



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DHARA LEITE LOPES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DE COMPOSTOS
NATURAIS NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL**

Feira de Santana, BA

2023

DHARA LEITE LOPES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DE COMPOSTOS
NATURAIS NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo José Lima Juiz

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Cristiane Flora Villarreal

Feira de Santana, BA

2023

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

Lopes, Dhara Leite

L851a Avaliação *in vitro* do potencial de compostos naturais no processo de reparo tecidual/ Dhara Leite Lopes. - 2023.
98f.: il.

Orientador: Paulo José Lima Juiz
Coorientadora: Cristiane Flora Vilarreal

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2023.

1. Reparo tecidual. 2. Fibroblasto. 3. Scratch. 4. Produtos naturais.
I. Juiz, Paulo José Lima, orient. II. Vilarreal, Cristiane Flora, coorient.
III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

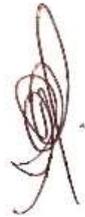
CDU: 616.5

BANCA EXAMINADORA

Sandra Assis

Dra. Sandra Aparecida de Assis Rodowski

(Universidade Estadual de Feira de Santana)



Dra. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

(Universidade Federal da Bahia)

Paulo José Lima Juiz

Dra. Paulo José Lima Juiz

(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)

Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA

2023

Para minha amada família, em nome de Sônia, Joberto,
Gilberto e Gabriel,

Vocês são minha fonte de inspiração, apoio e motivação.
Sempre que enfrento desafios, sei que posso contar com
vocês para me ajudar a superá-los.

AGRADECIMENTOS

Introduzo esses agradecimentos com imenso sentimento de gratidão à Deus por ter-me mantido firme durante todo o processo do mestrado. E deixo aqui o versículo Josué 1:9, que diz:

“Não te ordenei que sejas forte e corajoso? Não temas e nem te acovardes, pois, o SENHOR teu Deus estará contigo por onde quer que andes”.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer a toda minha família, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões e me incentivou a seguir meus sonhos. Seu amor e apoio incondicionais são a razão pela qual cheguei até aqui. Eu sou abençoada por ter uma base tão amorosa, compreensiva e solidária. Vocês me ensinaram lições valiosas sobre a vida e me ajudaram a crescer e me tornar a pessoa que sou hoje.

Em terceiro lugar, quero agradecer ao meu orientador Dr. Paulo Juiz e co-orientadora Dra. Cristiane Villarreal pelas orientações e suporte durante todo o processo de pesquisa e escrita. Seus conselhos e sugestões foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter me concedido bolsa de estudo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço também a todos que direta ou indiretamente colaboraram com a minha pesquisa. Aqui cito o grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental – LAFTE, a contribuição de vocês foi essencial para a realização deste estudo, sem a qual, este trabalho não seria possível (especialmente Luiza).

Quero agradecer aos antigos amigos (Luanna, Gustavo e outros) e as amigas que fiz durante essa trajetória (sobretudo Cynthia e Ana) que me apoiaram ao longo deste processo.

A Dra. Milena e equipe (principalmente Girlaine, Cássio, Jaqueline e Thaís) que proporcionou o desenvolvimento deste trabalho no SENAI CIMATEC. E ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS.

Por fim, impossível não ser grata pelo meu companheiro de longa data, Guilherme, suas palavras de incentivo e encorajamento foram muito importantes em mais essa etapa.

A todos vocês, o meu sincero agradecimento. Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda de cada um de vocês.

Ele dá forças ao homem acabrunhado, redobra o vigor do fraco. Até os adolescentes podem esgotar-se, e jovens robustos podem cambaleiar, mas aqueles que contam com o Senhor renovam suas forças; ele dá-lhes asas de águia. Correm sem se cansar, vão para a frente sem se fatigar.

RESUMO

A lesão de pele é considerada um problema de saúde pública com comprometimento na qualidade de vida dos pacientes. Pesquisas com o desenvolvimento de novas terapias e tecnologias para acelerar processo de cicatrização são importantes dado o elevado custo que feridas trazem para o sistema de saúde. Neste sentido, este trabalho objetivou avaliar o potencial de compostos naturais no processo de reparo tecidual por meio do ensaio *Scratch* utilizando cultura de fibroblastos L929. Em adição, o sobrenadante e as células da cultura de fibroblastos foram utilizados para determinar os efeitos dos tratamentos sobre a produção de importantes marcadores do processo do reparo tecidual (IGF-1, VEGF, IL-8, IL-10, FGF-2, COL1A2, COL4A, PDGF) por meio de ELISA e qRT-PCR. Os resultados mostraram que os compostos fraxetina, monnieriside A (MOA) e o óleo essencial de Patchouli mostraram-se não citotóxicos, com migração de 54,66%, 71,5% e 76%, respectivamente. Esses dados foram corroborados pelas análises de marcadores, visto que a fraxetina foi capaz de induzir a expressão de RNAm para os marcadores biológicos IGF-1, VEGF, IL-8 e IL-10; MOA induziu a expressão de RNAm para FGF2, COL1A2 e IL-10; o óleo essencial de Patchuli induziu a expressão de RNAm para IL-8 e IL-10, com valores de $p < 0,05$. Os compostos analisados apresentaram potencial para o desenvolvimento de medicamentos indicados para a promoção do reparo tecidual. Pesquisas que visam a descoberta de novas drogas para promoção da cicatrização de feridas sem intercorrências são necessárias, tendo em vista a importância do tema para saúde pública.

Palavras-chave: Reparo tecidual. Produto natural. *Scratch*. Fibroblasto. Migração.

ABSTRACT

Skin lesions are considered a public health problem that compromises the quality of life of patients. Research with the development of new therapies and technologies to accelerate the healing process is important given the high cost that wounds bring to the health system. In this sense, this work aimed to evaluate the potential of natural compounds in the tissue repair process through the Scratch assay using cultured L929 fibroblasts. In addition, the supernatant and cells from the fibroblast culture were used to determine the effects of the treatments on the production of important markers of the tissue repair process (IGF-1, VEGF, IL-8, IL-10, FGF-2, COL1A2, COL4A, PDGF) by means of ELISA and qRT-PCR. The results showed that fraxetin, monnieriside A (MOA) and Patchouli essential oil were non-cytotoxic, with migration rates of 54.66%, 71.5% and 76%, respectively. These data were corroborated by marker analysis, as fraxetine was able to induce mRNA expression for biological markers IGF-1, VEGF, IL-8 and IL-10; MOA induced mRNA expression for FGF2, COL1A2 and IL-10; patchouli essential oil induced mRNA expression for IL-8 and IL-10, with p values <0.05. The compounds analyzed showed potential for the development of drugs indicated for promoting tissue repair. Research aimed at discovering new drugs to promote wound healing without interferences is necessary, in view of the importance of the subject for public health.

Keywords: Tissue repair. Natural product. *Scratch*. Fibroblast. Migration.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Anatomia da pele

Figura 2. Fisiologia da cicatrização

Figura 3. Resumo gráfico do fluxo de trabalho do *scratch*

Figura 4. Esquema método alamar blue

Figura 5. Fluxograma da metodologia

Figura 6. Efeito do óleo essencial de jurema branca sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 7. Efeito do óleo essencial de pimenta rosa sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 8. Efeito do óleo essencial de verbena sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 9. Efeito do óleo essencial de copaíba sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 10. Efeito do óleo essencial de patchouli sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 11. Efeito da riparina 1 sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 12. Efeito da riparina 2 sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 13. Efeito da riparina 3 sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 14. Efeito da riparina 4 sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 15. Efeito de monnieriside A sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 16. Efeito de alfa-bisabolol sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 17. Efeito de vesículas extracelulares de probiótico sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 18. Efeito de fraxetina sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 19. Efeito de 4-alillanisolol sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 20. Efeito de 4-alil-2,6-dimetoxifenol sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 21. Efeito de 2-alilfenol sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 22. Efeito de (-)-carveol sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 23. Efeito de (-)-mentona sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 24. Efeito de rosiglitazona sobre a viabilidade de fibroblastos

Figura 25. Efeito do óleo essencial de patchouli sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 26. Efeito do óleo essencial de copaíba sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 27. Efeito de monnieriside A sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 28. Efeito de alfa-bisabolol sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 29. Efeito de fraxetina sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 30. Repetição do efeito de fraxetina sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 31. Efeito do óleo essencial de jurema branca sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 32. Efeito do óleo essencial de pimenta rosa sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 33. Efeito do óleo essencial de verbena sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 34. Efeito de riparina 1 sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 35. Efeito de riparina 2 sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 36. Efeito de riparina 3 sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 37. Efeito de riparina 4 sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 38. Efeito de vesículas extracelulares de probiótico sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 39. Efeito de 4-alillanisol sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 40. Efeito de 4-alil-2,6-dimetoxifenol sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 41. Efeito de 2-alilfenol sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 42. Efeito de (-)-carveol sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 43. Efeito de (-)-mentona sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 44. Efeito de rosiglitazona sobre a área de migração de fibroblastos no *scratch*

Figura 45. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de IGF-1 em fibroblastos

Figura 46. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de VEGF em fibroblastos

Figura 47. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de CXCL15 (IL-8) em fibroblastos

Figura 48. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de FGF-2 em fibroblastos

Figura 49. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de COL1A2 em fibroblastos

Figura 50. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de COL4A1 em fibroblastos

Figura 51. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de PDGF-B em fibroblastos

Figura 52. Efeito dos compostos estudados sobre a quantificação de IL-10 no sobrenadante de fibroblastos

Tabela 1. Compostos usados no estudo

Tabela 2. Informações de sondas usadas para qRT-PCR

Tabela 3. Informações de primers usadas para qRT-PCR

Tabela 4. Resumo dos marcadores avaliados

APÊNDICE A: ARTIGO DE PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA SUBMETIDO A REVISTA THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY - Technological prospecting on strategies used in wound healing through patent mining

Figure 1. Market and competitors' location considering the number of patent family related to wound healing

Figure 2. Top 10 Key players considering the number of patent family related to wound healing

Table 1. IPCs related to patent used for wound healing

Table 2. Innovative strategies for dressing with antimicrobial properties.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-2	Proteína ativadora 2
Bcl-2/Bax	Linfoma de células B 2 / Proteína X associada a bcl-2
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
BSA	Albumina de soro bovino
Ca ²⁺	Cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC	Quimiocina quimiotática de monócitos
cDNA	DNA complementar
CIMATEC	Centro Integrado de Manufatura e Tecnologia
c-JUN	Fator de transcrição Jun
CO ₂	Dióxido de carbono
COL1A2	Colágeno tipo I cadeia alfa 2
COL4A1	Colágeno tipo VI cadeia alfa 1
CT	cycle threshold / limite de ciclo
CXC	Quimiocina quimiotática de neutrófilos
CXCL10	Ligante de quimiocina 10 do motivo CXC
CXCL15	Ligante 15 da quimiocina
CXCR1	Receptor 1 de quimiocina do motivo CXC
CXCR2	Receptor 2 de quimiocina do motivo CXC
CXCR3	Receptor 3 de quimiocina do motivo CXC
CXCR4	Receptor 4 de quimiocina do motivo CXC
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNCB	Dinitroclorobenzeno
EDA	domínio extra A da fibronectina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ERK	Quinase controlada pela sinalização extracelular
EUA	Estados Unidos
FBS	Soro bovino fetal
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
HaCat	Queratinócitos imortais aneuploides da pele humana adulta
HB-EGF	Fator de crescimento semelhante ao EGF de ligação à heparina
HIF-1 α	Fator induzível por hipóxia 1 alfa
IgE	Imunoglobulina E
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	Interleucina
ITGA1	Subunidade alfa 1 da integrina
ITGB1	Subunidade beta 1 da integrina
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
KGf	Fator de crescimento de queratinócito
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
MIP	Proteína inflamatória de macrófago
MMP	Metaloproteinase de matriz
MOA	Monnieriside A
NF-1	Neurofibromina 1
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
PAR	Receptor ativado por protease
PBS	Phosphate buffered saline / Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PIM. ROSA	Pimenta rosa

PKC	Proteína quinase C
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa
RANTES	Regulado na ativação, células T normais expressas e secretadas
RBL - 2H3	Linhagem celular de leucemia basofílica
RIP I	Riparina 1
RIP II	Riparina 2
RIP III	Riparina 3
RIP IV	Riparina 4
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDF-1	Fator 1 derivado de células estromais
SENAI	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TGF	Fator de crescimento transformador
TGF-βR	Receptor do fator de crescimento transformador beta
THP-1	leucemia monocítica aguda humana
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGFR	Receptor de VEGF
VEPROBIO	Vesículas extracelulares de probiótico
α-SMA	Alfa-actina de músculo liso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	VISÃO GERAL SOBRE A ANATOMIA DA PELE	19
2.2	MECANISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL	23
2.3	A TÉCNICA “ <i>SCRATCH</i> ”	28
2.4	COMPOSTOS NATURAIS NO REPARO TECIDUAL	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	COMPOSTOS ESTUDADOS	32
3.2	MÉTODO DE CULTIVO CELULAR DE FIBROBLASTOS	36
3.3	AValiação DA VIABILIDADE CELULAR / CITOTOXICIDADE	36
3.4	AValiação DA MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS NO ENSAIO “ <i>SCRATCH</i> ”	37
3.5	COLETA DE MATERIAL PARA ELISA E qRT-PCR	38
3.5.1	MÉTODO qRT-PCR	38
3.5.2	ENSAIO ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	39
3.6	PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS ATRAVÉS DA MINERAÇÃO DE PATENTES	40
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
4	RESULTADOS	41
4.1	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	41
4.2	MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS / <i>SCRATCH</i>	51
4.3	EXRESSÃO DE RNAm POR qRT-PCR	64
4.4	RESULTADOS DO ENSAIO ELISA	68
4.5	PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS ATRAVÉS DA MINERAÇÃO DE PATENTES	71
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	76

APÊNDICE	85
APÊNDICE A- ARTIGO DE PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA SUBMETIDO A REVISTA THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY	85

1 INTRODUÇÃO

A pele, maior órgão do corpo humano, tem um importante papel na homeostase. Quando há perda da integridade desse órgão, um sistema de reparo tecidual se inicia, com o intuito de refazer/remodelar a estrutura original e o desempenho do tecido (ALVES et al., 2020). A lesão de pele é considerada um problema de saúde pública com comprometimento na qualidade de vida dos pacientes, especialmente quando acompanhada de dor (LINDHOLM e SEARLE, 2016). De fato, o fenômeno das feridas tem sido chamado de “Epidemia Silenciosa”. Estima-se que cerca de 1.5 – 2 milhões de pessoas vivam com uma ferida crônica em toda a Europa. Nos Estados Unidos (EUA), as feridas crônicas afetam cerca de 6.5 milhões de pessoas ao mesmo tempo (LINDHOLM e SEARLE, 2016). No Brasil, no período de 2014 a 2019, de 330.536 casos de incidentes decorrentes da assistência à saúde, 60.762 corresponderam à ocorrência de lesão por pressão (MONTEIRO et al., 2021).

A fim de evitar maiores danos ao organismo, a lesão de pele deve ser coberta imediatamente. Neste contexto, diferentes curativos estão sendo desenvolvidos, como hidrogéis contendo fatores de crescimento que estimulam o reparo, curativos impressos em 3D, filmes à base de mistura de colágeno/carboximetilcelulose microfibrilada entre outros agentes farmacológicos (ALVES et al., 2020). No entanto, os gastos financeiros no manejo de feridas em clínicas e hospitais está mais relacionado à utilização de recursos humanos (profissionais de saúde) e tempo de internação hospitalar, do que propriamente com o material utilizado no tratamento da ferida (LINDHOLM e SEARLE, 2016).

Estima-se que o tratamento de feridas represente quase 3% dos custos totais do sistema de saúde – aproximadamente £5 bilhões anualmente, de acordo com dados do Reino Unido; no país de Gales o custo do tratamento de pacientes com feridas crônicas chega a 5.5% do gasto total com serviços de saúde; nos EUA, é relatado que mais de US\$ 25 bilhões são gastos anualmente no tratamento de feridas crônicas (LINDHOLM e SEARLE, 2016). Em um estudo longitudinal retrospectivo realizado no interior de Minas Gerais (Brasil) com 15 pacientes, o custo estimado total de todos os pacientes foi no valor de R \$ 101.030,58/ano. Baseado em informações fornecidas pelo município (com 230 mil habitantes) em que o estudo foi realizado, têm-se o registro aproximado de 200 pessoas com lesões cutâneas, o que geraria um gasto aproximado de R\$ 1.350.000,00 por ano (CORTEZ et al., 2019)

Diante deste problema, o desenvolvimento de curativos que estimulem o reparo tecidual e que possuem propriedades antimicrobianas sem efeitos tóxicos para o ser humano tem

direcionado as pesquisas nesta área, de modo que compostos bioativos obtidos de recursos naturais com propriedades biológicas diversas, desde a antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória até aquelas que promovem a regeneração tecidual, migração/proliferação celular, absorção de umidade e exsudatos vem sendo pesquisadas (PRASATHKUMAR e SADHASIVAM, 2021).

