Research Reviews**, 2008.

MAZZARINO, L. et al. Jaboticaba (*Plinia peruviana*) extract nanoemulsions: development, stability, and *in vitro* antioxidant activity. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 9045, p. 1–9, 2017.

MICHALAK, A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. **Plant Cell**, v. 15, n. 4, p. 523–530, 2006.

MIDWOOD, K. S.; WILLIAMS, L. V.; SCHWARZBAUER, J. E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 2004.

MINUTTI, C. M. et al. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 61, p. 3–11, 2017.

MORTON, J. F. **Fruits of warm climates**. Miami: Florida Flair Books, 1987.

MOSELEY, R. et al. Extracellular matrix metabolites as potential biomarkers of disease activity in wound fluid: Lessons learned from other inflammatory diseases? **British Journal of Dermatology**, 2004.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, 2008.

MOULIN, V. Growth factors in skin wound healing. **European Journal of Cell Biology**, v. 68, n. 1, p. 1–7, 1995.

MUNZ, B. et al. A novel type of glutathione peroxidase: expression and regulation during wound repair. **The Biochemical journal**, v. 326 (Pt 2, p. 579–85, 1997.

MURRELL, G. A. C.; BROMLEY, M. J. O.; FRANCIS, L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. **Biochemistry**, v. 265, p. 659–665, 1990.

NAYAK, B. S.; PINTO PEREIRA, L. M. Catharanthus roseus flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, 2006.

NEGRÃO, R. et al. Evidence for the Effects of Xanthohumol in Disrupting Angiogenic, but not Stable Vessels. **International journal of biomedical science : IJBS**, v. 3, n. 4, p. 279–86, 2007.

NEGRÃO, R. et al. Angiogenesis and inflammation signaling are targets of beer polyphenols on vascular cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, n. 5, p. 1270–1279, 2010.

NEGRÃO, R. et al. Xanthohumol-supplemented beer modulates angiogenesis and inflammation in a skin wound healing model. Involvement of local adipocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 1, p. 100–109, 2012.

NERI-NUMA, I. A. et al. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, v. 103, n. May 2017, p. 345–360, 2018.

NIETHAMMER, P. et al. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. **Nature**, v. 459, n. 7249, p. 996–999, 2009.

NIZAMUTDINOVA, I. T. et al. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 11, p. 2806–2812, 2009.

O'TOOLE, E. A.; GOEL, M.; WOODLEY, D. T. Hydrogen peroxide inhibits human keratinocyte migration. **Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]**, v. 22, n. 6, p. 525–9, 1996.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues Thiobarbituric Acid Reaction. v. 358, p. 351–358, 1979.

OHKI, Y. et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 14, p. 2005–7, 2005.

OJHA, N. et al. Assessment of wound-site redox environment and the significance of Rac2 in cutaneous healing. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 4, p. 682–691, 2008.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619–4626, 2001.

PANCHATCHARAM, M. et al. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 290, n. 1–2, p. 87–96, 2006.

PARK, E.-J.; M. PEZZUTO, J. Flavonoids in Cancer Prevention. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 836–851, 2012.

PIGEOLET, E. et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 51, n. 3, p. 283–297, 1990.

PLAZA, M. et al. Characterization of antioxidant polyphenols from Myrciaria jaboticaba peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. **Food Chemistry**, v. 211, p. 185–197, 2016.

POLVERINI, P.; DIPIETRO, L.A.; DIXIT, V.M.; HYNES, R.O.; LAWLER, J. Thrombospondin-1 knock out mice show delayed organization and prolonged neovascularization of skin wound. **FASEB J**, v. 9, 1995.

PONNUSAMY, Y. et al. Polyphenols rich fraction of *Dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 305–314, 2015.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 2011.

QIN, C. et al. Analysis and characterisation of anthocyanins in mulberry fruit. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 28, n. 2, p. 117–126, 2010.

RACEK, J., HOLEČEK, V. Enzymy a volné radikály. **Chemické Listy**, v. 93, p. 774–780, 1999.

RAJA, S. K.; GARCIA, M. S.; ISSEROFF, R. R. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 12, n. 1, p. 2849–68, 2007.

RANDHIR, R.; SHETTY, P.; SHETTY, K. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1247–1256, 2002.

RASIK, A. M.; SHUKLA, A. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 81, n. 4, p. 257–263, 2000.

RAZZELL, W. et al. Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through duox activation and hydrogen peroxide release. **Current Biology**, v. 23, n. 5, p. 424–429, 2013.

REYNERTSON, K. A. et al. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1228–1230, 2006.

RHEE, S. G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 31, n. 2, p. 53–59, 1999.

RHEE, S. G. et al. Hydrogen Peroxide: A Key Messenger That Modulates Protein Phosphorylation Through Cysteine Oxidation. **Science Signaling**, v. 2000, n. 53, p. pe1-pe1, 2000.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152–159, 1997.

RODERO, M. P. et al. Reduced IL17a expression distinguishes a Ly6c^{lo} MHCII^{hi} macrophage population promoting wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 3, p. 783–792, 2013.

RODERO, M. P. et al. In vivo imaging reveals a pioneer wave of monocyte recruitment into mouse skin wounds. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

ROY, R.; ZHANG, B.; MOSES, M. A. Making the cut: Protease-mediated regulation of angiogenesis *Experimental Cell Research*, 2006.

ROY, S. et al. Dermal wound healing is subject to redox control. **Molecular Therapy**, v. 13, n. 1, p. 211–220, 2006.

SAKIHAMA, Y. et al. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, v. 177, n. 1, p. 67–80, 2002.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacological Research**, v. 58, n. 2, p. 165–171, 2008.

SCHRUEFER, R. et al. The proangiogenic capacity of polymorphonuclear neutrophils delineated by microarray technique and by measurement of neovascularization in wounded skin of CD18-deficient mice. **Journal of Vascular Research**, v. 43, n. 1, p. 1–11, 2005.

SEN, C. K. et al. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 36, p. 33284–33290, 2002.

SEN, P. et al. Enhancement of catalase activity by repetitive low-grade H₂O₂ exposures protects fibroblasts from subsequent stress-induced apoptosis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 529, n. 1–2, p. 87–94, 2003.

SHUKLA, A.; RASIK, A. M.; PATNAIK, G. K. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing cutaneous wound. **Free Radical Research**, v. 26, n. 2, p. 93–101, 1997.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **The New England journal of medicine**, v. 341, n. 10, p. 738–46, 1999.

SOBRAL, M., PROENÇA, C., SOUZA, M., MAZINE, F., LUCAS, E. **Myrtaceae**. Jardim Bot ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

SONEJA, A.; DREWS, M.; MALINSKI, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 108–119, 2005.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; SACRAMENTO, L. V. S. ET AL. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 20, p. 48–53, 2010.

STALLMEYER, B. et al. The function of nitric oxide in wound repair: Inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, n. 6, p. 1090–1098, 1999.

STEILING, H. et al. Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. **Experimental Cell Research**, v. 247, n. 2, p. 484–494, 1999.

STONE, J. R.; COLLINS, T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. **Endothelium**, v. 9, n. 4, p. 231–238, 2002.

STREIT, M. et al. Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 13, p. 3272–3282, 2000.

TAKAHASHI, A.; AOSHIBA, K.; NAGAI, A. Apoptosis of wound fibroblasts induced by oxidative stress. **Experimental Lung Research**, v. 28, n. 4, p. 275–284, 2002.

TEIXEIRA, J. et al. Mitochondria: Targeting mitochondrial reactive oxygen species with mitochondriotropic polyphenolic-based antioxidants. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 97, n. January, p. 98–103, 2018.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, 2010.

VESSEY, D. A.; LEE, K. H.; BLACKER, K. L. Characterization of the oxidative stress initiated in cultured human keratinocytes by treatment with peroxides. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 99, n. 6, p. 859–863, 1992.

VILLANUEVA, C.; KROSS, R. D. Antioxidant-induced stress. **International Journal of Molecular Sciences**, 2012.

WAGENER, F. A. D. T. G. et al. The heme-heme oxygenase system: A molecular switch in wound healing. **Blood**, v. 102, n. 2, p. 521–528, 2003.

WANG, B. ZINSELMAYER, B.H., RUNNELS, H.A., LABRANCHE, T.P., MORTON, P.A., KREISEL, D., MACK, M., NICKERSON-NUTTER, C., ALLEN, P.M., MILLER, M. J. In vivo imaging implicates CCR2(+) monocytes as regulators of neutrophil recruitment during arthritis. **Cellular Immunology**, v. 278, p. 103–112, 2012.