Neste contexto, compostos químicos extraídos de plantas medicinais poderiam representar uma ferramenta terapêutica importante, visto que com as novas tecnologias e os novos estudos científicos, houve um aumento significativo do uso de produtos naturais para tratamento de feridas (VIDAL, 2019).

Considerando a rica biodiversidade brasileira e o potencial terapêutico das plantas medicinais, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de compostos naturais, como futuros candidatos em auxiliar o processo de reparo tecidual. Neste sentido, o trabalho apresenta moléculas promissoras que futuramente poderão ser usadas no desenvolvimento de curativos para promoção de qualidade de vida dos indivíduos acometidos por feridas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VISÃO GERAL SOBRE A ANATOMIA DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, responsável por mais de 15% do peso corporal e tem como função primordial proteger as estruturas internas do ambiente externo, além disso possui funções, como: proteção contra agentes externos (físicos, químicos, mecânicos e biológicos), termorregulação, resposta imunológica, controle hemodinâmico e sensorial, produção e excreção de metabólitos, bem como função endócrina. A Figura 1 apresenta as três camadas que formam a pele, quais sejam: epiderme, derme e hipoderme ou tela subcutânea (BERNARDO, SANTOS e SILVA, 2019; SANTO, 2022).

A primeira camada e mais externa, que está em contato com o ambiente, é chamada epiderme, sendo avascular com espessura de 75 a 150 µm, a espessura varia de acordo com a localização, idade e sexo (NASCIMENTO JÚNIOR, 2020), reveste o organismo preservando a homeostasia do meio interno (SANTO, 2022) e protege contra agentes externos. Histologicamente, a epiderme é dividida nos seguintes estratos: estrato córneo (mais externa), estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso, estrato basal (mais interna) (DOMANSKY e BORGES et al., 2012).

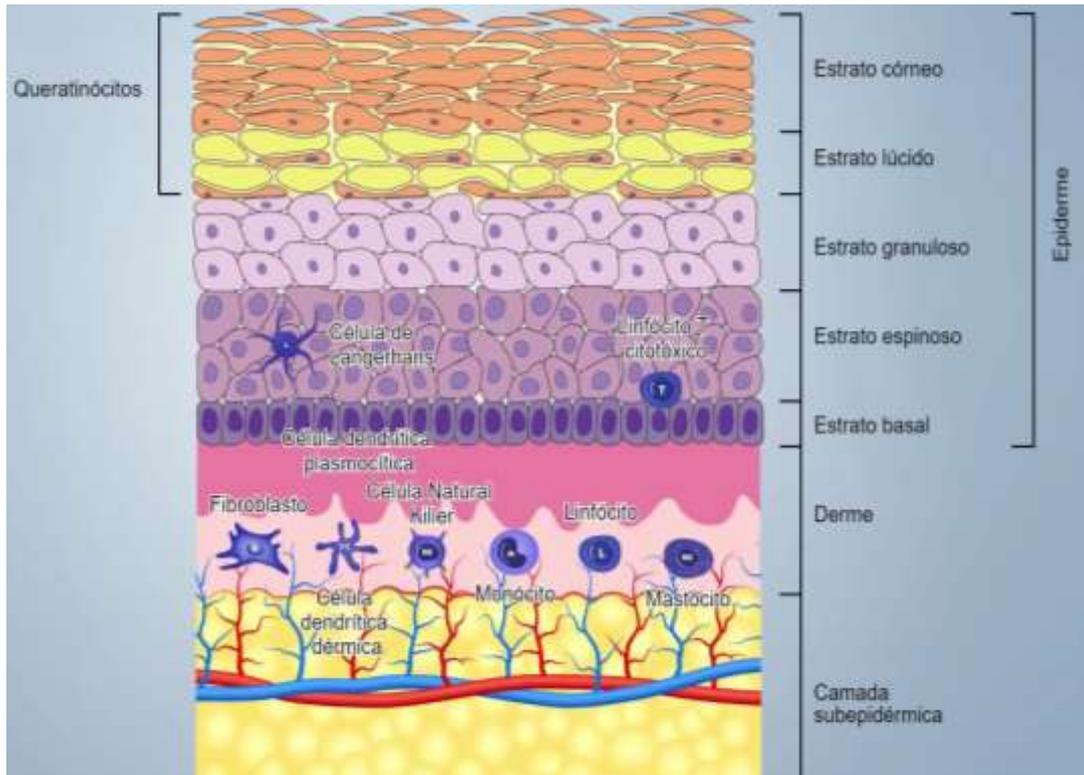


Figura 1. Anatomia da pele
Fonte: UNIT, 2018

O estrato germinativo ou basal é o mais interno e composto por células cubóides. Nesse estrato se observam células-tronco que originam os outros tipos celulares da epiderme. As mitoses que acontecem nessa camada impulsionam as células das camadas superiores para área mais externa da pele, promovendo assim a renovação do tecido epitelial (NASCIMENTO JÚNIOR, 2020).

O estrato espinhoso contém células poligonais unidas por desmossomos. Já o estrato granuloso possui células achatadas e enfileiradas com grânulos de querato-hialina e apresentam terminações nervosas (NASCIMENTO JÚNIOR, 2020). O estrato lúcido está abaixo do estrato córneo e apresenta eleidina, uma substância gordurosa que hidrata a pele. Suas células são bem delgadas, sem núcleo e transparentes, por isso, chama-se estrato lúcido (NASCIMENTO JÚNIOR, 2020).

O estrato córneo possui células ricas em queratina, achatadas e que lembram escamas. A lâmina mais externa está sempre em descamação. Um fato interessante é que essa camada varia de espessura de acordo com o sítio anatômico, por exemplo palma da mão e planta do pé, podendo ser mais grossa ou fina (NASCIMENTO JÚNIOR, 2020).

Os tipos celulares que compõem a epiderme são: a) os queratinócitos, que exercem a função de sintetizar queratina e a medida com que migram para a superfície da pele, origina-se a camada córnea. A queratina é uma proteína fibrosa filamentosa que dá firmeza a epiderme e

garante proteção, impermeabilidade e protege da desidratação; b) os melanócitos, que são responsáveis pela síntese de melanina, um pigmento cuja função é proteção contra os raios ultravioleta; c) as células de Langherans, são células apresentadoras de antígeno e ativam o sistema imunológico; e d) as células ou discos de Merkel, que atuam como receptores de tato ou pressão ligando-se as terminações nervosas, estes estão presentes entre a epiderme e derme (DOMANSKY e BORGES et al., 2012).

A segunda camada é a derme, composta por tecido conjuntivo denso irregular. É uma camada cutânea existente entre a epiderme e o tecido subcutâneo, composta por fibras de colágeno e elastina em abundância, tem como função promover a sustentação da epiderme e atuar nos processos fisiológicos e patológicos do órgão cutâneo (BERNARDO, SANTOS e SILVA, 2019).

As principais células da derme são os fibroblastos, células jovens, em plena atividade produtiva, responsáveis pela produção de fibras colágenas e elásticas, macromoléculas proteoglicanas e glicoproteínas da matriz que compõem a substância fundamental. São eles que, no processo de remodelação tecidual, são responsáveis por ordenar a orientação dos elementos da matriz extracelular e composição da matriz extracelular (MEC) (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA, 2023).

A MEC caracteriza-se, basicamente, por variadas proteínas colagênicas e não colagênicas (glicoproteínas), glicosaminoglicanas e proteoglicanas, e pelo sistema composto por fibras elásticas. As proteínas colagênicas são as mais abundantes. A molécula de colágeno é formada pela reunião helicoidal de três cadeias alfa polipeptídicas helicoidais, ricas nos aminoácidos glicina, prolina, hidroxiprolina e hidroxilisina. Há 29 diferentes tipos de colágeno conhecidos. Essas moléculas distribuem-se em grupos definidos de acordo com as homologias estruturais de seus domínios e as interrelações entre si (associações supraestruturais), pois cada tipo de colágeno costuma associar-se com outro tipo de colágeno na matriz extracelular, assim como com vários dos demais componentes da MEC citados (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA, 2023).

Os colágenos são conhecidos por grupo. Os colágenos fibrilares, tipos I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII, são os predominantes, formam agregados fibrilares, e são encontrados, especialmente, em matrizes fibrosas, como na derme, ossos, tendões e ligamentos, cápsulas de órgãos, entre vários outros sítios. O colágeno de membrana basal, tipo IV, forma uma estrutura em rede, associando-se com outras proteínas da membrana basal, como a laminina, entre outras, promovendo força e saúde à matriz (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA, 2023).

O colágeno tipo I forma fibras largas com o agrupamento das fibrilas, e está presente em quase todos os tecidos conjuntivos, associa-se com os colágenos III e V constituindo fibras com fibrilas heterotípicas, usualmente observadas na matriz extracelular de osso, tendões e ligamentos, dando resistência e elasticidade. O do tipo IV, não forma fibrilas e constitui redes que estão presentes, especialmente, nas membranas basais, que separam os epitélios do estroma conjuntivo associado; nas membranas basais associa-se com outras moléculas, como os colágenos tipos XV e XVIII, e com proteínas não colagênicas como a laminina, a entactina (nidogênios 1 e 2), e as proteoglicanas perlecano e agrina (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA, 2023).

Além disso, é na derme que estão presentes os anexos cutâneos como glândulas sebáceas e sudoríparas, pelos e unhas. Sua espessura pode diferir de 0,6 mm até 3 mm e apresenta três regiões distintas: região superficial ou papilar, profunda ou reticular e adventricial (BERNARDO, SANTOS e SILVA, 2019).

A região superficial ou papilar é constituída por tecido conjuntivo frouxo, com predominância de feixes de fibras de colágeno mais espessas, onduladas e em disposição horizontal, contém pequenos vasos linfáticos e sanguíneos, terminações nervosas, elastina e corpúsculo de meissner, mantém contato com a epiderme e tem função de fornecer nutrientes (BERNARDO, SANTOS e SILVA, 2019; RIPPA, KALABUSHEVA e VOROTELYAK, 2019).

A camada profunda ou reticular é composta por tecido conjuntivo denso não modelado, com fibras de colágeno mais espessas em disposições horizontais, constituída pela base dos folículos pilosos, glândulas, vasos linfáticos e sanguíneos, terminações nervosas e elastina, essa camada permite a passagem de oxigênio e nutrientes para a pele (BERNARDO, SANTOS e SILVA, 2019; RIPPA, KALABUSHEVA e VOROTELYAK, 2019).

A terceira e última região é a adventricial, circundada por folículos pilossebáceos, glândulas e vasos, formada por feixes finos de colágeno (OLIVEIRA, 2017; TASSINARY, 2019).

A lâmina dermo-epidérmica une a epiderme e a derme; é desenvolvida pela camada basal e tem como finalidade ser uma barreira e filtro de nutrientes entre as camadas (FRANCESECHINI, 1994).

A última camada da pele é composta pela hipoderme ou tela subcutânea, tida como um órgão endócrino, formada por adipócitos. Suas principais funções são: reserva energética, proteção contra choques mecânicos, manta térmica, produção hormonal e modelagem do corpo (TASSINARY, 2019). Além disso, a matriz lipídica contém lipídios únicos, principalmente

ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol, que são organizados de maneira especial, e os achados indicam que a depleção desses lipídios resulta em uma ruptura da função de barreira da pele (SAHLE et al., 2015). Também tem função imunomoduladora, o que os torna adequados para terapia celular, como reparação de tecidos danificados por inflamação crônica ou doenças autoimunes (SHIN et al., 2020).

2.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL

A capacidade auto regenerativa é um fenômeno universal nos organismos vivos (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005). Em organismos superiores, o reparo tecidual pode ocorrer de duas formas: (1) pela regeneração, com a recomposição das características morfológicas e atividade funcional do tecido ou (2) pela cicatrização com restabelecimento da homeostasia do tecido, porém com perda da sua atividade funcional em função da formação de cicatriz fibrótica (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005).

O processo de cicatrização de feridas é dividido didaticamente em quatro fases: hemostasia (1 a 3 dias), inflamação (3 a 30 dias), proliferação (7 a 40 dias) e remodelação (40 dias a 2 anos), de maneira concomitante e dependente da espécie e do organismo, e envolve a participação de diferentes tipos celulares, fatores de crescimento, citocinas pró e anti-inflamatória e íons metálicos (NAVARRO-REQUENA et al., 2018). Essas fases ocorrem de maneira progressiva e controlada, de modo que falhas no processo pode tornar o tempo de cicatrização mais longo, resultando em feridas crônicas (MIRICESCU et al., 2021), cuja duração chega a mais de seis semanas, podendo estar associado a comorbidades a exemplo da diabetes (CARVALHO et al., 2022; NAVARRO-REQUENA et al., 2018).

A lesão tecidual é acompanhada de alterações como baixa tensão de oxigênio, redução de pH, presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, mediadores séricos como von Willebrand, fibrinogênio, cálcio e protrombina, que contribuem como gatilho para iniciar o reparo tecidual (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005), ativando a primeira fase, hemostasia.

Durante a fase de hemostasia, as plaquetas, elementos derivados dos megacariócitos (LAM, VIJAYAN e RUMBAUT, 2015), possuem funções primordiais no reparo do endotélio lesado. Dessa maneira, ocorre vasoconstrição e adesão das plaquetas ao endotélio lesado por meio de glicoproteínas IIb/IIIa (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005), com consequente ativação e desgranulação de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) entre outros (GARRAUD, HOZZEIN e BADR,

2017). É importante relatar que o PDGF também possui propriedade quimiotática sobre macrófagos, neutrófilos e fibroblastos (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005).

A cascata de coagulação é ativada com a finalidade de tamponar o local de injúria tecidual por meio de um coágulo. Esse coágulo é formado por plaquetas e fibrina (trombo fibrinoso), que possibilitam a migração celular para o local afetado e proporciona uma matriz provisória que será usada como base no processo de reparo (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005; NAVARRO-REQUENA et al., 2018).



Figura 2. Fisiologia da cicatrização
Fonte: Adaptado ALTOMARE, 2023

Há, também, evidências de que as plaquetas auxiliam na resposta imune juntamente com os leucócitos. Desta forma, quimiocinas das classes CC e CXC como as proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP-1 α), RANTES e proteína quimiotática de monócitos-3 são expressas para auxiliar no recrutamento de células durante o processo inflamatório (LAM, VIJAYAN e RUMBAUT, 2015), descrito como uma reação tecidual à infecção e/ou lesão tecidual ou outros danos. Um marcador biológico importante é a citocina CXCL15 (IL-8), reconhecidamente também como uma citocina quimiotática responsável pelo recrutamento de neutrófilos (NIH, 2023) para o local onde ocorreu uma infecção

O processo inflamatório é a segunda fase do reparo tecidual e é caracterizada pelo recrutamento de leucócitos para a lesão. É válido ressaltar que essa divisão é meramente

didática, pois as fases ocorrem de menairs simultâneas. A inflamação apresenta cinco sinais cardinais clássicos: rubor, eritema, dor, calor e perda de função (GONZALEZ et al., 2016).

Os neutrófilos provenientes da circulação são as primeiras células a alcançarem a região inflamada, eles sintetizam citocinas pró-inflamatórias e compostos antimicrobianos como as espécies reativas de oxigênio (ROS) (GONZALEZ et al., 2016), portanto sua função principal é de eliminação de patógenos por meio de fagocitose (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005).

Os neutrófilos atuam contra os patógenos através da liberação de mediadores químicos presentes em seus grânulos intracelulares. Grânulos secundários contém proteína antimicrobiana catiônica humana, lactoferrina, metaloproteinase de matriz 8 (MMP-8) e colagenase 2 (RODRIGUES et al., 2019). As proteases ou proteinases são enzimas que clivam ligações peptídicas entre os aminoácidos e são essenciais tanto para a função antimicrobiana quanto para o rompimento da membrana basal e matriz extracelular (MEC), possibilitando a diapedese. As principais serina proteases são catepsina G, elastase e protease 3, que são armazenadas nos grânulos azurófilos e degradam elastina, fibronectina, laminina, vitronectina e colágeno IV. Elas também ativam MMPs e impedem os inibidores de protease, intensificando a resposta proteolítica (RODRIGUES et al., 2019).

O sistema complemento é constituído por uma “cascata” enzimática que ajuda na defesa contra infecções. É o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos. Está constituído por um conjunto de proteínas, tanto solúveis no plasma como expressas na membrana celular, e é ativado por diversos mecanismos por duas vias, a clássica e a alternativa (ITURRY-YAMAMOTO e PORTINHO, 2001). A ativação do sistema complemento tem como consequências: a) o recrutamento, por meio de quimiocinas (C5a) de novas células do sistema imune; b) opsonização mediada por opsoninas (C3b) e destruição de microrganismos invasores pela formação do complexo de ataque a membrana. Todos esses processos potencializam a atividade inflamatória (DELVES, 2021; GONZALEZ et al., 2016), a qual se estabelece por meio do reconhecimento, pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), de padrões moleculares associados a patógenos microbianos (PAMPS), resultando em aumento da expressão do fator de transcrição NFκB e produção de citocinas pró-inflamatórias (LIU et al., 2017; SILVA, 2015).

Os monócitos são recrutados após os neutrófilos (um grupo celular predomina em relação ao outro em diferentes períodos) e, no tecido, diferenciam-se em macrófagos. Macrófagos contribuem para a remoção de microrganismos, e por meio de receptores do tipo *scavenger*, possuem também a função de remoção de lipídios oxidados, como células mortas, do tecido lesionado. Macrófagos são reconhecidos como células apresentadoras de antígeno, e

portanto, por meio do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC de classe II), apresentam peptídeos antigênicos às células T auxiliares, permitindo a ativação do sistema imune adaptativo (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005).

De acordo com os perfis de expressão gênica, os macrófagos podem ser classificados em macrófagos do tipo M1, com ação pró-inflamatória, e macrófagos do tipo M2, ação anti-inflamatória, e também secreção de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), importantes para o reparo tecidual. Ademais, liberam fatores quimiotáticos e produzem prostaglandinas com ação vasodilatadora. (GONZALEZ et al., 2016).

O controle da extensão e da duração da inflamação é um passo relevante no processo inflamatório, umas das citocinas mais relevantes atuante é a IL-10 (OLIVEIRA, 2017). Acredita-se que ela seja o mais importante mediador com papel limitador e finalizador da resposta inflamatória. Adicionalmente, ela não só regula o crescimento ou diferenciação de várias células do sistema imune, mas também de queratinócitos e células endoteliais (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005).

A terceira fase do processo de reparo tecidual é a fase proliferativa, caracterizada pela formação do tecido de granulação com a participação de fibroblastos sustentados por uma matriz frouxa composta de fibronectina (para fixar células), ácido hialurônico (para resistência tecidual) e colágeno tipo I e III (contribui para formação de um tecido conjuntivo forte e elástico – fibroplasia) (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005).

Ao longo da fase de proliferação a ativação e migração de fibroblastos é intensificada. Macrófagos CD206+/CD301b+ sinalizam ativamente para fibroblastos dérmicos induzindo a transição para miofibroblastos, intensificando ainda mais a deposição de colágeno e α -actina de músculo liso na ferida. Essa relação entre macrófagos e fibroblastos é tênue, pois nesse momento é determinado se o reparo ocorrerá sem cicatriz ou não (RODRIGUES et al., 2019). Segundo Wernig e cols. (2017) o aumento da expressão do sinal CD47 em fibroblastos murinos foi responsável por interferir na fagocitose, levando à deposição excessiva de MEC e aumento de expressão de c-JUN, um regulador molecular central da maioria das fibroses. Durante a cicatrização de feridas, os adipócitos se regeneram a partir de miofibroblastos, um tipo de célula que se pensa ser diferenciado e não adipogênico (PLIKUS et al., 2017).

Em um processo normal de cicatrização, o colágeno tipo III da MEC é gradativamente substituído por colágeno tipo I (GURTNER et al., 2008; WERNER, KRIEG e SMOLA, 2007). Esse tipo de colágeno é predominante em tendões, ligamentos e pele, onde lhes confere suas propriedades mecânicas de suporte de carga e força, e possibilita a distensão (ATAY et al, 2022;

RAMEZANPOUR, et al., 2019). Entretanto, como já abordado anteriormente, há possibilidade de falha e/ou prorrogação no reparo tecidual, resultando em cicatriz hipertrófica e fibrose, caracterizada pela proliferação contínua de fibroblastos e deposição excessiva da MEC (RAMEZANPOUR, et al., 2019).

Uma das principais características dos reparos é a contração da ferida, que reduz a área de superfície a ser repitelizada. Durante esse processo, as fibrilas de colágeno são organizadas perpendicularmente às bordas da ferida para aumentar a resistência mecânica do tecido (SCHULTZ, 2011). A alteração no microambiente da ferida induz a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos α -SMA-positivos. Os miofibroblastos são um tipo de célula transitória que deposita MEC e exibe características de músculo liso contrátil (HINZ, 2010; TOMASEK et al., 2002). Os fibroblastos da derme normal e do tecido subcutâneo subjacente primeiro se transformam em protomiofibroblastos em resposta ao aumento do estresse mecânico. Protomiofibroblastos exibem apenas expressão de actina β - e γ -citoplasmática (DARBY et al., 2014). A diferenciação em miofibroblastos sintetizadores de α -SMA ocorre em resposta à estimulação por TGF- β (RODRIGUES et al., 2019). Um subconjunto de fibroblastos expressa marcadores hematopoiéticos, a exemplo dos pericitos, sugerindo sua origem mieloide (GUERRERO-JUAREZ et al., 2019).

Concomitantemente a fase proliferativa acontece a neovascularização tecidual, uma etapa conhecida como neoangiogênese ou formação de novos vasos sanguíneos (GURTNER et al., 2008). As células endoteliais iniciam a angiogênese por brotamento em resposta a sinais pró-angiogênicos como VEGF, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), PDGF-B, TGF- β e angiopietinas (TONNESEN, FENG e CLARK, 2000). Portanto, em resposta a fatores de crescimento, células endoteliais são ativadas e expressam enzimas proteolíticas que auxiliam na migração para o interior do coágulo. Ativadas, as células endoteliais proliferam e migram para formar novas junções célula-célula e ramificam-se para formar novos capilares (EILKEN e ADAMS, 2010). VEGF, além da contribuição para a formação de novos vasos, está sendo identificado como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento. Assim também, FGF, o qual desencadeia angiogênese, promove o equilíbrio homeostático, crescimento de fibroblastos e cicatrização de feridas (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005).

A última fase do processo de reparo da ferida é a remodelação. É nesse momento que a lesão terá sua máxima resistência tênsil, a qual é marcada pela quantidade e também organização de colágeno depositado. Sinalizadores, a exemplo IGF-1, aumenta da expressão da cadeia pró-alfa 1 (I) e da pró-alfa 1 (III) do procolágeno em cultura de fibroblastos da derme

(BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005) estimulando a deposição de colágeno. O IGF-1 desempenha papéis reguladores na cicatrização de feridas, pois aumenta a proliferação de fibroblastos e células endoteliais e modula a quimiotaxia (LIAO et al., 2014).

Uma vez que a re-epitelização ocorre, os miofibroblastos dentro do tecido de granulação continuam a sintetizar MMPs e seus respectivos inibidores (inibidores teciduais de metaloproteinases, TIMPs). MMPs direcionam componentes específicos da MEC para degradação, uma etapa essencial para sua remodelação (CALEY, MARTINS e O'TOOLE, 2015). À medida que as MMPs trabalham para recompor a MEC, a síntese da matriz diminui significativamente (DARBY et al., 2014).

Com a migração das células epiteliais a partir dos bordos do ferimento, o leito da ferida cicatrizada não está mais em estado de hipóxia, e mudanças nos elementos responsivos à hipóxia podem contribuir para a quiescência das células endoteliais (RODRIGUES et al., 2019). Mecanismos de feedback negativo em células endoteliais funcionam como “interruptores antiangiogênicos”, modulando a resposta ao VEGF. Proteínas Sprouty intracelulares e Vasohibina podem atuar como “interruptores antiangiogênicos” (CABRITA e CHRISTOFORI, 2008; WIETECH, CERNY e DIPIETRO, 2013).

2.3 A TÉCNICA “*SCRATCH*”

A cicatrização de feridas é um processo complexo e tem sido o foco de pesquisas, especialmente o entendimento de como se dá a migração celular, a qual influencia diretamente na qualidade do tecido cicatricial (PINTO et al., 2019).

Neste sentido, o ensaio laboratorial conhecido como *scratch* é utilizado para avaliar a migração celular, sendo considerado um método direto e econômico. Este método baseia-se na observação de que, ao criar um novo gap artificial, chamado “*scratch*”, em uma monocamada de células confluentes, as células na borda do gap recém-criado se movimentam em direção à abertura para fechar o “*scratch*” restabelecendo novos contatos célula-célula (LIANG, PARK e GUAN, 2007; ALISHAHEDANI et al., 2021; KALLURI et al., 2009).

As etapas básicas do método consistem em produzir mecanicamente um “arranhão” na monocamada celular, acompanhando e registrando com imagens a migração celular em intervalos regulares até o completo fechamento do “arranhão” (LIANG, PARK e GUAN, 2007) (Fig. 3). Este ensaio fornece informações fisiológicas translacionais que podem ser usadas para formular tratamentos alvo, concentrações de dosagem e genes de interesse antes da experimentação *in vivo* (PINTO et al., 2019).

O ensaio pode ser facilmente alterado ou adaptado para atender às necessidades do pesquisador. Segundo Pinto e cols. (2019), entretanto, há quatro questões básicas a serem consideradas antes da experimentação: a) Que pergunta(s) geral(is) ou específica(s) o(s) investigador(es) está(ão) tentando responder? b) Que linha celular ou linhas celulares (se múltiplas) devem ser usadas para representar o sistema fisiológico que está sendo estudado? Por exemplo, em um estudo de cicatrização de feridas cutâneas, um fibroblasto dérmico, célula-tronco ou queratinócito epidérmico podem ser consideradas como representantes de populações de células normalmente encontradas em abundância no tecido cutâneo; c) Como a migração celular será rastreada/imagem? e; d) Que medidas de resultado serão usadas para análise?

Uma das principais vantagens deste método simples é que imita até certo ponto a migração de células *in vivo*. Além disso, os padrões de migração como população frouxamente conectada (por exemplo, fibroblastos) ou como camadas de células (por exemplo, epiteliais e endoteliais) também imitam o comportamento dessas células durante a migração *in vivo* (Haudenschild e Schwartz, 1979). Outra vantagem desse método é sua adequação particular para estudar a regulação da migração celular por interação celular com matriz extracelular (MEC) e interações célula-célula (LIANG, PARK e GUAN, 2007).

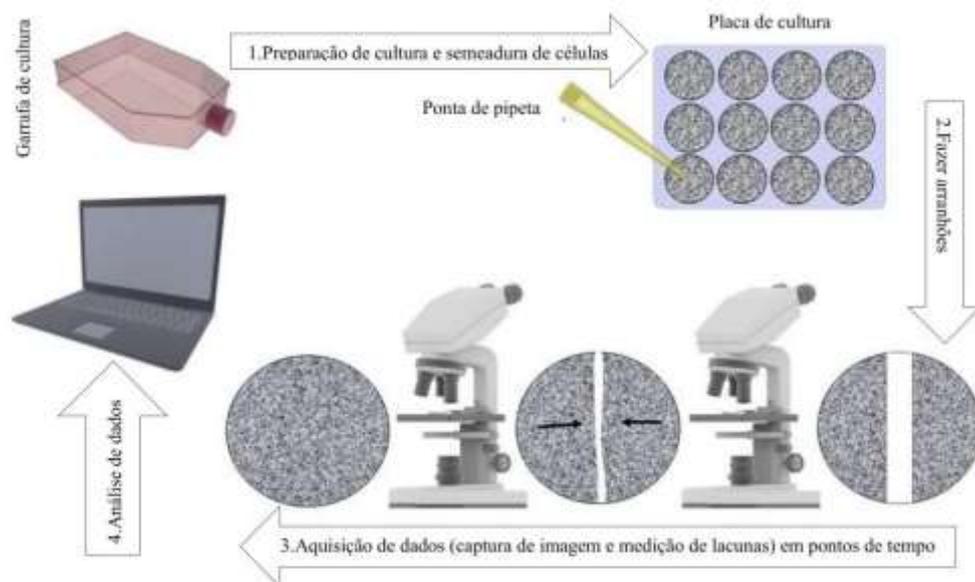


Figura 3. Resumo gráfico do fluxo de trabalho do *scratch*
Fonte: Adaptado de GRADA et al., 2017

Dois tipos principais de migração celular são identificados: migração celular única e migração celular coletiva. A migração coletiva é o movimento coordenado de um grupo de células que mantém suas conexões intercelulares e polaridade coletiva (GRADA et al., 2017).

O *scratch* é adequado para tipos de células como queratinócitos e fibroblastos da pele que exibem migração coletiva, também conhecida como “migração em folha” (BINDSCHADLER e MCGRATH, 2007). A técnica envolve fazer uma “ferida” fina linear (criando uma lacuna) em uma monocamada de células confluentes e, posteriormente, captura, em intervalos de tempo regulares, de imagens das células preenchendo a lacuna (CORY, 2011). Pode-se então analisar as imagens para quantificar a migração. Imagens de células vivas usando microscopia de lapso de tempo permitem o registro de informações espaciais e temporais e permitem a investigação de processos dinâmicos em células vivas. As medições são geralmente feitas em até 24 horas na tentativa de limitar o estudo à migração (GRADA et al., 2017).

O *scratch* pode ser combinado com outras técnicas laboratoriais, como microinjeção ou transfecção gênica, para avaliar os efeitos da expressão de genes exógenos na migração de células individuais (LIANG, PARK e GUAN, 2007). Ademais, pode ser aplicado para investigar tratamentos terapêuticos que estimulam ou aceleram o fechamento da ferida (PINTO et al., 2016), neste sentido compostos naturais têm se mostrado promissores.

2.4 COMPOSTOS NATURAIS NO REPARO TECIDUAL

O Brasil é o país com a maior biodiversidade no mundo, espalhadas nos seis biomas terrestres e nos três grandes ecossistemas marinhos. Esta abundante variedade de vida abriga mais de 20% do total de espécies do planeta, encontradas na terra e na água. A rica biodiversidade brasileira é fonte de recursos para o País, não apenas pelos serviços ecossistêmicos providos, mas também pelas oportunidades que representam (AMBIENTE, 2022). Esta biodiversidade pode ainda ser uma rica fonte de matéria-prima de produtos naturais com potencial biotecnológico para o desenvolvimento de inovações terapêuticas para o tratamento de sinais e sintomas presentes nas feridas de pele.

Durante a cicatrização, a inflamação é uma etapa crítica, visto que ela é crucial para o reparo tecidual e como determinante se uma ferida será aguda ou crônica. Os produtos naturais com ação anti-inflamatória são desejados quando se deseja desenvolver um produto farmacêutico para tratamento de feridas. Entre estes compostos, riparinas foram descritas como anti-inflamatório por De Carvalho et al. (2013).

Estudos relatam que os princípios bioativos presentes no óleo de copaíba tem ação anti-inflamatória e cicatrizante em lesões orais de ratos (ALVARENGA et al., 2020; PARANHOS et al., 2022; WAGNER et al., 2017). Em testes *in vitro* o composto monnieriside A inibiu a produção de óxido nítrico e reduziu a expressão de citocina pró-inflamatória IL-1 β em

macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN γ (PEREIRA et al., 2020). Rocha e cols. (2011) demonstraram, pela primeira vez, as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva periféricas de (-)- α -bisabolol em roedores, assim como El-Lakany e cols. (2019), que mostraram o potencial das riparinas como aceleradores do processo de regeneração tecidual em ratos. Um outro bioativo estudado por Aragão Neto et al. (2019), o 2-alilfenol foi capaz de reduzir a expressão de IL-1 β e TNF- α , promovendo antinocicepção por mecanismos adenosinérgicos e efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Essas propriedades biológicas são promissoras quando se pensa em tratamento de feridas e os sinais e sintomas relacionados às fases de reparo tecidual.

Trabalhos com a planta aroeira (*Schinus terebinthifolia*) revelou que esta espécie vegetal tem ação anti quimiotática, antifúngica e como agente imunomodulador, alterando a liberação de citocinas pró-inflamatória em testes com camundongos, (DOS SANTOS et al., 2020; MACIEL et al., 2019; TANG et al. 2020), além de atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* uma importante bactéria presente normalmente na pele, mas que pode ser um contaminante em feridas. Outro composto que age contra esse tipo de bactéria é 4-alil-2,6-dimetoxifenol, demonstrando efeitos inibitórios *in vitro* e *in silico* (MUNIZ et al., 2021).