WANG, H.Q., QUAN, T., HE, T., FRANKE, T.F., VOORHEES, J.J., FISHER, G. J. Epidermal growth factor receptor-dependent, nf-kappab-independent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway inhibits ultraviolet irradiation-induced caspases-3, -8, and -9 in human keratinocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 45737–45745, 2003.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 304–309, 1997.

WANG, L.-S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer letters**, v. 269, n. 2, p. 281–90, 2008.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 835–870, 2003.

WILLENBORG, S. et al. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. **Blood**, v. 120, n. 3, p. 613–625, 2012.

WLASCHEK, M.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, v. 13, n. 5, p. 452–61, 2005.

WOOD, W. Wound healing: Calcium flashes illuminate early events. **Current Biology**, v. 22, n. 1, 2012.

WU, S. et al. Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, p. 7513–7525, 2012.

XU, L. et al. Anthocyanins from black soybean seed coat enhance wound healing. **Annals of Plastic Surgery**, v. 71, n. 4, p. 415–420, 2013.

YOKOZAWA, T.; SATOH, A.; KIM, Y. J. Modulation of oxidative stress by proanthocyanidin in H₂O₂-exposed human diploid fibroblast cells. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 77, n. 10, p. 2056–2060, 2013.

ZHAO, R. et al. Inflammation in chronic wounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1–14, 2016.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L. Nitric oxide and angiogenesis *Journal of Neuro-Oncology*, 2000.

_____. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasília: Rio de Janeiro, 2014.

APÊNDICE A – CYTOPROTECTIVE EFFECTS OF JABOTICABA (*Plinia peruviana*, Poir. Govaerts) FRUIT PEEL EXTRACTS AGAINST H₂O₂-INDUCED OXIDATIVE STRESS

ROS
RESEARCH ARTICLES

Cytoprotective Effects of Jaboticaba (*Plinia peruviana*, Poir. Govaerts) Fruit Peel Extracts against H₂O₂-Induced Oxidative Stress

Heloisa da Silva Pitz, Aline Pereira, Ana Paula Lorenzen Voytena, Adriana Carla Dias Trevisan, Regina Celis Lopes Affonso, Rosa Maria Ribeiro-do-Valle, and Marcelo Maraschin

Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Correspondence: heloisapitz@gmail.com (H.S.P.)

Pitz HS et al. *Reactive Oxygen Species* 4(11):362–371, 2017; ©2017 Cell Med Press

<http://dx.doi.org/10.20455/ros.2017.839>

(Received: June 30, 2017; Revised: July 18, 2017; Accepted: July 19, 2017)

ABSTRACT | Oxidative stress is a result of disturbance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidants defenses. Plant secondary metabolites can be used as exogenous antioxidants to prevent human oxidative stress-related diseases. This study aimed to determine the antioxidant and cytoprotective effects of jaboticaba fruit peel hydroalcoholic extracts against H₂O₂-induced oxidative stress in a murine fibroblast (L929 cell line) model. Ultra-high pressure hydroalcoholic extracts (50% ethanol, UP) were obtained over 4 h, with 1 h interval between collections. UP 3 h and UP 4 h extracts presented the highest and the lowest phenolic and flavonoid contents, respectively. Antioxidant capacity showed that 1 mg/ml extracts inhibited 90% of DPPH radical activity and UP 1 h extract had significant ($p < 0.05$) higher scavenging activity than other extracts at this concentration. After 24 h of exposure to UP 4 h extracts, cell viability was significantly increased when compared to control, UP 1 h, and UP 2 h extracts. When cells were previously treated with UP hydroalcoholic extracts followed by H₂O₂ exposure, all extracts at 0.05 and 0.1 mg/ml exhibited significant ($p < 0.05$) cytoprotective effects in relation to control. Results demonstrated that jaboticaba fruit peel extracts are antioxidants and exert cytoprotective effects under H₂O₂-induced oxidative stress.

KEYWORDS | Antioxidant; Cytoprotection; Jaboticaba; Oxidative stress; Phytochemicals

ABBREVIATIONS | CA, carnosol acid; CS, carnosol; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FBS, fetal bovine serum; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; ROS, reactive oxygen species; UP, ultra-high pressure

CONTENTS

1. Introduction
2. Material and Methods
 - 2.1. Plant Material Collection and Extraction

2.2. Phytochemical Analysis
2.2.1. Total Phenolics Content
2.2.2. Total Flavonoids Content
2.3. Antioxidant Activity (DPPH Assay)
2.4. Cell Viability Assay Using L929 Fibroblasts
2.5. H ₂ O ₂ -Induced Oxidative Stress in L929 Fibroblasts and Evaluation of Cell Survival
2.6. Statistical Analysis
3. Results
3.1. Total Phenolic and Flavonoid Contents of UP Extracts
3.2. Antioxidant Activity
3.3. Cell Viability
3.4. H ₂ O ₂ -Induced Oxidative Stress and Cell Survival
4. Discussion
5. Conclusion

1. INTRODUCTION

Oxidative stress is a result of disturbance between production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidants defenses. Excessive ROS production causes oxidative damage to biomolecules such as proteins, lipids, and nucleic acids. Consequences of this process may cause cell dysfunction and altered behavior or even cell death [1].

Prevention of oxidative stress is mediated by antioxidants molecules. These substances delay, prevent, or remove the oxidative damage to a target molecule [2]. Endogenous antioxidants are classified as enzymatic and non-enzymatic. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidases are examples of enzymatic antioxidants which prevent formation of ROS [3, 4], while glutathione, ubiquinone, urate, and lipoic acid are non-enzymatic defenses [5].

Plant's non-enzymatic antioxidant systems have evolved efficiently and most of those molecules result from the plant secondary metabolism, being required for normal growth, development, and plant defense. However, plant metabolism is susceptible to biotic and abiotic stress factors such as high light intensity, heat, drought, anoxic conditions, and pathogen attacks that increase ROS production. As a result of stress conditions, plants are able to synthesize a broad range of antioxidant molecules [6–8]. Phenolic compounds are examples of secondary metabolites which exhibit increased contents in plant tissues under stress conditions [9].

The intake of polyphenols has been related to preventive medicine helping to decrease the risk of developing cancer, neurodegenerative and cardiovas-

cular diseases in human populations and animal's models [10–12]. Jaboticaba (*Plinia peruviana*, Poir. Govaerts) is a native fruit tree to Brazil and its fruits have been claimed to be a rich source of phenolic compounds such as anthocyanins, flavonoids, and ellagitannins [13] with a known antioxidant activity [14]. In this sense, this study aimed to determine the antioxidant and cytoprotective effects of jaboticaba fruit peel extracts, obtained through a high-pressure technique during different times, against H₂O₂-induced oxidative stress in murine L929 fibroblasts.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant Material Collection and Extraction

Fruits of *P. peruviana* were collected from a backyard format planting system during the harvest season (Spring, 2014) in Guaxupé, Minas Gerais, southeastern Brazil (21° 18' 19" S, 46° 42' 46" W, 829 m above sea level). The plant was authenticated by Dr. Marcos Sobral, and a voucher specimen (FLOR 55902) was preserved at the herbarium Flor (Department of Botany, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil).

The fruit peels of jaboticaba were previously sanitized with tap water, lyophilized, and powdered using an electric grinder. The dried and powdered biomass was added (1:10 w/v) to 50% ethanol solution (w/v, pH 3.6). The mixture was submitted to a home-made ultra-high pressure (7 to 10 kg/cm²) extractor at room temperature during different times as follows: 1 h (UP 1 h extract), 2 h (UP 2 h extract),

TABLE 1. Total phenolic and flavonoid contents (mg equivalents/g) of the UP hydroalcoholic extracts of jaboticaba peels measured at 1, 2, 3, and 4 h

	UP 1 h	UP 2 h	UP 3 h	UP 4 h
Phenolic content (mg gallic acid equivalent/g)	20.44 ± 0.95 a	17.85 ± 0.08 a	32.75 ± 0.79 b	14.1 ± 0.55 c
Flavonoid content (mg quercetin equivalent/g)	6.29 ± 0.07 a	5.13 ± 0 b	8.7 ± 0.16 c	3.84 ± 0.03 d

Note: Values are shown as mean ± SD (n = 3). Distinct lowercase letters indicate meaningful (p < 0.05) differences between the UP extracts in the same line.

3 h (UP 3 h extract), and 4 h (UP 4 h extract). At the end of each of the collection times, all extracts were recovered by filtration on cellulose membrane under vacuum.