A atividade antimicrobiana de compostos naturais também foi estudada por Montenegro e cols. (2019) e Lopez-Romero e cols. (2015). Os autores mostraram a ação de carveoilfenóis contra leveduras patogênicas e ação antibacteriana do óleo essencial de carveol contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Já Al-Khattaf e cols. (2019) testaram derivados de mentona para atividades antimicrobianas, assim como Naksang e cols. (2020), porém, usando 4-alillanisol. A ação antimicrobiana é importante pois feridas podem ser contaminadas dificultando o processo de cicatrização.

Um estudo em camundongos com rosiglitazona mostrou que este composto promove angiogênese (ZHOU et al., 2019), resultados semelhantes foram encontrados por Ku e cols. (2017), onde essa substância aumentou a migração de células endoteliais e a permeabilidade vascular (a ANVISA cancelou o registro dos medicamentos contendo o princípio-ativo rosiglitazona). Ainda, trabalhos desenvolvidos com fraxetina evidenciaram ações antifibrótica e antiapoptótica (BALAHA et al., 2021; WU et al., 2019;), enquanto Lopez-Jornet e cols. (2014) mostraram que uma formulação em gel rica em flavonoides extraídos de verbena, foi capaz de promover reepitelização e neovascularização das feridas da pele em camundongos SKH-1, bem como reduzir inflamação. Algumas terapias celulares vêm sendo pesquisadas na área de tratamento de feridas. Ha et al. (2020) relataram os efeitos cicatrizantes de exossomos.

Jia e cols. (2021) produziram um nanocompósito de filme antibacteriano como curativo para feridas. O nanocompósito foi incorporado com óleo essencial de patchouli, preparado por impregnação cíclica de CO₂ supercrítico. Mais recentemente, Abdul Khalil e cols. (2022) sintetizaram e caracterizaram um hidrogel à base de amido carregado com óleo essencial de patchouli, os resultados promissores corroboram os achados de Kim e cols. (2021), que também mostrou a atividade de patchouli como cicatrizante.

Um artigo de revisão publicado em 2020 traz que os fármacos produzidos de produtos naturais, naturais botânicos e derivado de produto natural, correspondem a 23,5% dos novos fármacos fabricados, uma porcentagem muito próxima dos fármacos sintéticos (24,6%) (NEWMAN e CRAGG, 2020).

Desta forma, os compostos naturais podem ser úteis no tratamento de feridas, especialmente aqueles com propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante, o que pode ter repercussões positivas na qualidade de vida dos pacientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

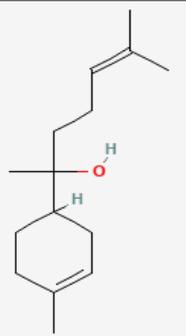
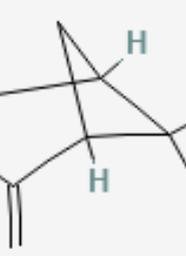
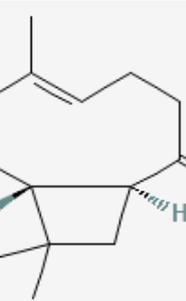
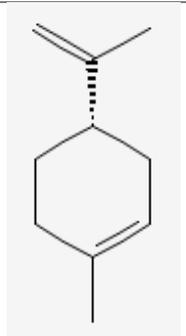
Este projeto foi fruto de uma parceria entre o Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental (LAFTE) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia - UFBA, Institute of Advanced Systems in Health - SENAI CIMATEC e o Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana.

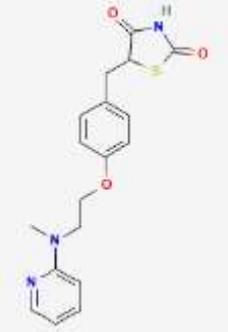
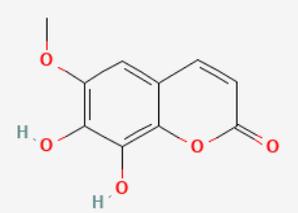
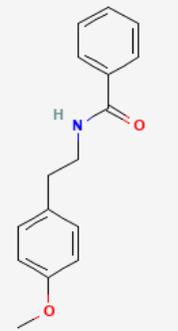
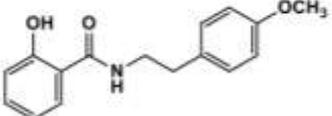
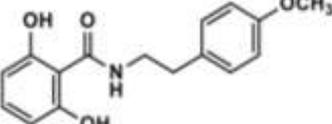
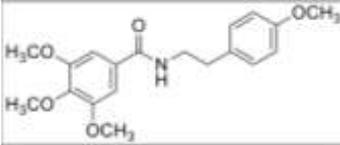
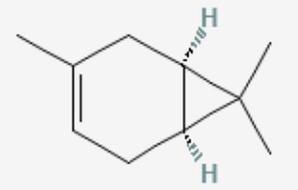
3.1 COMPOSTOS ESTUDADOS

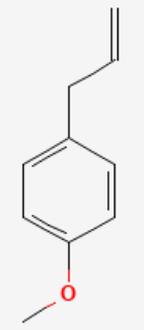
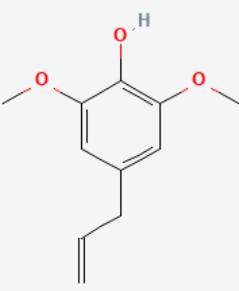
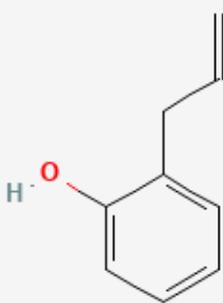
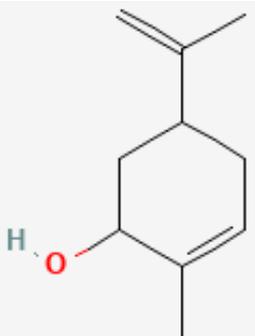
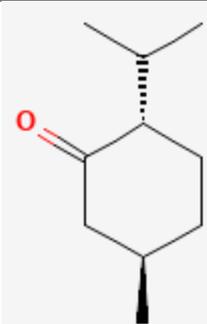
Os compostos usados neste estudo foram cedidos pelo Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental – LAFTE. Na tabela 1 a seguir estão dispostos tais compostos com suas fontes de extração, estrutura química e nomenclatura IUPAC.

Tabela 1. Compostos usados no estudo

NOME	NOMENCLATURA IUPAC	ESTRUTURA QUÍMICA	FONTE DE EXTRAÇÃO
Monnieriside A	5,7-dihydroxy-2- [[[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5- trihydroxy-6- (hydroxymethyl)oxan-2- yl]oxymethyl]chromen-4-one		<i>Evolvulus linarioides</i>

Alfa-bisabolol	(2 <i>R</i>)-6-methyl-2-[(1 <i>R</i>)-4-methylcyclohex-3-en-1-yl]hept-5-en-2-ol		<i>Matricaria chamomilla</i>
Óleo essencial de Patchouli	Álcool Patchouli		<i>Pogostemon cablin</i>
Óleo essencial de Jurema Branca	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene		<i>Mimosa verrucosa</i>
Óleo essencial de Copaíba	β-cariofileno		<i>Copaifera officinalis</i>
Óleo essencial de Verbena	l-Limonene		<i>Lippia alba</i>

Rosiglitazona	5-[[4-[2-[metil(piridin-2-il)amino]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona		Tiazolidinediona
Fraxetina	7,8-dihydroxy-6-methoxychromen-2-one		<i>Fraxinus rhyncophylla</i>
Riparina 1	N-[2-(4-metoxifenil)etil]benzamida		<i>Aniba riparia</i>
Riparina 2	N-(2-hidroxibenzoil)tiramina		<i>Aniba riparia</i>
Riparina 3	2,6-dihydroxy-N-[2-(4-metoxifenil)etil]benzamida		<i>Aniba riparia</i>
Riparina 4			<i>Aniba riparia</i>
Óleo essencial de Pimenta rosa	Delta.3-Carene		<i>Schinus terebinthifolius</i>
Vesículas extracelulares de probiótico	-	-	Probiótico

4-alillanisol	1-metoxi-4-prop-2-enilbenzeno		<i>Vitis rotundifolia</i>
4-alil-2,6-dimetoxifenol	2,6-dimetoxi-4-prop-2-enilfenol		<i>Illicium dunnianum</i>
2-alilfenol	2-prop-2-enilfenol		<i>Psidium guajava</i>
(-)-carveol	2-metil-5-prop-1-en-2-ilciclohex-2-en-1-ol		<i>Echinophora tournefortii</i>
(-)-mentona	(2S, 5R) -5-metil-2-propan-2-ilciclohexan-1-ona		<i>Xylopiaromatica</i>

Legenda: Os óleos essenciais foram representados pelo composto majoritário.

Fonte: PUBCHEM, 2023

O material vegetal, extração e isolamento do composto Monnieriside A foi segundo Pereira e cols. (2020). Já as riparinas (1, 2, 3 e 4) foram sintetizadas a partir de ácidos benzóicos sintéticos substituídos usando metodologia previamente descrita por Barbosa-Filho e cols. (1990). As vesículas extracelulares do probiótico foram extraídas de acordo com Evangelista e cols. (2019). Os óleos essenciais de Patchouli, Verbena, Jurema Branca e Pimenta rosa foram adquiridos comercialmente da empresa Akã Óleos Essenciais.

3.2 MÉTODO DE CULTIVO CELULAR DE FIBROBLASTOS

Fibroblastos isolados da linhagem de camundongos L929 foram mantidos em frascos de cultura com Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS; GIBCO) e 1% de estreptomicina. As Culturas foram mantidas em uma incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO₂, as quais foram rastreadas periodicamente para *mycoplasma*, contaminação bacteriana e fúngica (GOMES-FILHO et al., 2016; PUSNIK et al., 2016). O meio de cultura foi trocado a cada 2/3 dias ao se observar em microscópio (Olympus modelo IX51) a formação de uma monocamada celular, por volta de 90% de confluência. As células foram removidas usando solução de tripsina-EDTA 0,25% (Thermo Fisher Scientific) para expansão e uso em testes posteriores.

3.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR / CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade dos compostos naturais riparina I (Rip. I), riparina II (Rip. II), riparina III (Rip. III), riparina IV (Rip. IV), óleo essencial de copaíba, monnieriside A (MOA), alfa-bisabolol, óleo essencial de pimenta rosa (Pim. rosa), vesículas extracelulares de probiótico (VEPROBIO), óleo essencial de verbena, óleo essencial de patchouli, óleo essencial de jurema branca, rosiglitazona, fraxetina, 4-alillanisolol, 4-alil-2,6-dimetoxifenol, 2-alilfenol, (-)-carveol e (-)-mentona foi determinada segundo método proposto por Nascimento e cols. (2016) com modificações. Células de fibroblastos L929 foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade celular de 2×10^5 células/poço em meio DMEM suplementado conforme descrição anterior e incubadas por 24h a 37 °C e 5% CO₂. Após esse tempo, os compostos ativos foram adicionados em 7 concentrações, variando de 3,1 a 200 µM (ou µg/ml) (diluição seriada 1:2) em triplicata e incubados por 72h (NASCIMENTO et al., 2016). Após esse período, 20µL/poço de Alamar Blue (Invitrogen) foi adicionado às placas por aproximadamente 7h. As leituras

colorimétricas foram realizadas em espectrofotômetro com o comprimento de onda 570 e 600 nm (Fig. 4). Tween 20 foi usado como controle positivo (CTRL+) e células contendo meio de cultura e veículo como controles negativos (CTRL-). Dois experimentos independentes foram realizados e considerou-se não citotóxico aquele composto que apresentou uma viabilidade \geq 90% nas concentrações testadas.

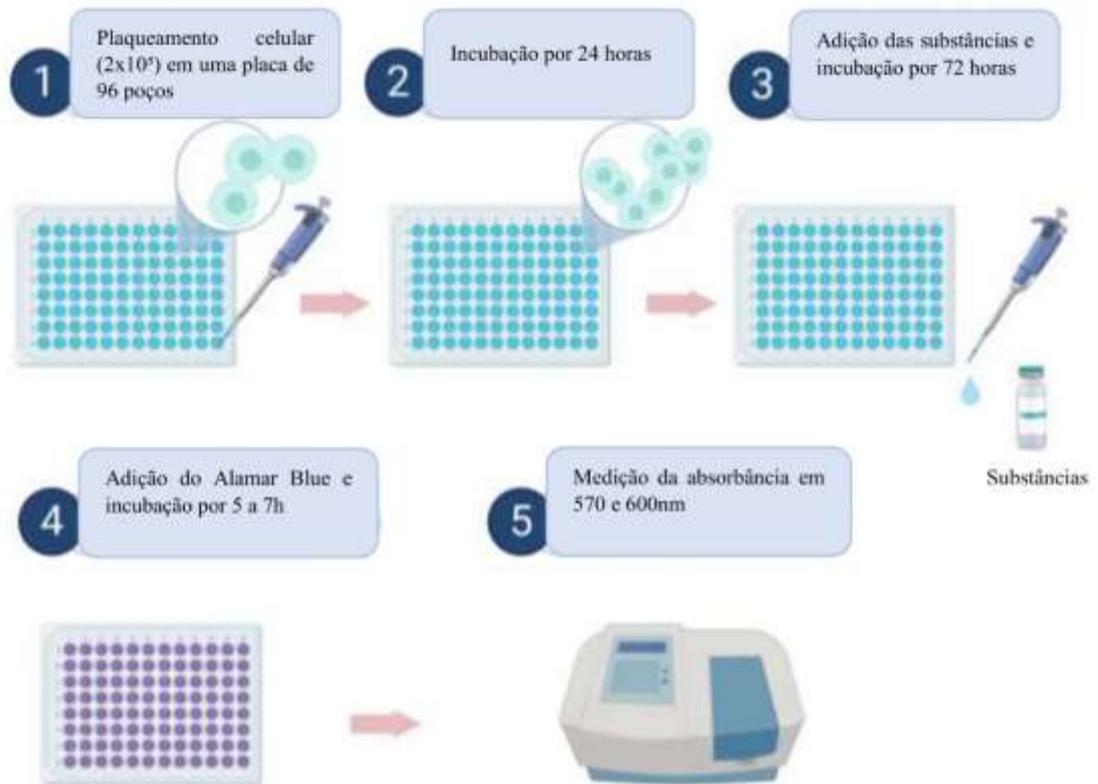


Figura 4. Esquema método alamar blue
Fonte: Adaptado de THE FERAL EXPLORER, 2019

3.4 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS NO ENSAIO “SCRATCH”

O ensaio *Scratch*, que mede a migração de fibroblastos, é utilizado como um *screening* para a identificação de compostos com potencial para o reparo tecidual. Células de fibroblastos L929 foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma densidade celular de 2×10^5 células/poço em 1 mL do meio DMEM suplementado conforme descrição anterior e incubadas por 24h a 37 °C e 5% CO₂ até a confluência de 90%. Em seguida, um arranhão linear (“ferida”) foi gerado na monocamada com uma ponteira de plástico estéril de 200 μ L. Quaisquer detritos celulares foram removidos lavando a placa com salina estéril (ALVES et al., 2020). Posteriormente, foram adicionadas concentrações diferentes (diluição seriada 1:4) das substâncias, a fim de fazer uma busca mais ampla da ação do composto, que se mostraram não citotóxicas na etapa

de triagem anterior, em 1mL de meio puro/poço. As culturas foram então mantidas em uma incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO₂. Asiaticoside (25µM), um potente agente cicatrizante, foi usado como controle positivo (CTRL+) e células contendo meio de cultura e veículo como controles negativos (CTRL-) (BOPAGE et al., 2018).

A migração celular foi determinada após 24h por meio de fotografia usando um microscópio de contraste de fase invertido (Olympus modelo IX51). A área de migração celular para o local da ferida foi quantificada usando ImageJ (Scion Corp., Frederick, MD, EUA) e apresentada como uma migração relativa comparada com t = 0, considerado como 100% (ALVES et al., 2020). A área de fechamento da “ferida” foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Área de migração (\%)} = (A_0 - A_n) / A_0 \times 100$$

Onde A₀ representa a área inicial da “ferida”, A_n representa a área da “ferida” no ponto (tempo) de medição (HU et al., 2018).

3.5 COLETA DE MATERIAL PARA ELISA E qRT-PCR

Para avaliar o efeito dos compostos não citotóxicos em cultura de fibroblastos, foram utilizados apenas os compostos, em sua concentração de efeito máximo, e que apresentaram os melhores resultados no teste de migração celular (Fig. 5). Os sobrenadantes da cultura de fibroblastos e as células foram coletados 24h após os tratamentos e armazenados em -80°C, para posterior processamento para ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (qRT-PCR), como descrito abaixo.