2.2. Phytochemical Analysis

2.2.1. Total Phenolics Content

The total phenolic content of extracts was measured spectrophotometrically [15]. Briefly, extracts were diluted in 50% ethanol solution, pH 3.6 (1:10 v/v). Subsequently, 1 ml of each extract previously diluted was added to 5 ml 95% methanol solution. After this second dilution, a sample (1 ml) was added to 1 ml 95 % ethanol solution, 5 ml distilled water, and 0.5 ml Folin-Ciocalteu's reagent and incubated for 7 min. After incubation, 1 ml 5 % sodium carbonate solution (w/v) was added and kept in the darkness at room temperature for 1 h. The absorbance was measured at 725 nm, using a UV-Vis spectrophotometer (BEL LGS 53, BEL Engineering, Monza, Italy). The total phenolic compounds were quantified using a standard curve of gallic acid (10–100 µg/ml, y = 0,0076x, r² = 0.99). The results were expressed as mg gallic acid equivalents/g dry weight of jaboticaba extract.

2.2.2. Total Flavonoids Content

The total amount of flavonoids was determined based on the aluminum chloride colorimetric method [16]. The extracts were diluted (1:10 v/v) in 50 % ethanol (pH 3.6) and 0.5 ml of diluted extracts was added to 2.5 ml ethanol and 0.5 ml 2% aluminum chloride in methanol, following incubation for 1 h. The absorbance was measured at 420 nm. The quantification of total flavonoids was carried out using a

quercetin standard curve (10–200 µg/ml, y = 0,0089x, r² = 0.99). The results were expressed as mg quercetin equivalents/g dry weight of jaboticaba extract.

2.3. Antioxidant Activity (DPPH Assay)

The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay is a chemical method that measures the capacity of a compound to scavenge free radicals based on the decrease in absorbance during the reaction [17]. For measuring the antioxidant activity of extracts, a DPPH stock solution (3.16 mg DPPH/ml methanol) was prepared and further 1:100 diluted in 80% methanol (v/v). The absorbance of the DPPH solution should be around 0.5 and 0.6. Jaboticaba hydroalcoholic extracts were diluted in 50% ethanol (pH 3.6) at concentrations of 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, and 1 mg/ml (dry weight extract). Subsequently, extracts were added to DPPH methanolic solution at a ratio of 1:30 (v/v). The antioxidant activity of extracts was measured spectrophotometrically at 515 nm, after 30 min incubation in the dark, at room temperature. The percentage of inhibition of DPPH radical was calculated by the equation below:

Inhibition DPPH (%) = [(Abs DPPH/80% methanol solution - Abs UP extracts) ÷ (Abs DPPH/80% methanol solution)] × 100; where Abs denotes absorbance at 515 nm.

2.4. Cell Viability Assay Using L929 Fibroblasts

L929 mouse fibroblast cells were inoculated at a density of 5 × 10³ cells/well into a 96-well plate in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and incubated at 37°C, in a humidified 5% CO₂ atmosphere, overnight. After incubation, DMEM was re-

TABLE 2. Antioxidant activity of UP extracts determined by the DPPH assay

	UP 1 h (%)	Trolox Eq	UP 2 h (%)	Trolox Eq	UP 3 h (%)	Trolox Eq	UP 4 h (%)	Trolox Eq
0.001 mg/ml	6.63 ± 1.82	0.047	5.82 ± 0.94	0.041	11.23 ± 1.44	0.08	7.04 ± 0.33	0.05
	Aa		Aa		ABb		Aa	
0.01 mg/ml	8.23 ± 1.12	0.058	4.08 ± 0.58	0.029	8.42 ± 2.64	0.06	7.19 ± 1.35	0.051
	Ba		Ab		Aa		Aab	
0.05 mg/ml	17.68 ± 3.68	0.125	10.17 ± 2.61	0.072	14.64 ± 0.95	0.104	13.93 ± 2.2	0.099
	Ca		ABb		Bab		Bab	
0.1 mg/ml	25.14 ± 2.74	0.178	16.57 ± 5.72	0.117	22.18 ± 1.12	0.157	23 ± 0.68	0.163
	Da		Ba		Ca		Ca	
0.2 mg/ml	39.72 ± 2.51	0.282	32.93 ± 8.72	0.233	36.78 ± 1.62	0.261	34.4 ± 0.66	0.244
	Ea		Ca		Da		Da	
0.4 mg/ml	65.83 ± 1.47	0.467	52.69 ± 6.45	0.374	62.02 ± 1.48	0.44	58.36 ± 0.89	0.414
	Fa		Db		Ea		Eab	
0.8 mg/ml	89.45 ± 1.47	0.634	82.27 ± 2.9	0.583	86.74 ± 0.26	0.615	84.7 ± 0.24	0.6
	Ga		Eb		Fa		Fb	
1.0 mg/ml	93.51 ± 0.66	0.663	90.43 ± 0.28	0.641	90.86 ± 0.18	0.644	89.96 ± 0.06	0.638
	Ga		Fb		Gb		Gb	

Note: Values are shown as mean ± SD (n = 3). Trolox Eq, trolox equivalent (mM). Distinct capital letters indicate significant differences ($p < 0.05$) for the concentrations of the same extract. Distinct lowercase letters indicate meaningful ($p < 0.05$) differences between the extracts at the same concentrations.

placed by DMEM 10% FBS containing 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, and 1 mg/ml of each extract (dry weight), except in control where the culture medium was replaced by fresh DMEM. Cells were incubated for 24 h and 48 h, at 37°C, in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Afterwards, the culture medium was replaced by 100 µl of fresh DMEM along with 10 µl 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT solution, 5 mg/ml in phosphate-buffered saline, PBS) per well and incubated in the dark (3 h, 37°C, humidified 5% CO₂ atmosphere). Subsequently, 85 µl culture medium were removed and 50 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO) were added onto each well. After solubilization of the formazan crystals, the absorbance was determined with an ELISA plate reader at 540 nm. The percentage of cell viability was calculated and compared to control (100% viability).

2.5. H₂O₂-Induced Oxidative Stress in L929 Fibroblasts and Evaluation of Cell Survival

Hydrogen peroxide was used for induction of oxidative stress as described by Balekar et al. [18] and

Ponmsamy et al. [19]. A curve with H₂O₂ concentrations (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, and 1.0 mM) was built to determine the H₂O₂ dose which decreases cell viability by 80 % after 24 h of exposure through MTT assay. The chosen concentration was 1.0 mM H₂O₂. Subsequently, fibroblast L929 cells were inoculated (5×10^3 cells/well) into a 96-well plate containing DMEM supplemented with 10% FBS and incubated overnight at 37°C, in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After incubation, DMEM 10 % FBS containing 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, and 0.2 mg/ml of each extract (dry weight) was used to treat cells in different times as follows: (1) cells were treated for 24 h following by 1.0 mM H₂O₂ exposure for 3 h; (2) cells exposure concomitantly to extracts and 1.0 mM H₂O₂ for 24 h; and (3) 1.0 mM H₂O₂ exposure for 3 h following by cells treatment with each extract for 24 h. Evaluation of cell survival was performed using the MTT assay as described above.

2.6. Statistical Analysis

Data were collected and summarized, followed by univariate statistical analysis using the one-way

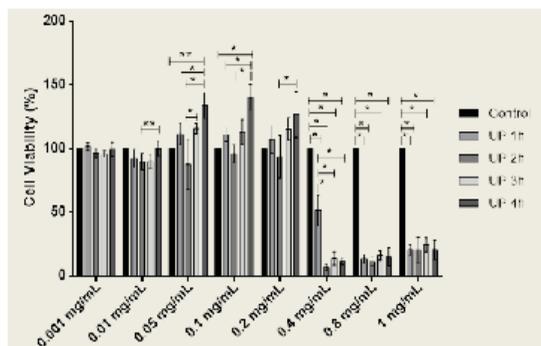


FIGURE 1. Percentage of L929 fibroblast cell survival following treatment with UP extracts after 24 h. Data are expressed as mean \pm SD (n = 6). *, p < 0.01; **, p < 0.05 vs control and different UP extracts at the same concentration.

ANOVA and Tukey's test. P values lower than 0.05 were considered to be statistically significant. The values were expressed as mean \pm SD or median as indicated in figures legends.

3. RESULTS

3.1. Total Phenolic and Flavonoid Contents of UP Extracts

UP 3 h extract showed the highest amount (p < 0.05) of total phenolic compounds, significantly differing from the following extraction, i.e., UP 4 h, which revealed the lower concentration (Table 1). Similarly, the recovery of flavonoids in the hydroalcoholic extracts showed to be highest (p < 0.05) after 3 h extraction, with lower amounts after UP 4 h (Table 1).