3.5.1 Método qRT-PCR

O RNA total foi extraído de células L929 usando o reagente de extração TRIZOL® (Thermo Fisher Científico). A quantificação do RNA foi realizada em um espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Científico) e a pureza das amostras obtidas pela razão A260 nm: A280 nm demonstrou uma proporção entre 1,80 e 2,26 (SANTOS et al., 2020). O kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foi usado para síntese de cDNA a partir de 1 µg de RNA, de acordo com recomendações do fabricante. Para o ensaio de expressão gênica foram usadas sondas TaqMan e primers, e incluídos na reação controles negativos. Todas as reações foram feitas em quadruplicata e analisadas no aparelho ABI7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) sob

condições térmicas de amplificação padronizadas segundo determina o fabricante. A média dos Ct (cycle threshold) obtidos das quadruplicatas foram usadas para calcular a expressão do gene alvo, utilizando como normalizador, o gene endógeno *Gapdh* e a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os Cts com variação de coeficiente maior que 5% foram excluídos da análise.

Para analisar a expressão de genes de cicatrização em fibroblastos usou-se os seguintes conjuntos de primers (PDGF-B, CXCL15, COL4A1 e VEGF) e sondas (IGF-1, FGF-2 e COL1A2) adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) disponíveis para camundongos: Tabela 2 e 3.

Tabela 2. Informações de sondas usadas para qRT-PCR

GENE	SONDA
IGF-1	Mm00439561_m1
FGF-2	Mm01285715_m1
COL1A2	Mm00483888_m1
GAPDH	Mm99999915_g1

Tabela 3. Informações de primers usados para qRT-PCR

PRIMER	SEQUÊNCIA 5'- 3'	AMPLICON (bp)
PDGF-B Reverse	GTGCTCGGGTCATGTTCAAGT	92
PDGF-B Forward	CATCCGCTCCTTTGATGATCTT	
CXCL15 Reverse	TGCTATCACTTCCTTTCTGTTGC	183
CXCL15 Forward	CAAGGCTGGTCCATGCTCC	
VEGF Reverse	CTGTCCTGGTATTGAGGGTGG	160
VEGF Forward	GAGGTCAAGGCTTTTGAAGGC	
COL4A1 Reverse	ACGTGGCCGAGAATTTACCC	238
COL4A1 Forward	CTGGCACAAAAGGGACGAG	
GAPDH Reverse	GGGGTCGTTGATGGCAACA	123
GAPDH Forward	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	

3.5.2 Ensaio Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

A citocina interleucina 10 (IL-10) foi quantificada pela técnica de ELISA sanduíche utilizando kits comerciais disponíveis para camundongos (R&D Systems, Minneapolis, EUA) a partir dos sobrenadantes coletados anteriormente.

Placa de 96 poços (NUNC – IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) foi sensibilizada com o anticorpo de captura (anticorpo monoclonal purificado anti-citocina investigada), diluído em PBS, a 4°C overnight. As placas foram lavadas com tampão de lavagem e em seguida adicionadas a solução de bloqueio (PBS + BSA 1%) e deixadas por 1 hora à temperatura ambiente com o objetivo de bloquear sítios não específicos. A placa foi lavada mais uma vez e incubada com as amostras em quadruplicata e a citocina padrão em várias concentrações, ficando overnight a 4°C. Após a lavagem da placa, foi adicionado o anticorpo de detecção e a placa foi incubada por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após as lavagens, adicionou-se a

enzima estreptoavidina diluída 1:200 por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após as lavagens, a reação foi revelada com solução reveladora, o TMB (tetrametilbenzidina), a placa foi incubada por mais 15 minutos à temperatura ambiente. O bloqueio da reação foi realizado pela adição de ácido fosfórico 1:20. A leitura da densidade óptica foi determinada por espectrofotômetro (Spectra Max 190 - Molecular Devices, Califórnia, EUA), no comprimento de onda de 450nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1 (Molecular Devices) e os resultados são expressos em picogramas de citocina por miligrama.

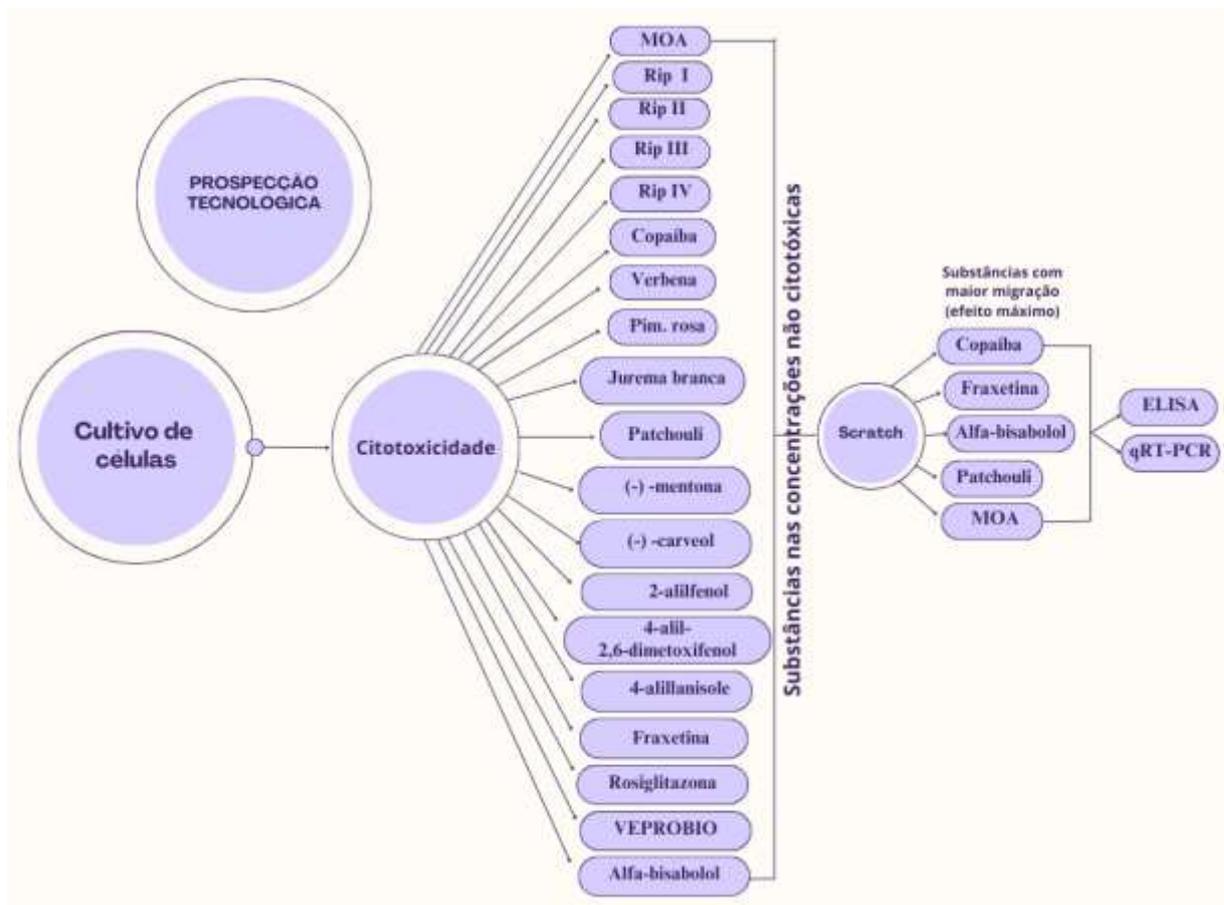


Figura 5. Fluxograma da metodologia

3.6 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS ATRAVÉS DA MINERAÇÃO DE PATENTES

A prospecção tecnológica foi realizada através de pesquisa documental exploratória em base de dados de patentes e em sites de revistas científicas, numa abordagem qualitativa e quantitativa. O mapeamento de patentes foi realizado por meio do banco de dados Orbit Intelligence, produzido pela Questel Orbit Inc, empresa franco-americana e uma das líderes mundiais nesse segmento desde a década de 1970. A sintaxe para acessar os dados de patente

relacionados ao biomaterial utilizado na cicatrização de feridas foi (WOUND HEALING)/TI/AB/CLMS AND (A61L-2300)/IPC/CPC. As palavras-chave foram, portanto, digitadas nos campos de busca TI (Título), AB (Abstract) e CLMS (Claims), conforme apresentado na sintaxe. Além disso, determinamos a Classificação Internacional de Patentes (IPC) para obter um portfólio mais alinhado com a proposta de pesquisa. O IPC escolhido foi o A61L-2300, que significa materiais biologicamente ativos usados em curativos, curativos, compressas absorventes ou dispositivos médicos. Somente patentes depositadas após 2003 foram incluídas neste estudo, e o levantamento foi realizado em 23 de março de 2023. Os critérios de exclusão para a seleção de documentos foram:

1. Exclusão de patentes iguais e não relacionadas;
2. Exclusão de patentes relativas a dispositivos utilizados para administração ou métodos de extração de compostos bioativos;

O referencial teórico sobre o tema foi descrito em livros, artigos, teses e nas bases de dados Scielo, Lilacs e Pubmed.

Com base nos resultados encontrados, analisamos os depositantes e pedidos das patentes. Para análise dos dados, utilizamos representações gráficas fornecidas pelo banco de dados e planilhas eletrônicas para organizar os registros obtidos. Por fim, apresentamos as perspectivas para o setor analisado, considerando a compilação dessas informações.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão a partir das análises feitas. Comparações entre os tratamentos foram feitas usando o teste one-way ANOVA com pós teste de Tukey. Os resultados foram analisados usando o programa Prism 8 Computer Software. Diferenças estatísticas com $p < 0.05$ foram consideradas significantes.

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

O ensaio de viabilidade celular ou ensaio de citotoxicidade é um teste que analisa células metabolicamente ativas em uma cultura celular. Observa-se no presente trabalho que a viabilidade celular na presença dos óleos essenciais de Jurema branca, Pimenta rosa, Verbena e Copaíba (Fig. 6, 7, 8 e 9, respectivamente) foi reduzida a 75% quando as células estavam em

contato com os compostos na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,0001$), enquanto para as concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,1 $\mu\text{g/ml}$ a viabilidade foi superior a 90% em comparação ao controle negativo. Por outro lado, em comparação ao controle negativo, o óleo essencial de Patchouli (Fig. 10) mostrou efeito citotóxico nas concentrações que variaram entre 50 a 200 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,0001$).

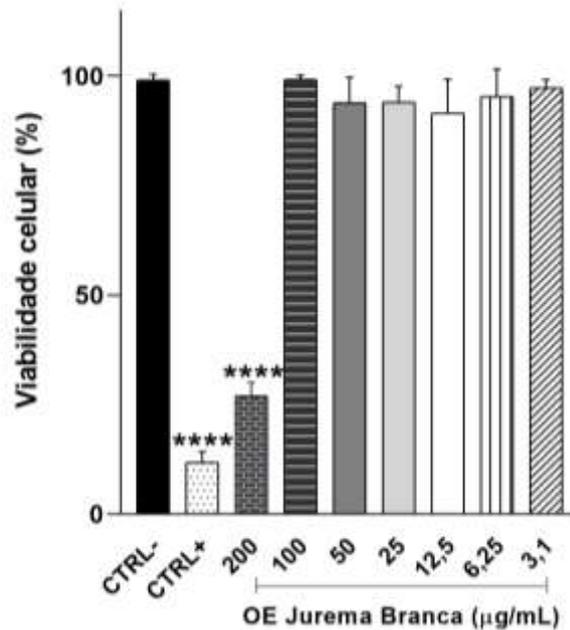


Figura 6. Efeito do óleo essencial (OE) de Jurema branca sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações do OE (3,1 a 200 $\mu\text{g/mL}$), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

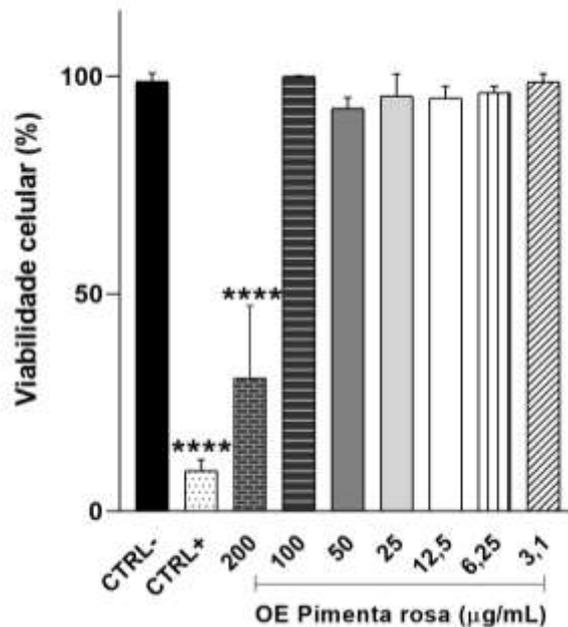


Figura 7. Efeito do óleo essencial (OE) de Pimenta rosa sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações do OE (3,1 a 200 $\mu\text{g/mL}$), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como

média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

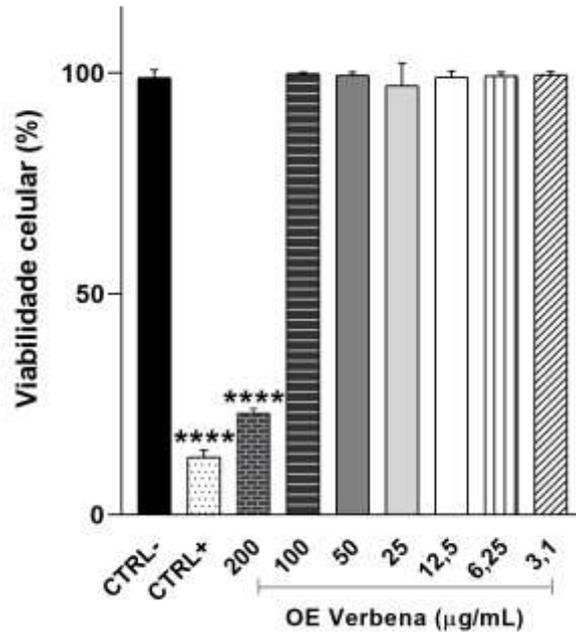


Figura 8. Efeito do óleo essencial (OE) de Verbena sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações do OE (3,1 a 200µg/mL), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

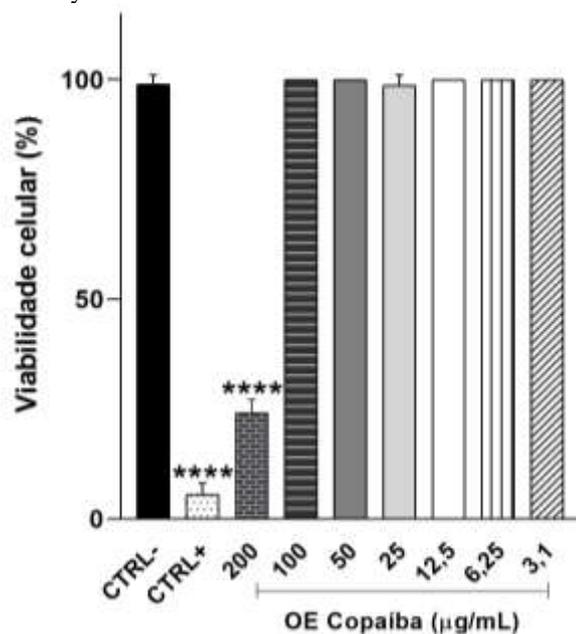


Figura 9. Efeito do óleo essencial (OE) de Copaiba sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações do OE (3,1 a 200µg/mL), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

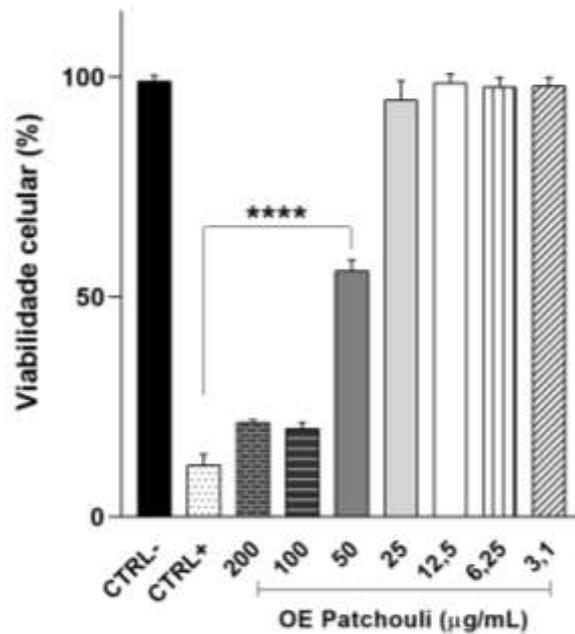


Figura 10. Efeito do óleo essencial (OE) de Patchouli sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações do OE (3,1 a 200µg/mL), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

As concentrações testadas para riparinas 1, 2, 3 e 4 (Fig. 11, 12, 13 e 14, sequencialmente) não foram consideradas citotóxicas.

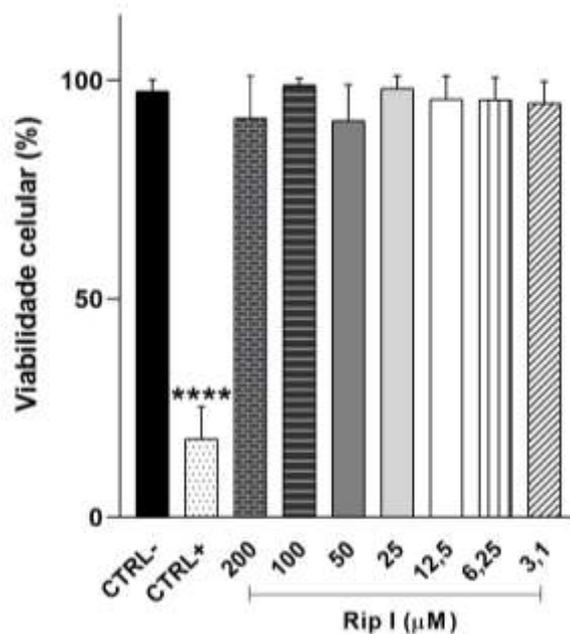


Figura 11. Efeito da riparina 1 (Rip I) sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações de riparina (3,1 a 200µM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

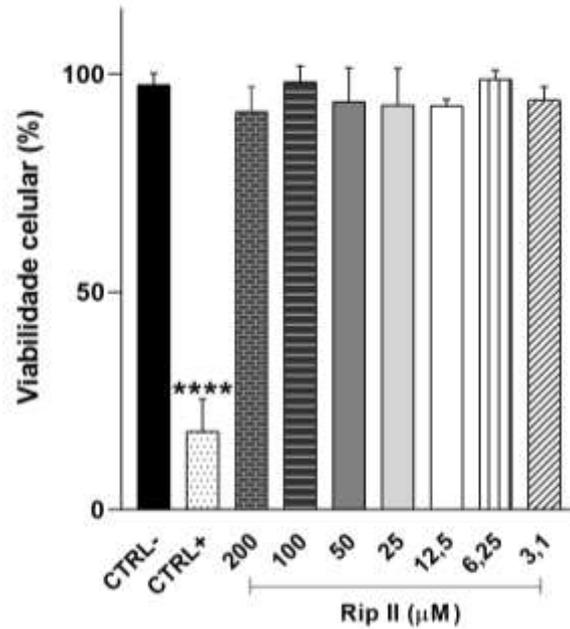


Figura 12. Efeito da riparina 2 (Rip II) sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações de riparina (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

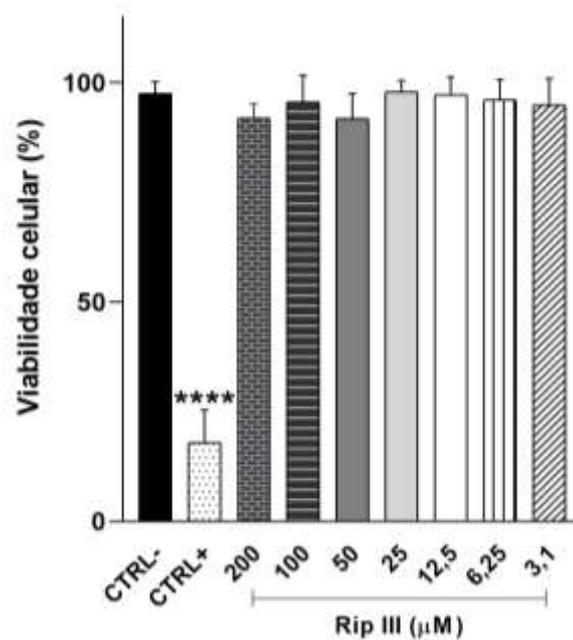


Figura 13. Efeito da riparina 3 (Rip III) sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações de riparina (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

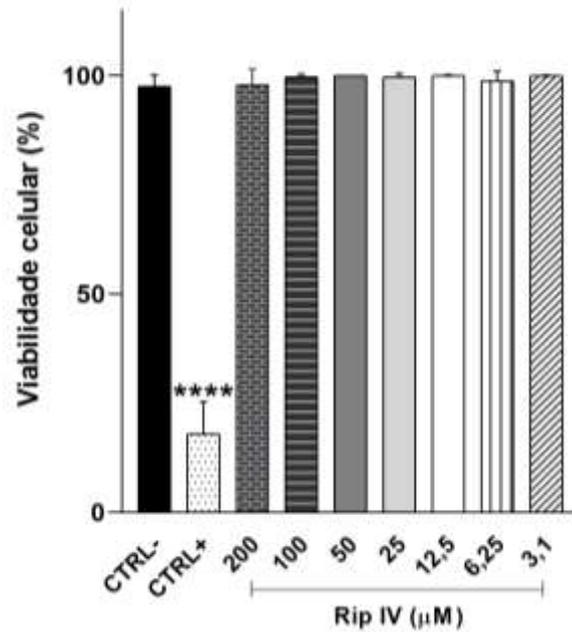


Figura 14. Efeito da riparina 4 (Rip IV) sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações de riparina (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Monnieriside A (MOA) (Fig. 15), alfa-bisabolol (Fig. 16), vesículas extracelulares de probiótico (VEPROBIO) (Fig. 17), fraxetina (Fig. 18), 4-alillanisol (Fig. 19), 4-alil-2,6-dimetoxifenol (Fig. 20), 2-alilfenol (Fig. 21), (-)-carveol (Fig. 22) e (-)-mentona (Fig. 23) não foram consideradas citotóxicas em nenhuma concentração testada. Já a rosiglitazona apresentou citotoxicidade nas concentrações de 200 e 100 μ M (Fig. 24) em comparação ao controle negativo ($p < 0,0001$).

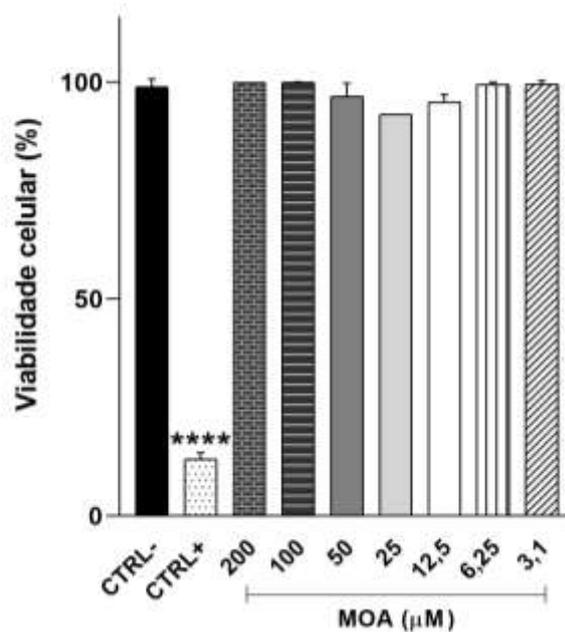


Figura 15. Efeito de monnieriside A (MOA) sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações de MOA (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

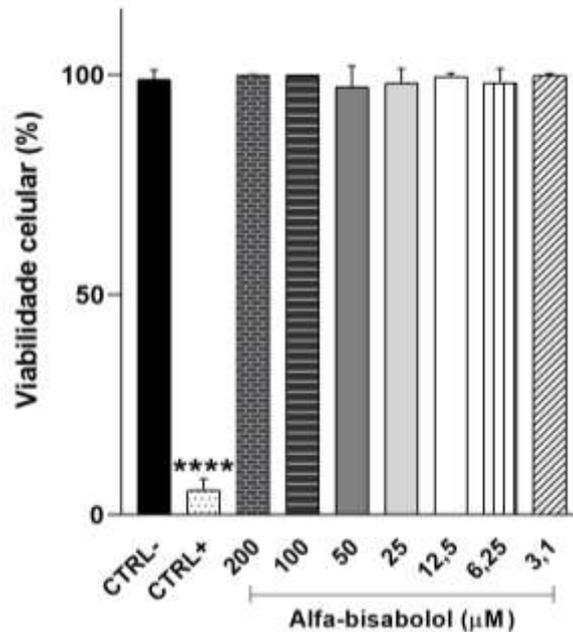


Figura 16. Efeito de alfa-bisabolol sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações de alfa-bisabolol (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

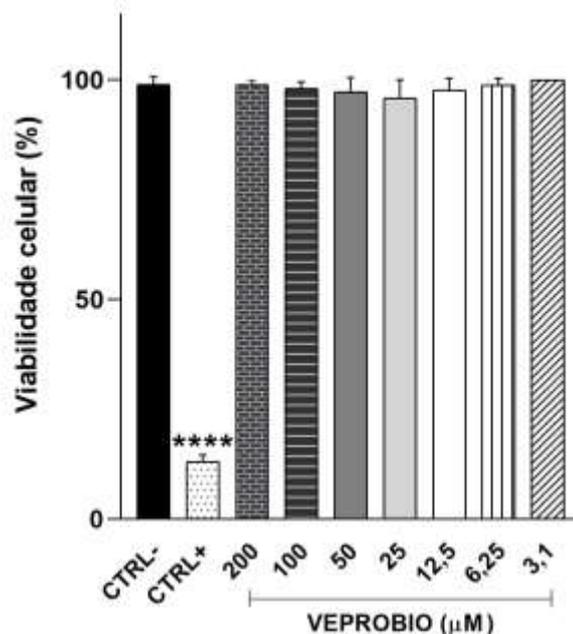


Figura 17. Efeito de vesículas extracelulares de probiótico (VEPROBIO) sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações de VEPROBIO (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

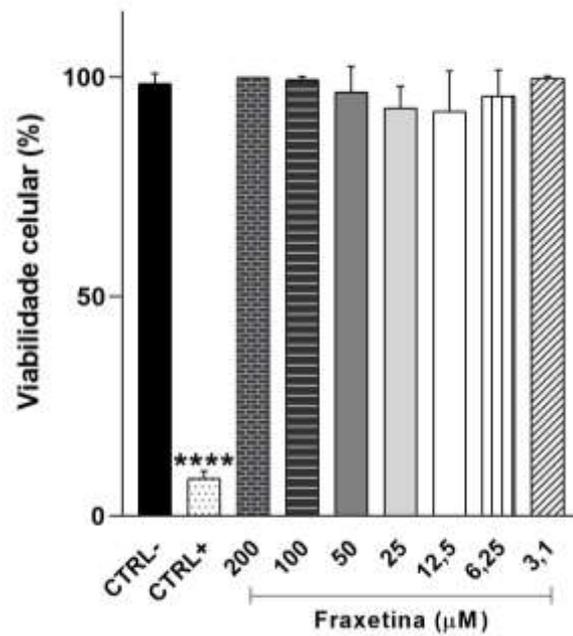


Figura 18. Efeito de fraxetina sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações de fraxetina (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

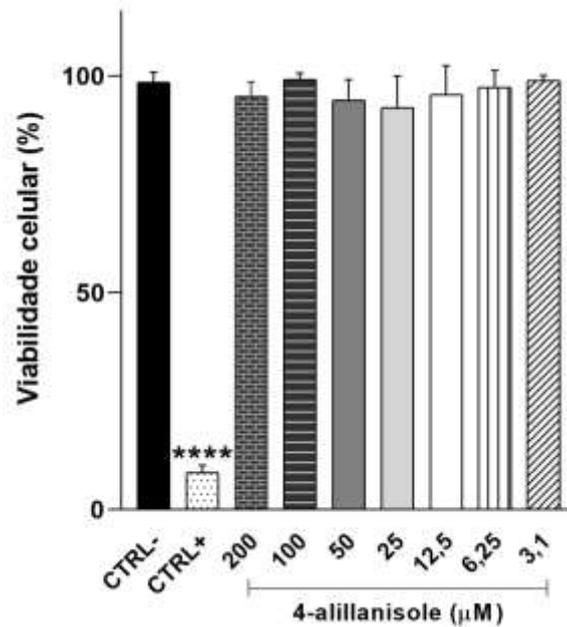


Figura 19. Efeito de 4-alillanisol sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações de 4-allylanisol (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

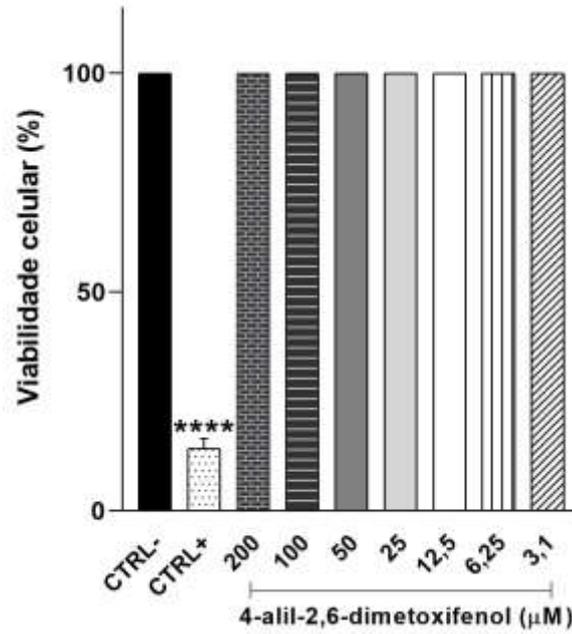


Figura 20. Efeito de 4-alil-2,6-dimetoxifenol sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações de 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

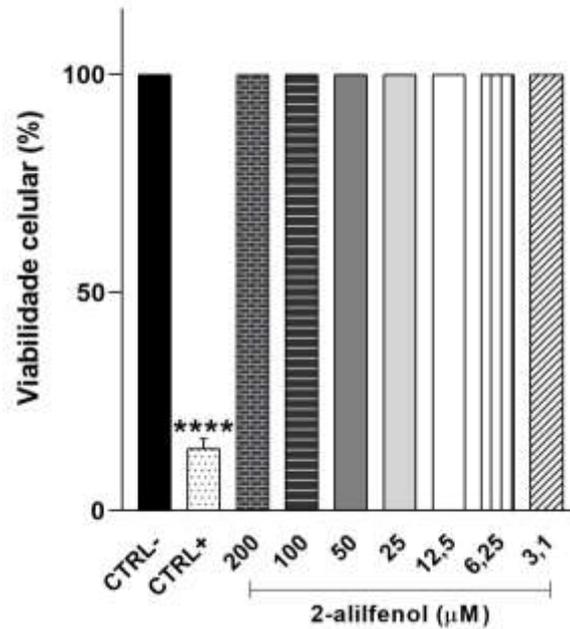


Figura 21. Efeito de 2-alilfenol sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações de 2-allylphenol (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

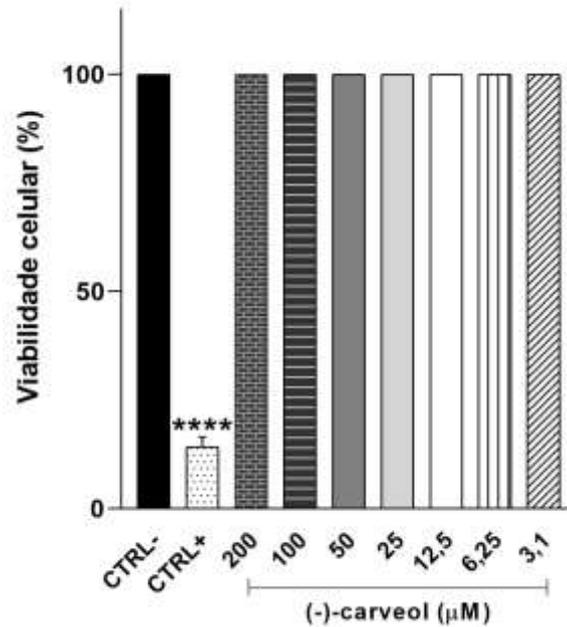


Figura 22. Efeito de (-)-carveol sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações de (-)-carveol (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