3.2. Antioxidant Activity

All the tested extracts presented inhibitory activity of radical DPPH being higher than 50% at concentration 0.4 mg/mL. Interestingly, at this concentration

UP 2 h extract showed significantly (p < 0.05) lower antioxidant activity than UP 1 h and UP 3 h extracts. DPPH scavenging rate increased in a dose-dependent manner until 1 mg/mL, where UP 1 h extract showed the best DPPH scavenging activity which was significantly higher than other extracts. Maximum radical inhibition at 1 mg/mL concentration of extracts was equivalent to about 0.6 mM of trolox, an antioxidant water-soluble analog of vitamin E (Table 2).

3.3. Cell Viability

After 24 h of exposure to UP 1 h, UP 3 h, and UP 4 h extracts at 0.05 and 0.1 mg/mL, an increased viability of L929 cells was observed, and UP 4 h extract significantly augmented that variable comparatively to control, UP 1 h, and UP 2 h treatments. Importantly, at higher concentrations, i.e., 0.4, 0.8, and 1 mg/mL, cells treated with all UP extracts showed decreased viability in a significant way in respect to control after 24 and 48 h of exposure (Figures 1 and 2). No significantly increased cell viability was detected after 48 h of exposure to the hydroalcoholic extracts of jaborcaba peels compared to control (Figure 2).

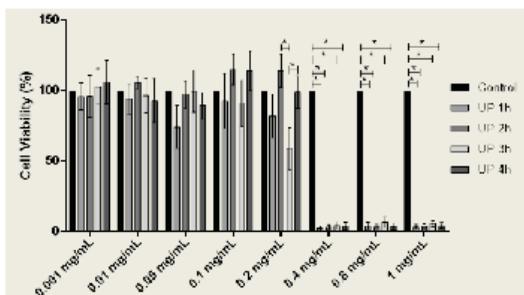


FIGURE 2. Percentage of survival of L929 fibroblast cells treated with UP extracts after 48 h. Data are expressed as a mean \pm SD (n = 9). *, $p < 0.01$ vs control and different UP extracts at the same concentration.

3.4. H₂O₂-Induced Oxidative Stress and Cell Survival

Cells exposed concomitantly to the hydroalcoholic extracts and H₂O₂, and cells exposed to extracts after H₂O₂-induced oxidative stress showed increased cell death. UP 3 h- and UP 4 h-treated cells presented significantly ($p < 0.05$) higher viability than control when exposed concomitantly and after H₂O₂, despite cell viability was lower than 20% (Figure 3). Preincubation with UP 1 h, UP 3 h, and UP 4 h hydroalcoholic extracts followed by H₂O₂ exposure led to significantly ($p < 0.05$) increased cell viability in comparison to control at 0.001 mg/ml concentration. At 0.01 mg/ml, UP 4 h extract increased ($p < 0.05$) L929 fibroblast viability when compared to control and other treatments. At 0.05 mg/ml, significantly increased cell viability was observed in UP 2 h, UP 3 h and UP 4 h when compared to control and UP 1 h extract. However, the highest cell viability was found at 0.1 mg/ml for all extracts which differed in a significant way from control.

4. DISCUSSION

Plant-derived phenolics are well-known as beneficial for human health due to their antioxidant activity.

These phytochemicals can act in different ways to protect cells from oxidative damage. The mechanisms of action include prevention of reactive species formation, scavenging radicals or repairing damaged target molecules [20].

The antioxidant activity of jaboticaba fruit peel is thought to be related to its content of phenolic compounds. However, these molecules are unstable and could easily suffer degradation. Therefore, some parameters such as temperature, exposure to O₂, and time of extraction should be monitored during extraction process to avoid loss of biological activity as a consequence of phenolic compound degradation [10]. In order to overcome such constraints, an alternative method to improve the recovery of phenolics from jaboticaba fruit peel was adopted, by grinding the biomass and extracting it under ultra-high pressure in the absence of O₂, at room temperature. A time series for collection of the extracts was set, with intervals of 1 h, over an experimental time of 4 h.

The sampling time for harvesting of the hydroalcoholic extracts showed to be relevant regarding the total amounts of phenolic and flavonoid compounds. Higher concentrations of those secondary metabolites were found in UP 3 h extract when compared with other extracts. On the other hand, longer extraction times, i.e., UP 4 h presented significantly lower contents of the target compounds. Taking into ac-

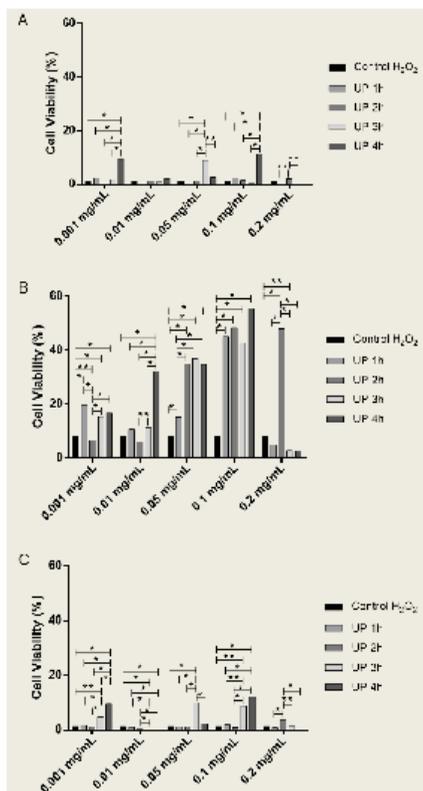


FIGURE 3. Viability (%) of L929 fibroblast cells treated with UP hydroalcoholic extracts after H₂O₂ exposure (A), before H₂O₂ exposure (B), and concomitant to H₂O₂ (C). *, p < 0.01 and **, p < 0.05 vs 1.0 mM H₂O₂ control and different UP extracts at the same concentration. Cell viability values ranged from 0 to 20% during treatments in A and C, and due to this variation data were expressed as median (n = 16).

count these findings, one could speculate that further extractions would afford even lower amounts due to the depletion of those secondary metabolites from the fruit peel biomass.

In a second series of experiments the scavenging properties of the UP extracts were tested *in vitro* by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. The scavenging of DPPH radical is mediated by an antioxidant compound through hydrogen atom donation or one electron transfer to the radical, forming a stable compound [21, 22]. Although the UP extracts revealed an interesting antioxidant activity, at higher concentrations they were harmful to L929 fibroblasts in culture. At concentrations of 0.4 mg/ml or above, UP extracts were cytotoxic to L929 cells after 24 and 48 h exposure. This effect could be explained by a possible pro-oxidant property exerted by high concentrations of antioxidants. Indeed, similarly to vitamin C, phenolics are capable of converting iron and copper ions into their reduction forms which react with hydrogen peroxide to produce the highly toxic hydroxyl radicals [23–25]. Factors that contribute to turning antioxidants into pro-oxidants include the concentrations of the antioxidants, nature of neighboring molecules [26], and availability of transition metals [24].

All UP extracts at concentrations between 0.001 and 0.2 mg/ml were investigated regarding their protective effect using an *in vitro* oxidative stress model. For that, L929 fibroblast cells were exposed to H₂O₂ for 3 h, and the UP extracts were added to the culture medium before or after the H₂O₂ exposure. In addition, cells were also concomitantly treated with UP extracts and H₂O₂ for 24 h. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress before and concomitant with the extracts was lethal for L929 cells. H₂O₂ is a small uncharged molecule that could diffuse through membrane cells easily [27]. This rapid transport to inside the cell could be responsible for the deleterious effect of H₂O₂ that acted faster than the cytoprotective phytochemicals added to the culture medium.

Extracts added before H₂O₂ exposure were effective in protecting L929 cells from death, mainly with the UP 4 h extract. Preincubation with UP extracts led to metabolic changes that resulted in cytoprotective effects against severe stress caused by H₂O₂. Phytochemicals can promote mild stress induction that elicits adaptive beneficial responses, thereby increasing protection against a further oxidative challenge. This process is known as hormesis [28–30]

and might corroborate to explain the results herein described.

Carvalho et al. [31] studied the antioxidant phenolic diterpenes carnosil acid (CA) and carnosol (CS) and observed that CS was able to protect cells against tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH)-induced death after phytochemical preincubation. Antioxidant defenses were measured and both CA and CS increased the levels of the reduced form of glutathione (GSH), heme oxygenase-1, and glutamate cysteine ligase modulatory subunit by changing cell redox stress. The authors found that disturbance of cellular redox state was not promoted by induction of ROS. Treatment with CA and CS increased transcription activity of Nr1 α , a factor responsible for transcription of genes encoding stress-responsive and cytoprotective enzymes and related proteins.