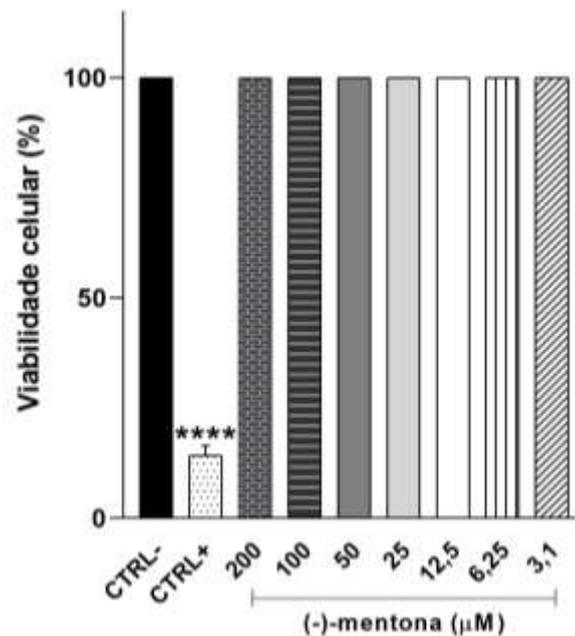


Figura 23. Efeito de (-)-mentona sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações (-)-menthone (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

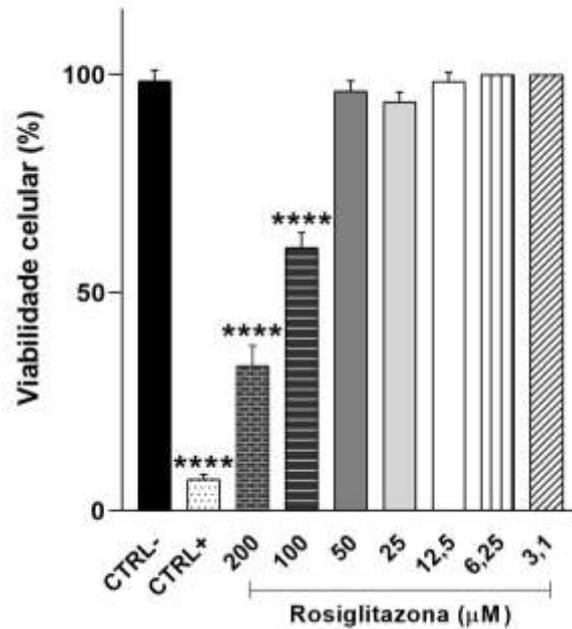


Figura 24. Efeito de Rosiglitazona sobre a viabilidade de fibroblastos L929. Diferentes concentrações Rosiglitazona (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou Tween 20 (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 72h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Com o objetivo de evitar erros de interpretação de resultados, o teste de viabilidade celular foi usado para determinar as faixas de concentração de cada composto, que seriam testadas nos ensaios de migração de fibroblastos. Desta forma, para o ensaio *scratch*, foram utilizadas as seguintes concentrações e compostos: óleos essenciais de jurema branca, pimenta rosa, verbena e copaíba $\leq 100\mu\text{g/mL}$; o óleo essencial de patchouli $\leq 25\mu\text{g/mL}$; as riparinas 1, 2, 3 e 4, MOA, alfa-bisabolol, VEPROBIO, fraxetina, 4-alillanisolol, 4-alil-2,6-dimetoxifenol, 2-alilfenol, (-)-carveol e (-)-mentona em concentrações $\leq 200\mu\text{M}$; por fim, a rosiglitazona na concentração $\leq 50\mu\text{M}$.

4.2 MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS / *SCRATCH*

Para estudar o potencial cicatrizante dos compostos naturais foi realizado o ensaio de *scratch* em fibroblastos L929. Esse ensaio de migração celular é utilizado como um *screening* para a identificação de compostos com potencial no reparo de feridas. Para o entendimento didático, o “gap” formado na cultura de fibroblasto, com a utilização da micropipeta, foi designado, para este estudo, como “ferida” e os percentuais descritos representam a área da “ferida que foi reparada” após estimulação com os compostos estudados.

Os resultados mostraram que o óleo essencial de Patchouli nas concentrações de 6,25 e 1,56 $\mu\text{g/ml}$ estimulou, em 24h, a migração de fibroblasto resultando em um crescimento celular confluyente capaz de preencher 70,5% e 76% da área da “ferida” ($p < 0,05$ e $p < 0,0005$), respectivamente (Fig. 25). O óleo de copaíba teve resultado somente com 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$) (Fig. 26), estimulando o fechamento de 55,5% da área da “ferida”. O composto bioativo MOA também estimulou a migração nas concentrações de 50 e 12,5 μM , sendo a área preenchida de 66,75% e 71,5% ($p < 0,0005$ e $p < 0,0001$) (Fig. 27). Em relação ao alfa-bisabolol, a concentração de 12,5 μM ($p < 0,05$) mostrou maior efeito, com crescimento celular confluyente capaz de preencher 40,5% da área da “ferida” (Fig. 28). Estes resultados são significativos em comparação ao controle negativo.

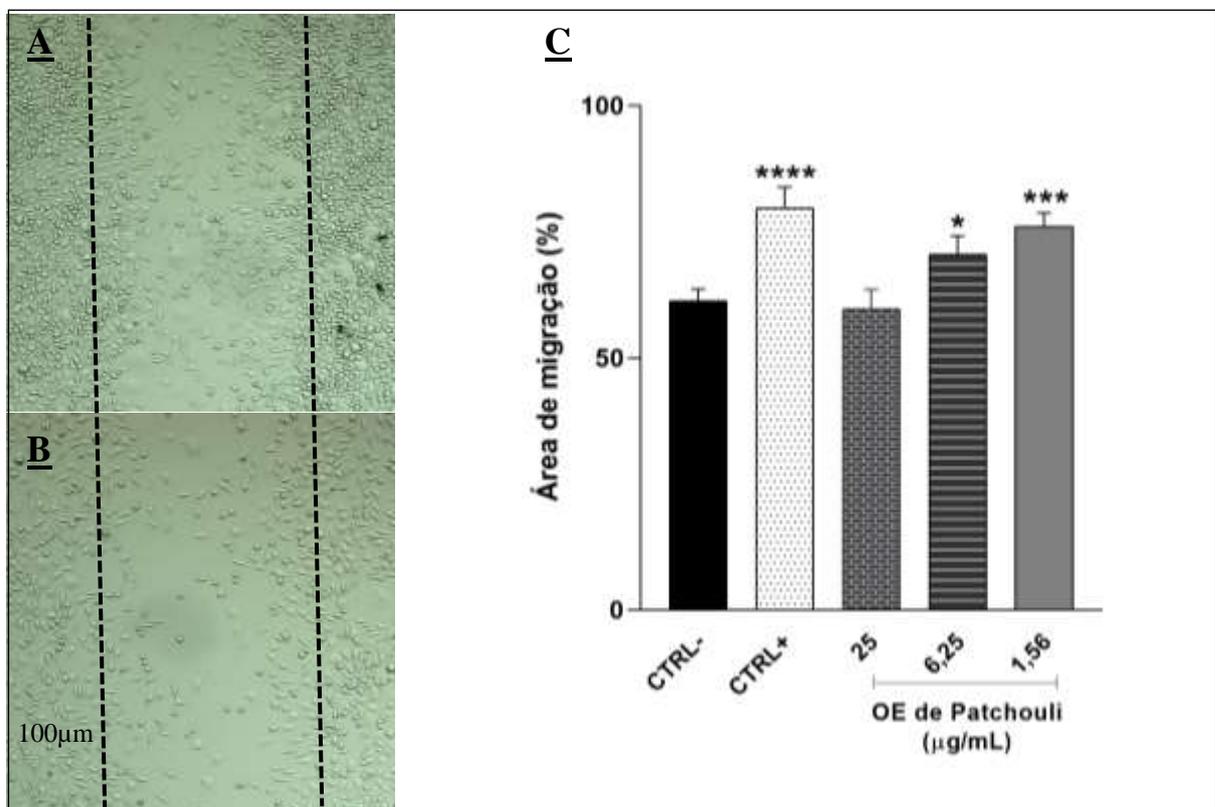


Figura 25. Efeito do óleo essencial (OE) de Patchouli sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações do OE (1,56 a 25 $\mu\text{g/mL}$), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. (A) Área de cicatrização da ferida tratada com OE em comparação com o controle negativo (B) e expresso como uma porcentagem (C). Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. * Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,05$); *** diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0005$); **** diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

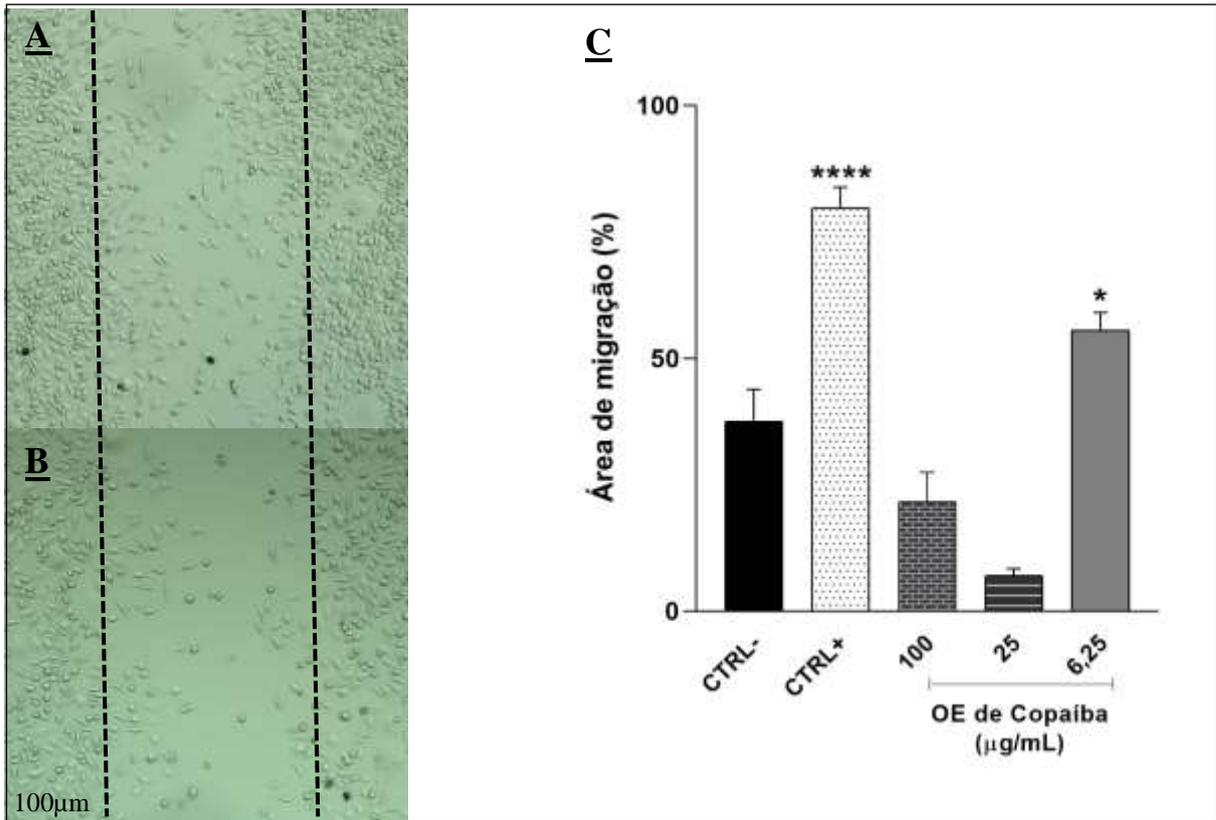


Figura 26. Efeito do óleo essencial (OE) de Copaíba sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações do OE (6,25 a 100µg/mL), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. (A) Área de cicatrização da ferida tratada com OE em comparação com o controle negativo (B) e expresso como uma porcentagem (C). Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. * Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,05$); **** diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

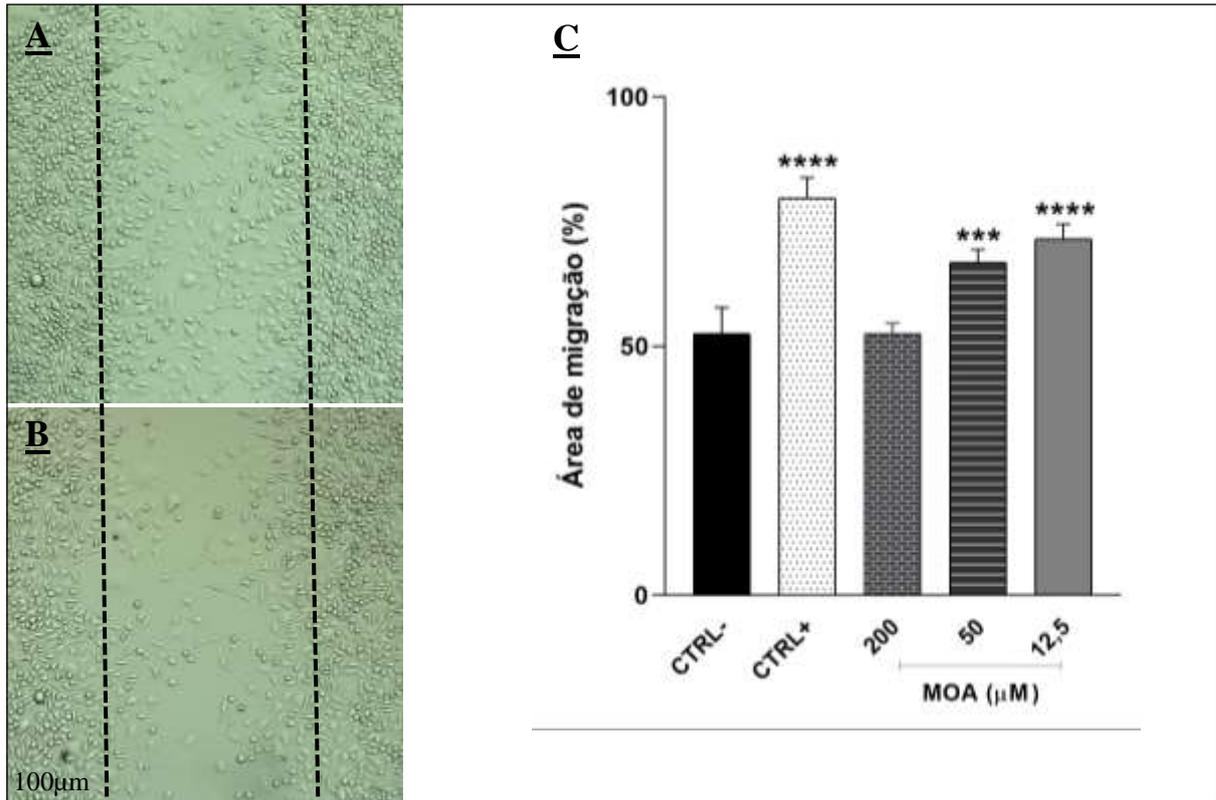


Figura 27. Efeito de monnieriside A (MOA) sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações do MOA (12,5 a 200μM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. (A) Área de cicatrização da ferida tratada com MOA em comparação com o controle negativo (B) e expresso como uma porcentagem (C). Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão. *** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0005$); **** diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

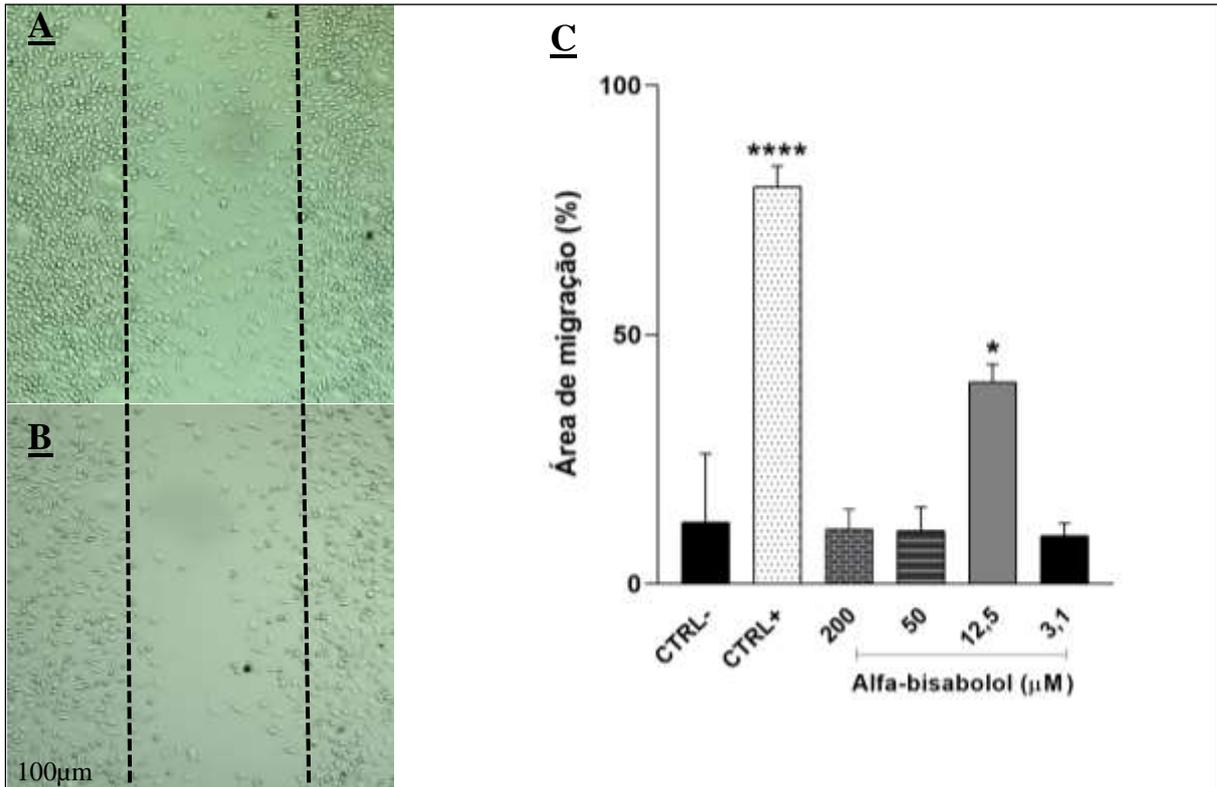


Figura 28. Efeito de alfa-bisabolol sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações do alfa-bisabolol (3,1 a 200μM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. (A) Área de cicatrização da ferida tratada com alfa-bisabolol em comparação com o controle negativo (B) e expresso como uma porcentagem (C). Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão. * Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,05$); **** diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Em relação à fraxetina, observou-se (Fig. 29) que menores concentrações eram capazes de estimular a migração de maneira mais eficiente quando se comparou com as concentrações maiores. Dessa forma, um novo teste (Fig. 30) foi realizado, porém com concentrações menores para verificar uma possível ação. O novo ensaio mostrou que a concentração de 0,01μM ($p < 0,0001$), estimulou a migração dos fibroblastos para área da “ferida”, com crescimento confluyente na ordem de 54,66%.