Although UP extracts at 0.2 mg/ml maintained the cell viability after 24 and 48 h of exposure, preincubation with this concentration followed by H₂O₂ treatment showed to be cytotoxic for UP 1 h, 3 h, and 4 h extracts. It has been hypothesized that the subsequent incubation with H₂O₂ shall potentiate possible pro-oxidant effects caused by the UP extracts as discussed above.

Evaluation of the effectiveness of UP extracts regarding their antioxidant activity was performed *in vitro* using the L929 murine fibroblast cell line. Fibroblasts are skin cells and play an important role during wound healing process. Secretion of ROS is mediated by neutrophils and monocytes during inflammation phase in normal wound healing and excessive production of these substances could impair proliferation and migration of dermal fibroblasts during healing [27]. Taking into account the results herein described, it seems plausible that jaboticaba peel hydroalcoholic extract is an important source of bioactive polyphenolic compounds able to inhibit the oxidative stress caused by H₂O₂ to fibroblasts. This way, the UP extract might be thought as an interesting candidate to study with pre-clinical assays regarding its wound healing effect.

5. CONCLUSION

The extraction time of 3 h allowed the better yield of phenolic and flavonoid compounds from jaboticaba fruit peels. Even though UP 4 h extract presented the lowest phenolic and flavonoid contents compared to

ROS

RESEARCH ARTICLES

other extracts, it increased the cell viability when compared to control. All the hydroalcoholic extracts studied afforded cytoprotective effect to L929 fibroblasts against H₂O₂, revealing jaboticaba fruit peels as a promise source of bioactive compounds with potential biotechnological applications in promoting human health.

REFERENCES

- Li YR, Jia Z, Trush MA. Defining ROS in biology and medicine. *Reactive Oxygen Species* 2016; 1:9–21. doi: 10.20455/ros.2016.803.
- Halliwel B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 5):1147–50. doi: 10.1042/BST0351147.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012; 5(1):9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem* 2015; 97:55–74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
- Schafer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res* 2008; 58(2):165–71. doi: 10.1016/j.plrs.2008.06.004.
- Moller IM, Jensen PE, Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2007; 58:459–81. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946.
- Shao HB, Chu LY, Shao MA, Jaleel CA, Mi HM. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C R Biol* 2008; 331(6):433–41. doi: 10.1016/j.crv.2008.03.011.
- Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ* 2012; 35(2):259–70. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x.
- Saltveit ME. Wound-induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biol Tech* 2000; 21:61–9.
- Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Skerget M, Knez Z, Bren U. Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules* 2016; 21(7). doi: 10.3390/molecules21070901.
- Cruz AB, Pitz HD, Veber B, Bini LA, Maraschin M, Zeni AL. Assessment of bioactive metabolites and hypolipidemic effect of polyphenolic-rich red cabbage extract. *Pharm Biol* 2016; 54(12):3033–9. doi: 10.1080/13880209.2016.1200633.
- Losada-Barreiro S, Bravo-Diaz C. Free radicals and polyphenols: the redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur J Med Chem* 2017; 133:379–402. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.061.
- Wu SB, Dastmalchi K, Long C, Kennelly EJ. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. *J Agric Food Chem* 2012; 60(30):7513–25. doi: 10.1021/jf301888y.
- Xu L, Choi TH, Kim S, Kim SH, Chang HW, Choe M, et al. Anthocyanins from black soybean seed coat enhance wound healing. *Ann Plast Surg* 2013; 71(4):415–20. doi: 10.1097/SAP.0b013e31824ca62b.
- Randhir R, Preethi S, Kalidas S. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochem* 2002; 37:1247–56.
- Petry RD, Ortega GG, Silva WB. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride: flavonoid complex. *Pharmazie* 2001; 56(6):465–70.
- Kim YK, Guo Q, Packer L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology* 2002; 172(2):149–56.
- Balekar N, Katkam NG, Nakpheng T, Jehtne K, Srichana T. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *J Ethnopharmacol* 2012; 141(3):817–24. doi: 10.1016/j.jep.2012.03.019.
- Ponnusamy Y, Chear NJ, Ramanathan S, Lai CS. Polyphenols rich fraction of *Dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation in vitro. *J Ethnopharmacol* 2015; 168:305–14. doi: 10.1016/j.jep.2015.03.062.
- Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects: a review. *J Funct Foods* 2015; 18:820–97.
- Karadag A, Ozcelik B, Samer S. Review of

- methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal Method* 2009; 2:41–60.
22. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005; 53(10):4290–302. doi: 10.1021/jf0502698.
 23. Decker EA. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr Rev* 1997; 55(11 Pt 1):396–8.
 24. Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(3):287–303. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034.
 25. Duarte TL, Lunec J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res* 2005; 39(7):671–86. doi: 10.1080/10715760500104025.
 26. Villanueva C, Kross RD. Antioxidant-induced stress. *Int J Mol Sci* 2012; 13(2):2091–109. doi: 10.3390/ijms13022091.
 27. Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, 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. *Int Wound J* 2017; 14(1):89–96. doi: 10.1111/iwj.12557.
 28. Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, et al. Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 222(1):122–8. doi: 10.1016/j.taap.2007.02.015.
 29. Mattson MP. Hormesis defined. *Ageing Res Rev* 2008; 7(1):1–7. doi: 10.1016/j.arr.2007.08.007.
 30. Lima CF, Pereira-Wilson C, Rattan SI. Curcumin induces heme oxygenase-1 in normal human skin fibroblasts through redox signaling: relevance for anti-aging intervention. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55(3):430–42. doi: 10.1002/mnfr.201000221.
 31. Carvalho AC, Gomes AC, Pereira-Wilson C, Lima CF. Redox-dependent induction of antioxidant defenses by phenolic diterpenes confers stress tolerance in normal human skin fibroblasts: Insights on replicative senescence. *Free Radic Biol Med* 2015; 83:262–72. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.022.

APÊNDICE B – *IN VITRO* EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND WOUND HEALING PROPERTIES OF JABOTICABA (*Plinia peruviana*) FRUIT PEEL HYDROALCOHOLIC EXTRACT

Hindawi Publishing Corporation
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2016, Article ID 3403586, 6 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/3403586>



Research Article

In Vitro Evaluation of the Antioxidant Activity and Wound Healing Properties of Jaboticaba (*Plinia peruviana*) Fruit Peel Hydroalcoholic Extract

Heloisa da S. Pitz, Aline Pereira, Mayara B. Blasius,
Ana Paula L. Voytena, Regina C. L. Affonso, Simone Fanan, Adriana C. D. Trevisan,
Rosa M. Ribeiro-do-Valle, and Marcelo Maraschin

*Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina,
1346 Admar Gonzaga Road, 88048-000 Florianópolis, SC, Brazil*

Correspondence should be addressed to Heloisa da S. Pitz; heloisapitz@gmail.com

Received 17 June 2016; Accepted 25 July 2016

Academic Editor: Pavel Pospisil

Copyright © 2016 Heloisa da S. Pitz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Jaboticaba is a fruit from a native tree to Brazil, *Plinia peruviana*. Jaboticaba peels are an important source of antioxidant molecules such as phenolic compounds. This study aimed to evaluate *in vitro* the activity of a hydroalcoholic extract of jaboticaba fruit peel (HEJFP) in wound healing processes and antioxidant activity in murine fibroblasts (L929 cell line). HEJFP concentrations (0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, and 200 µg/ml) were tested in MTT assay and cell proliferation was verified at 100 µg/ml after 24 h and at 25, 50, and 100 µg/ml after 48 h of extract exposure. Evaluation of antioxidant activity was performed at 0.5, 5, 25, 50, and 100 µg/ml HEJFP concentrations. Cell treatment with HEJFP at 25, 50, and 100 µg/ml for 24 h followed by H₂O₂ exposure for 3 h showed a strong cytoprotective effect. *In vitro* scratch wound healing assay indicated that none of tested HEJFP concentrations (0.5, 5, 25, 50, and 100 µg/ml) were capable of increasing migration rate after 12 h of incubation. These results demonstrate a positive effect of HEJFP on the wound healing process on L929 fibroblasts cell line, probably due to the antioxidant activity exhibited by phytochemicals in the extract.

1. Introduction

Wound healing is a process divided into three interactive and overlapping phases classified as inflammation, tissue formation, and tissue remodeling [1]. During inflammation, neutrophils and monocytes invade the injury tissue and start to secrete proteolytic enzymes, proinflammatory cytokines, and growth factors. Besides, these cells also secrete reactive oxygen species (ROS), important molecules that defend the body against bacteria and microorganism invasion [2].

The next phase known as tissue formation is characterized by proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes from the wound edge to the wound bed [3]. Angiogenesis is triggered and leads to the formation of granulation tissue, which is important to support the nutrients and oxygen supply in injured tissue [4–6]. In this tissue, fibroblasts become myofibroblasts which synthesize and deposit

extracellular matrix (ECM) compounds, especially collagen. Besides, these cells are responsible for wound contraction and maturation of the granulation tissue [7].

At remodeling phase, there is a reduction on cellularity due to the apoptosis of myofibroblasts, endothelial cells, and inflammatory cells. The synthesis of ECM is reduced and ECM's components are modified as the matrix is remodeled [8].

Impaired wound healing is a problem that may be caused by uncontrolled inflammatory and immune responses, microbial infection, and excessive ROS production [9]. Excessive amounts of ROS may modify and/or degrade ECM proteins and damage dermal fibroblasts and keratinocytes functions. Besides, ROS-mediated transcription causes the maintained proinflammatory cytokines secretion and induction of matrix metalloproteases [10].

Jaboticaba is a fruit from a native tree to Brazil, that is, *Plinia peruviana*. Studies have shown important biological properties of anthocyanins, mainly those related to anti-inflammatory activity and antioxidative stress [11]. Jaboticaba fruit peels are the main source of anthocyanins in the fruit and it has been used in traditional medicine to treat diarrhea, skin irritation, hemoptysis, and asthma [12–14]. This study aimed to evaluate the antioxidant activity of a HEJFP and its role in wound healing processes as migration and proliferation of murine fibroblasts (L929 cell line).

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material Collection and Extraction. Fruits of *P. peruviana* were collected from a backyard format planting system during the harvest season (spring, 2014) in Guaxupé, Minas Gerais, Brazil. The plant was authenticated by Dr. Marcos Sobral and a voucher specimen (FLOR 55902) was preserved at FLOR herbarium (Department of Botany, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, southern Brazil).

The fruit peels of jaboticaba were hyophilized and powdered by an electric grinder. The dried and powdered biomass was added to 50% ethanol solution (v/v), pH 3.6 (1:10 w/v). The mixture was microwaved (three pulses of five seconds with 60 seconds of interval between each of the pulses) to extract the compounds of interest. The HEJFP was recovered by filtration on cellulose membranes under vacuum.

2.2. Determination of Total Phenolic Content. The total phenolic content of HEJFP was measured spectrophotometrically [15]. For that, HEJFP was diluted in 50% ethanol solution, pH 3.6 (1:10 v/v). Subsequently, 1 mL of HEJFP previously diluted was added to 5 mL 95% methanol solution. After this second dilution, sample (1 mL) was added to 1 mL 95% ethanol solution, 5 mL distilled water, and 0.5 mL Folin-Ciocalteu's reagent and incubated for 7 min.

After incubation, 1 mL 5% sodium carbonate solution was added and kept in the darkness at room temperature for 1 h. A blank solution was prepared as described above replacing the sample by 50% of ethanol solution, pH 3.6. The absorbance was measured at 725 nm, using a UV-Vis spectrophotometer (BEL LGS 53, BEL Engineering, Monza, Italy).

The total phenolic compounds were quantified using a standard curve of gallic acid. The results were expressed as mg gallic acid equivalents/g dry weight of jaboticaba biomass.

2.3. Determination of the Total Flavonoid Content. The determination of total flavonoids was based on aluminum chloride colorimetric method [16].

Previously, HEJFP was diluted in 50% ethanol solution, pH 3.6 (1:10 v/v). 0.5 mL of diluted HEJFP was added to 2.5 mL ethanol and 0.5 mL 2% aluminum chloride diluted in methanol and incubated for 1 h. A blank solution was prepared as described above replacing the sample by 50% of ethanol solution, pH 3.6. The absorbance was measured at 420 nm in a UV-Vis spectrophotometer (BEL LGS 53, BEL Engineering, Monza, Italy). The quantification of total flavonoids was carried out using a quercetin standard curve.

The results were expressed as mg quercetin equivalents/g dry weight of jaboticaba biomass.

2.4. Antioxidant Activity (DPPH Assay). The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay is a chemical method that measures the capacity of a compound to scavenge free radicals based on the decrease in absorbance during the reaction [17]. A stock solution of 0.0079 g of DPPH was diluted in 2.5 mL methanol. This solution was further diluted in a concentration of 1:100 (v/v) in 80% methanol (v/v). The absorbance of this DPPH solution should be around 0.5 and 0.6. The HEJFP, previously diluted in 50% ethanol, pH 3.6, at 1:100 (v/v), was added to DPPH/80% methanol solution (1:30 v/v). The capacity of the HEJFP to inhibit DPPH radicals was measured spectrophotometrically at 515 nm, after incubation for 5, 10, 20, 30, 40, and 50 min in the dark, at room temperature. The same procedure described above was used to test the 50% ethanol, pH 3.6, solution to ensure that the solvent was not reacting with DPPH/80% methanol solution. The percentage of inhibition of DPPH radicals was calculated by the following formula (Abs. = absorbance):

$$\text{inhibition DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs. DPPH/80\% methanol solution} - \text{Abs. HEJFP}}{\text{Abs. DPPH/80\% methanol solution}} \times 100 \quad (1)$$

2.5. Cell Proliferation and Viability Assay Using L929 Fibroblast. L929 mouse fibroblast cells were seeded at a density of 5×10^3 cells/well into a 96-well plate in DMEM culture medium supplemented with 10% FBS and incubated at 37°C, in a humidified 5% CO₂ atmosphere overnight. After incubation, DMEM was replaced by DMEM 10% FBS containing 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, and 200 µg/mL (dry weight) of HEJFP, except in control, where the culture medium was replaced by fresh DMEM. Cells were incubated for 24 h and 48 h, at 37°C, in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Afterwards, the culture medium was replaced by 100 µL of fresh DMEM along with 10 µL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution (5 mg/mL in PBS) per well and incubated in the dark, for 3 h, at 37°C, in a humidified 5% CO₂ atmosphere. A negative control without cells with 100 µL of DMEM and 10 µL of MTT solution was required. Subsequently, 85 µL of culture medium was removed and 50 µL of DMSO was added onto each well and incubated for more 10 min, at 37°C, in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After homogenizing formazan crystals, the absorbance at 540 nm was determined by an ELISA plate reader. The percentage of cell proliferation/viability was calculated and compared to control (100% of viability).

2.6. Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in L929 Fibroblast Cells and Evaluation of Cell Survival. Hydrogen peroxide was used for induction of oxidative stress as described by Balekar et al. [18] and Ponnusamy et al. [19]. The L929 fibroblast cells were seeded at a density of 5×10^3 cells/well into a 96-well plate in DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37°C, in a humidified 5% CO₂

atmosphere overnight. A curve with H_2O_2 concentrations (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, and 1.0 mM) was built to determine H_2O_2 dose which decreases cell viability by 80% after 24 h of exposure using MTT assay. The chosen concentration was 1.0 mM of H_2O_2 . Subsequently, L929 fibroblast cells were seeded at a density of 5×10^3 cells/well into a 96-well plate containing DMEM culture medium supplemented with 10% FBS and incubated overnight at 37°C, in a humidified 5% CO_2 atmosphere. After incubation, DMEM with 10% FBS containing 0.5, 5, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (dry weight) of HEJFP was used to treat cells in different times as follows: (1) cells were treated for 24 h followed by 1.0 mM of H_2O_2 exposure for 3 h, (2) cells were exposed concomitantly to HEJFP and 1.0 mM of H_2O_2 for 24 h, and (3) cells were exposed to 1.0 mM of H_2O_2 for 3 h followed by cells treatment with HEJFP for 24 h. Evaluation of cell survival was performed using MTT assay as described above.

2.7. Scratch Assay. The stimulatory effect of HEJFP on migration of L929 cells was determined as described by Balekar et al. [18]. The L929 fibroblast cells were seeded at a density

of 5×10^5 cells/well into a 24-well plate containing DMEM culture medium supplemented with 10% FBS and incubated overnight at 37°C, in a humidified 5% CO_2 atmosphere. After incubation, DMEM was completely removed and the adherent cell layer was scratched with a sterile yellow pipette tip. Cellular debris was removed by washing off with phosphate buffer saline (PBS). The cells were treated with DMEM with 10% FBS containing 0.5, 5, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (dry weight) of HEJFP. Controls received only fresh DMEM. To avoid proliferation of cells, mitomycin C (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added in each well along with control and HEJFP-treated cells; this way only migration was evaluated. The cells were incubated (at 37°C in humidified 5% CO_2 atmosphere for 12 h) and then the recording of images of the scratch area was carried out in two different points, using a built-in camera in the microscope (40x magnification) at 0 h (just after scratching cells) and at 12 h after incubation with HEJFP and control. Data were analyzed with ImageJ 1.42q imaging software (National Institutes for Health, US) in order to determine the width of the scratch and thus to calculate the rate of migration of cells by the following formula:

$$\text{migration rate (\%)} = \frac{\text{distance within scratch (0 h)} - \text{distance within scratch (12 h)}}{\text{distance within scratch (0 h)}} \times 100. \quad (2)$$

2.8. Statistical Analysis. Data were collected and summarized, followed by statistical analysis using one-way ANOVA and Tukey's test. *P* values lower than 0.05 were considered to be statistically significant. The values were expressed as mean \pm SD or median as indicated in figures' captions.