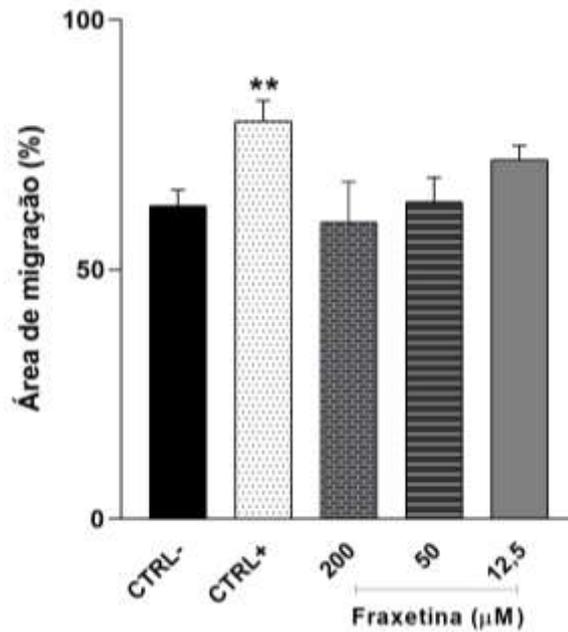


Figura 29. Efeito de fraxetina sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de fraxetina (12,5 a 200 μM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. ** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,005$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

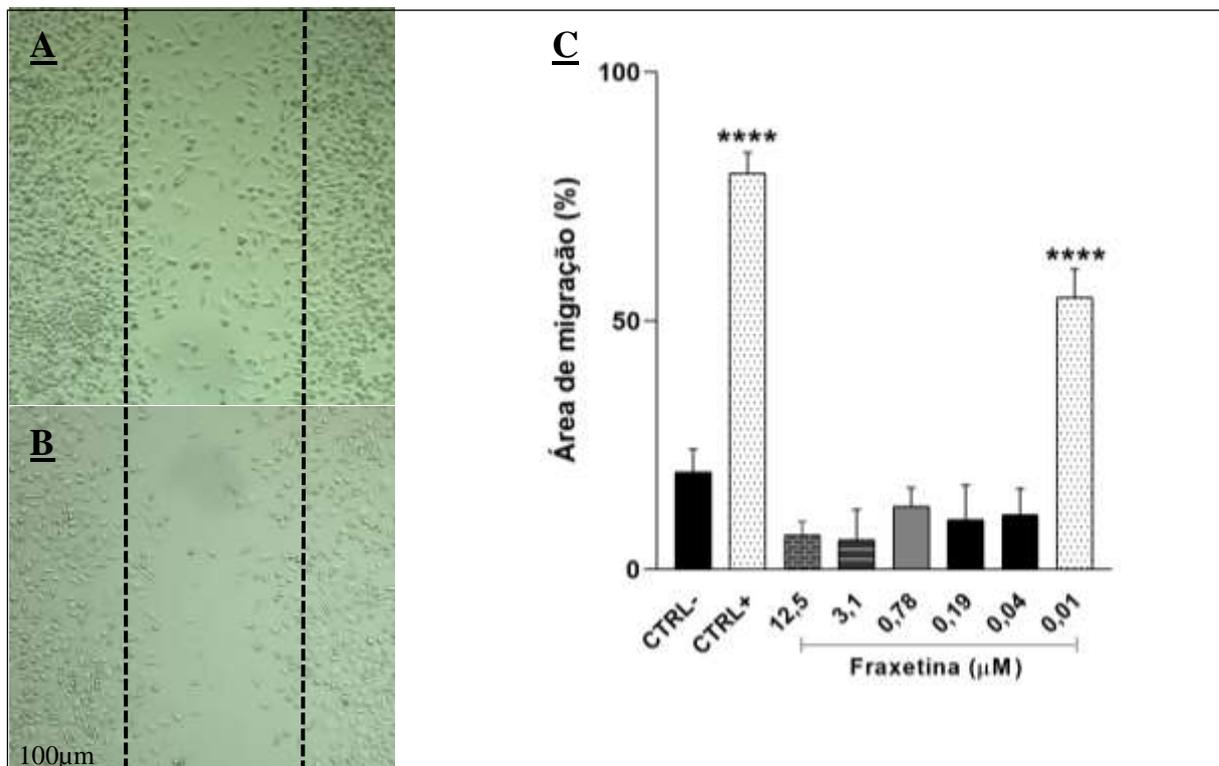


Figura 30. Repetição do efeito de fraxetina sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de fraxetina (0,01 a 12,5 μM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. (A) Área de cicatrização da ferida tratada com fraxetina em comparação com o controle negativo (B) e expresso como uma porcentagem (C). Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. * Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,05$); **** diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Os óleos essenciais de Jurema branca (Fig. 31), Pimenta rosa (Fig. 32) e Verbena (Fig. 33), bem como as substâncias Riparina 1, 2, 3 e 4 (Fig. 34, 35, 36 e 37, respectivamente), as vesículas de probióticos (VEPROBIO) (Fig. 38), os compostos 4-alillanisol (Fig. 39), 4-alil-2,6-dimetoxifenol (Fig. 40), 2-alilfenol (Fig. 41), (-)-carveol (Fig. 42), (-)-mentona (Fig. 43) e rosiglitazona (Fig. 44), embora não citotóxicos, não foram capazes de estimular a migração de fibroblastos quando comparados aos resultados com o controle negativo.

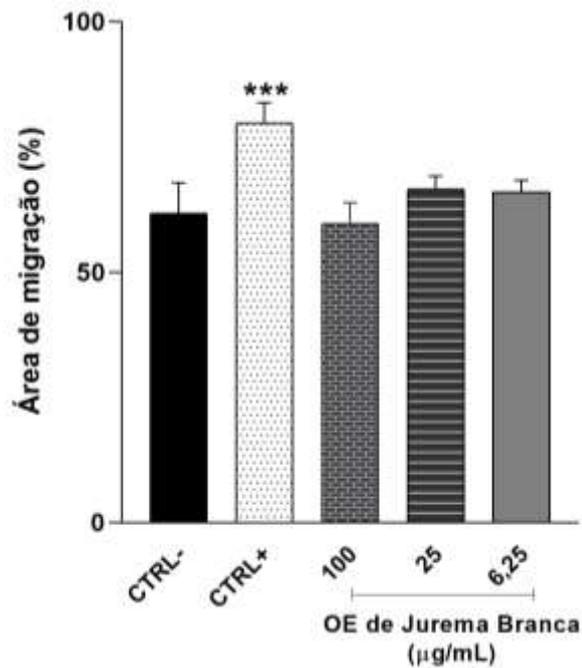


Figura 31. Efeito do óleo essencial (OE) de Jurema branca sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de OE (6,25 a 100μg/mL), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão. *** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0005$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

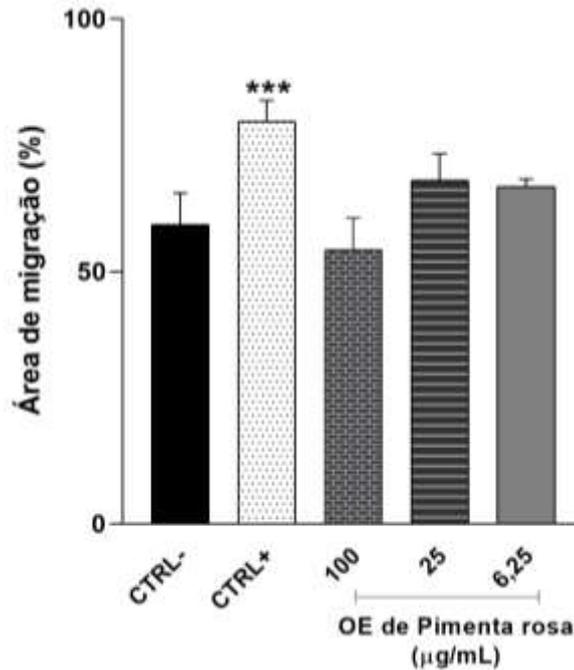


Figura 32. Efeito do óleo essencial (OE) de Pimenta rosa sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de OE (6,25 a 100µg/mL), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. *** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0005$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

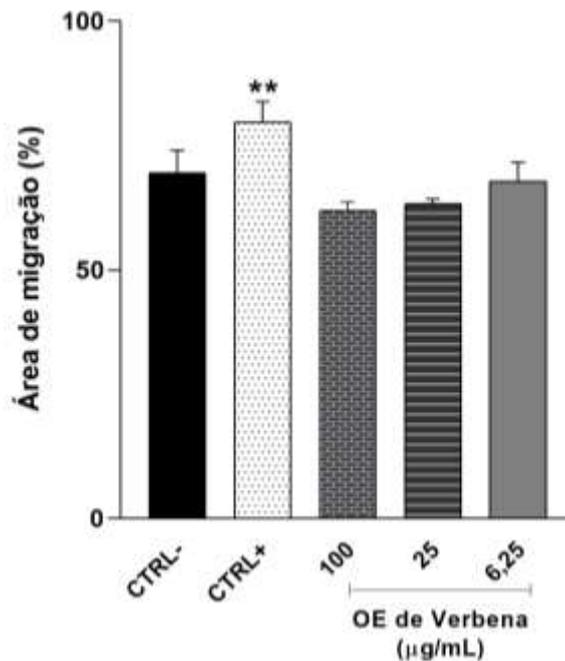


Figura 33. Efeito do óleo essencial (OE) de Verbena sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de OE (6,25 a 100µg/mL), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. ** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,005$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

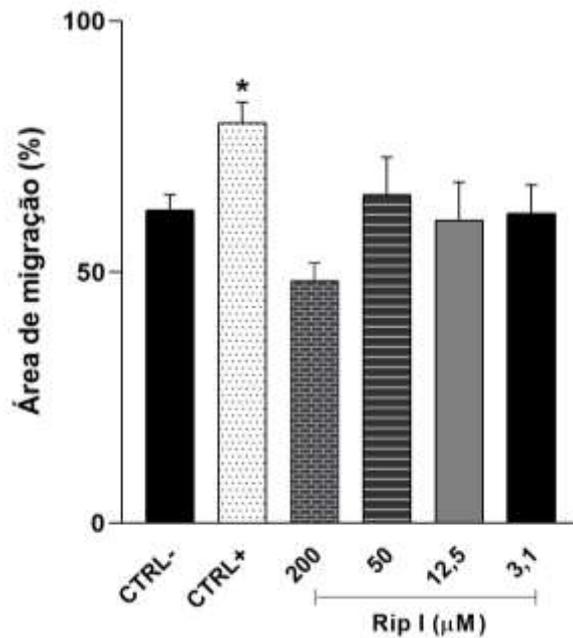


Figura 34. Efeito de Riparina 1 (Rip I) sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de riparina (3,1 a 200μM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão. * Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,05$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

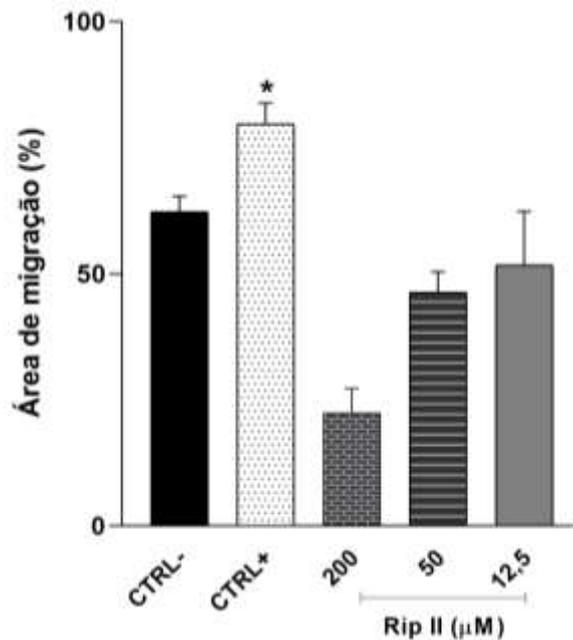


Figura 35. Efeito de Riparina 2 (Rip II) sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de riparina (12,5 a 200μM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão. * Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,05$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

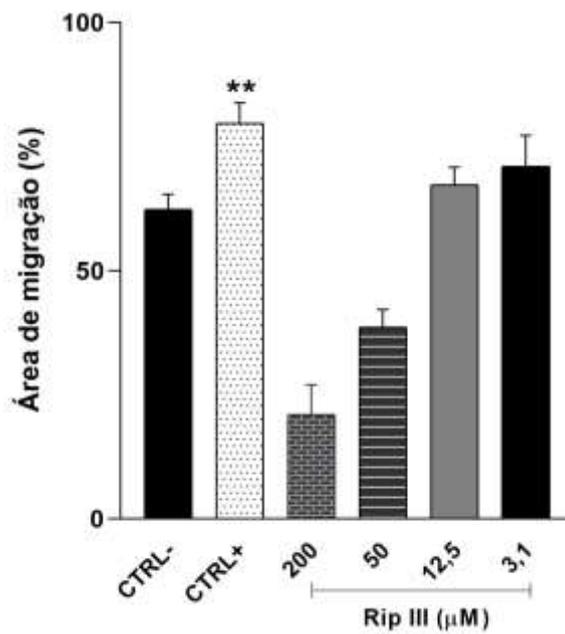


Figura 36. Efeito de Riparina 3 (Rip III) sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de riparina (3,1 a 200μM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão. ** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,005$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

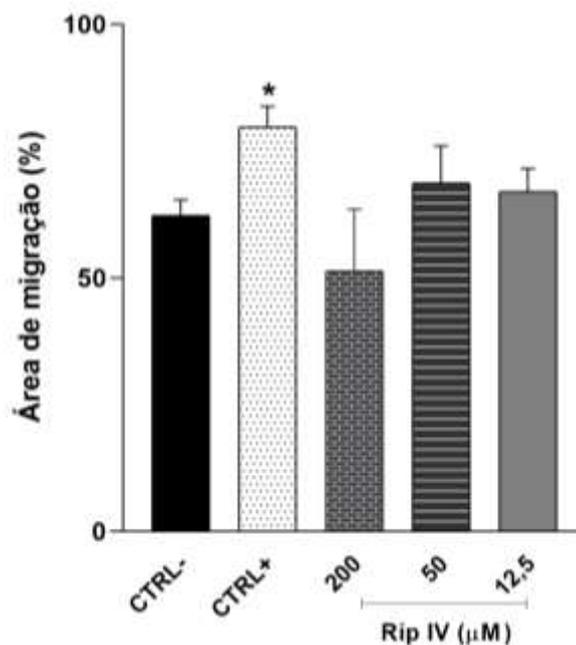


Figura 37. Efeito de Riparina 4 (Rip IV) sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de riparina (12,5 a 200μM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão. * Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,05$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