3. Results

3.1. Total Phenolic and Flavonoid Contents of the Hydroalcoholic Extract. The total phenol and flavonoid contents of HEJFP were 92.2 ± 9.75 mg gallic acid equivalent/g and 6.43 ± 0.49 mg quercetin equivalent/g, respectively.

3.2. Antioxidant Activity. DPPH radical scavenging of HEJFP was measured in different times to determine the peak of antioxidant capacity. After 5 min of incubation, HEJFP inhibited 83.6% of DPPH radicals, showing an excellent antioxidant activity in few minutes of reaction. At 30 min of incubation, 91% scavenging activity was achieved and it remained until 50 minutes of reaction (Table 1).

3.3. Cell Proliferation and Viability. The effect of HEJFP on both cell proliferation and viability was evaluated in L929 murine fibroblasts cell line in different concentrations after 24 h and 48 h, using MTT assay.

HEJFP was able to promote cell proliferation at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 24 h and at 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 48 h. The concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was shown to be cytotoxic in both times of exposure, decreasing significantly cell viability. For the other concentrations assayed, the cell viability was higher than 80% (Figure 1).

3.4. Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress and Cell Survival. L929 fibroblast cells were treated with 1.0 mM H_2O_2 as a model study of oxidative stress and resulted in decrease of cell viability by 90% after 24 h of exposure. The antioxidant potential of the HEJFP was tested before and after H_2O_2 exposure for 3 h and concomitantly with H_2O_2 for 24 h. The HEJFP was not effective in protecting cells against oxidative stress before or concomitantly with exposure to H_2O_2 , resulting in low rate of cell survival. However, when cells were first treated with HEJFP for 24 h, followed by H_2O_2 exposure for 3 h, the tested concentrations of 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ protected the cells against adverse effects caused by H_2O_2 -induced oxidative stress and maintained the cell viability (Figure 2).

3.5. Scratch Assay. L929 murine fibroblasts cell line was tested through the scratch assay to determine the capacity of these cells to migrate under HEJFP stimulus (Figure 3). L929 cells have a fast migration rate; then the time to evaluate the cell migration was determined as 12 h upon exposure to HEJFP. At 24 h, scratch is almost closed, making it difficult to analyze images.

Although concentrations of 0.5 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ increased the cell migration rate after 12 h, the effect was not significant when compared to control (Table 2).

4. Discussion

Plant extracts can be efficient in helping the wound healing process if they contain phytochemicals with antimicrobial and antioxidant activities and free radical scavengers and

TABLE 1: Antioxidant activity of HEJFP determined by the DPPH assay.

Incubation time (min)	% inhibition of DPPH radical
5	83.6 ± 1.83
10	88.09 ± 1.52
20	90.18 ± 1.02
30	91.01 ± 0.42
40	91.36 ± 1.01
50	91.88 ± 1.28

Values are mean ± SD ($n = 3$).

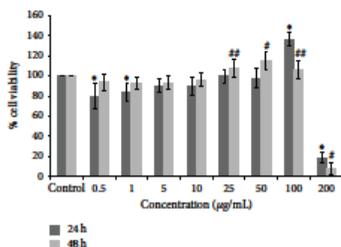


FIGURE 1: Percentage of survival of L929 fibroblast cells treated with HEJFP after 24 h and 48 h. Data are expressed as a mean ± SD ($n = 18$). * indicates $P < 0.01$ against control for 24 h; # indicates $P < 0.01$ and ## indicates $P < 0.05$ against control for 48 h.

TABLE 2: Scratch length (μm) and cell migration rate (%) of L929 murine fibroblasts treated with HEJFP determined by the scratch assay.

	Length within the scratch (μm)	% migration rate
Time 0	859.97 ± 113.9	0
Control	246.73 ± 62.84	71.31 ± 7.3
0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	157.56 ± 53.58	81.68 ± 6.23
5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	261.91 ± 99.32	69.54 ± 11.55
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	263.36 ± 73.4	71.42 ± 8.53
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	245.79 ± 138.65	69.37 ± 16.12
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	183.31 ± 91.15	78.57 ± 10.6

Values are mean ± SD ($n = 8$).

active compounds that enhance mitogenic activity, angiogenesis, collagen production, and DNA synthesis [20].

Jaboticaba fruit peel has a promising potential as a wound healing enhancer due to its biomass rich in phenolic compounds. Indeed, those secondary metabolites have a well-known antioxidant activity that prevents tissue damage and stimulates wound healing [11, 21].

The evaluation of the effectiveness of HEJFP in wound healing process was performed *in vitro* using L929 murine

fibroblasts cell line. Nowadays, cell culture is a popular and effective method to test the sensitivity of cells to selected groups present in the microenvironment. Fibroblasts cell cultures have been proposed as a method for testing wound healing activity *in vitro* [22].

Hydrogen peroxide-induced oxidative stress is an alternative to evaluate extract's antioxidant activity in cells. H_2O_2 is an important molecule in wound healing process, the effect of which shall be under control of a molecular antioxidant apparatus such as SOD, GPx, and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [23]. A cytoprotective effect of HEJFP was detected when oxidative stress was induced to cells after the treatment with the extract. In this sense, a plausible assumption takes into account the fact that the protective effect of the extract could be related to the antioxidant activity thereof, corroborated by the results obtained through DPPH assay.

Xu et al. [11] also found a protective effect against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in keratinocytes and fibroblasts of black soybean seed coat extract. The authors assigned this effect to the antioxidant activity of anthocyanins, metabolites that belong to phenolic group and are found in abundance in jaboticaba fruit peels.

Cell proliferation and migration are two extremely important features during the tissue formation phase in the wound healing. Scratch assay is a form to mimic a wound *in vitro* and evaluate the cell migration rate. Once the cell monolayer is disrupted, the loss of cell-cell interaction results in increasing concentration of growth factors and cytokines at the wound edge, initiating migration and proliferation of cells [24]. Interestingly, although the HEJFP was not able to increase cell migration rate, the extracts at 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ promoted fibroblasts proliferation. This mitogenic effect is a positive event for wound healing process because fibroblasts are important cells involved in wound contraction and ECM production [18].

5. Conclusion

HEJFP has been shown to be *in vitro* a potential plant extract, enhancing the wound healing process. The cytoprotective effect of HEJFP in fibroblasts against hydrogen peroxide-induced oxidative stress can be assigned to its phenolic compounds, which have been proven to be strong antioxidants. Besides, HEJFP induced mitogenic activity of fibroblasts, an important feature in the wound healing process. Further investigations are necessary to isolate and identify the compounds responsible for these activities, as previous findings refer to the ellagic acid as a major compound in the HEJFP (unpublished data). Besides, *in vitro* studies measuring antioxidant enzymes will help understand the mechanisms underlying the effects described herein for the wound healing process.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

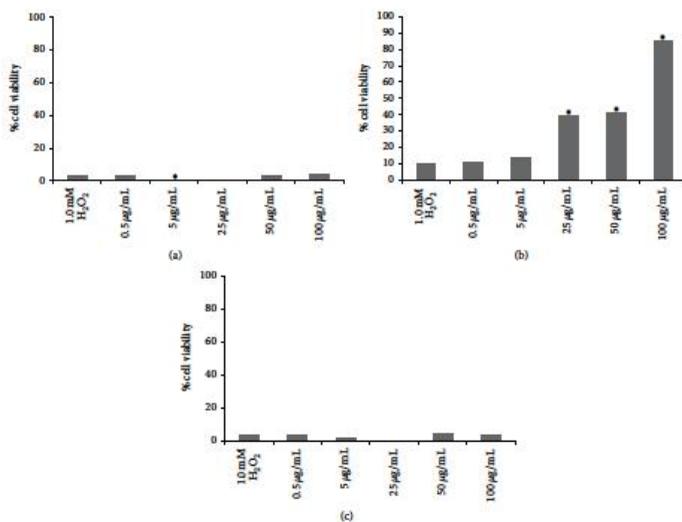


FIGURE 2: Viability (%) of cells treated with HEJFP after H₂O₂ exposure (a) and before H₂O₂ exposure (b) and concomitantly with H₂O₂ (c). Data are expressed as a median ($n = 16$). * indicates $P < 0.01$ against 1.0 mM H₂O₂ control.

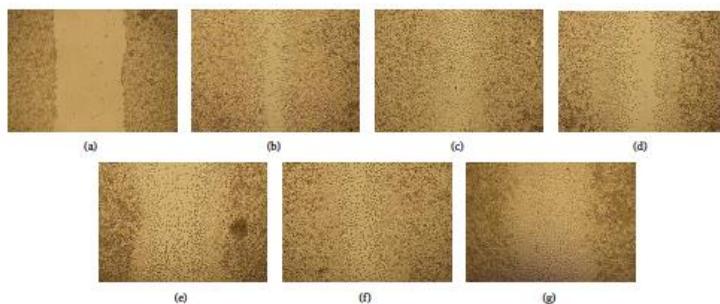


FIGURE 3: Microscopy images of 1929 fibroblast cells migration after scratch ((a)—time 0) and after 12 h of HEJFP treatment. (b) Control, (c) 0.5 µg/mL, (d) 5 µg/mL, (e) 25 µg/mL, (f) 50 µg/mL, and (g) 100 µg/mL.

References

- [1] A. J. Singer and R. A. F. Clark, "Cutaneous wound healing," *New England Journal of Medicine*, vol. 341, no. 10, pp. 738–746, 1999.
- [2] R. A. F. Clark, "Wound repair: overview and general considerations," in *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, pp. 3–50, Plenum Press, New York, NY, USA, 1996.
- [3] D. Neagos, V. Mitran, G. Chiracu et al., "Skin wound healing in a free floating fibroblast populated collagen lattice model," *Romanian Journal of Biophysics*, vol. 16, no. 3, pp. 157–168, 2006.
- [4] C. Dunnill, T. Patton, J. Brennan 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*, vol. 12, no. 6, pp. 1–8, 2015.
- [5] P. Martin, "Wound healing—aiming for perfect skin regeneration," *Science*, vol. 276, no. 5309, pp. 75–81, 1997.
- [6] G. C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, and M. T. Longaker, "Wound repair and regeneration," *Nature*, vol. 453, no. 7193, pp. 314–321, 2008.
- [7] B. Hinz and G. Gabbiani, "Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 90, no. 6, pp. 993–1002, 2003.
- [8] A. Desmoulière, M. Redard, I. Darby, and G. Gabbiani, "Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar," *The American Journal of Pathology*, vol. 146, no. 1, pp. 56–66, 1995.
- [9] M. Gangwar, M. K. Gautam, S. Ghildiyal, G. Nath, and R. K. Goel, "*Mallotus philippinensis* Muell. Arg fruit glandular hairs extract promotes wound healing on different wound model in rats," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 15, article 123, 2015.
- [10] R. Moseley, J. E. Stewart, P. Stephens, R. J. Waddington, and D. W. Thomas, "Extracellular matrix metabolites as potential biomarkers of disease activity in wound fluid: lessons learned from other inflammatory diseases?" *British Journal of Dermatology*, vol. 150, no. 3, pp. 401–413, 2004.
- [11] L. Xu, T. H. Choi, S. Kim et al., "Anthocyanins from black soybean seed coat enhance wound healing," *Annals of Plastic Surgery*, vol. 71, no. 4, pp. 415–420, 2013.
- [12] J. Morton, *Fruits of Warm Climates*, Julia Morton, Miami, Fla, USA, 1987.
- [13] H. Lorenzi, *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*, Instituto Plantarum, Nova Odessa, Brazil, 2000.
- [14] A. M. V. Cruz and M. A. C. Kaplan, "Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil," *Floresta Ambiente*, vol. 11, no. 1, pp. 47–52, 2004.
- [15] R. Randhir, P. Shetty, and K. Shetty, "L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors," *Process Biochemistry*, vol. 37, no. 11, pp. 1247–1256, 2002.
- [16] R. D. Petry, G. G. González Ortega, and W. B. Silva, "Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride–flavonoid complex," *Pharmazie*, vol. 56, no. 6, pp. 465–470, 2001.
- [17] Y. K. Kim, Q. Guo, and L. Packer, "Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts," *Toxicology*, vol. 172, no. 2, pp. 149–156, 2002.
- [18] N. Balekar, N. G. Katkam, T. Naskheng, K. Jehtae, and T. Srichana, "Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 141, no. 3, pp. 817–824, 2012.
- [19] Y. Ponnusamy, N. J.-Y. Chear, S. Ramanathan, and C.-S. Lai, "Polyphenols rich fraction of *Dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation *in vitro*," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 168, pp. 305–314, 2015.
- [20] P. K. Ghosh and A. Gaba, "Phyto-extracts in wound healing," *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 16, no. 5, pp. 760–820, 2013.
- [21] A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Rémésy, and I. Jiménez, "Dietary polyphenols and the prevention of diseases," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 45, no. 4, pp. 287–306, 2005.
- [22] Y. Abe, K. Inagaki, A. Fujiwara, and K. Kuriyama, "Wound healing acceleration of a novel transforming growth factor- β inducer, SEK-1005," *European Journal of Pharmacology*, vol. 408, no. 2, pp. 213–218, 2000.
- [23] H. Steiling, B. Munz, S. Werner, and M. Brauchle, "Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair," *Experimental Cell Research*, vol. 247, no. 2, pp. 484–494, 1999.
- [24] C.-C. Liang, A. Y. Park, and J.-L. Guan, "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*," *Nature Protocols*, vol. 2, no. 2, pp. 329–333, 2007.

ANEXO A – CERTIFICADO EMITIDO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise do potencial anti-inflamatório e antioxidante durante o processo cicatricial do extrato hidroalcoólico proveniente da casca de Jaboticaba (*Plinia peruviana*)", protocolada sob o CEUA nº 3252200417, sob a responsabilidade de **Marcelo Maraschin** e equipe; *Daniela Sousa Coelho; Heloisa da Silva Pitz* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 04/08/2017.

We certify that the proposal "Anti-inflammatory and antioxidant activity of Jaboticaba (*Plinia peruviana*) fruit peel hydroalcoholic extract during wound healing process", utilizing 198 Heterogenics mice (males or females), protocol number CEUA 3252200417, under the responsibility of **Marcelo Maraschin** and team; *Daniela Sousa Coelho; Heloisa da Silva Pitz* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 08/04/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 08/2017 a 12/2017

Área: **Fitotecnia**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos ou Fêmeas**

idade: **6 a 8 semanas**

N: **198**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 35 g**

Resumo: Os polifenóis são metabólitos vegetais secundários com reconhecida atividade antioxidante e anti-inflamatória. Dentre a vasta diversidade de substâncias que compõem este grupo, destacam-se as antocianinas, pigmentos naturalmente encontrados em plantas que conferem a coloração vermelha, azul ou roxa a uma variedade de frutos e folhas. Estes compostos possuem atividades biológicas semelhantes àquelas descritas para os polifenóis. Dentre a flora brasileira existem muitas espécies vegetais ricas em antocianinas que possuem pouco ou nenhum estudo que avaliem o efeito dessas substâncias. Exemplo disto são os frutos da espécie *Plinia peruviana* (jaboticaba), potencialmente ricos nesta classe de compostos bioativos. O interesse em avaliar o uso de extratos de plantas na cicatrização de feridas cresceu nas duas últimas décadas. Dentre os efeitos listados para se considerar um extrato vegetal potencialmente ativo na promoção da cicatrização de feridas estão: atividade antimicrobiana, antioxidante, efeito mitogênico e angiogênico, estímulo à produção de colágeno e síntese de DNA (Ghosh e Gaba, 2013). Neste contexto, extratos ricos em antocianinas da casca dos frutos de jaboticaba (*P. peruviana*) parecem potenciais indutores à cicatrização de feridas. O intuito do presente trabalho é avaliar a atividade do extrato hidroalcoólico extraído da casca de frutos de *Plinia peruviana* (jaboticaba) durante o processo de cicatrização de feridas avaliando em modelos de cicatrização in vivo e in vitro parâmetros inflamatórios e antioxidantes através da mensuração da liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias assim como a atividade de enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica e a velocidade de fechamento das lesões.

Local do experimento: Todos os procedimentos realizados com os animais serão feitos no Laboratório Neonatal Experimental (Biotério Setorial).

Florianópolis, 08 de agosto de 2017

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina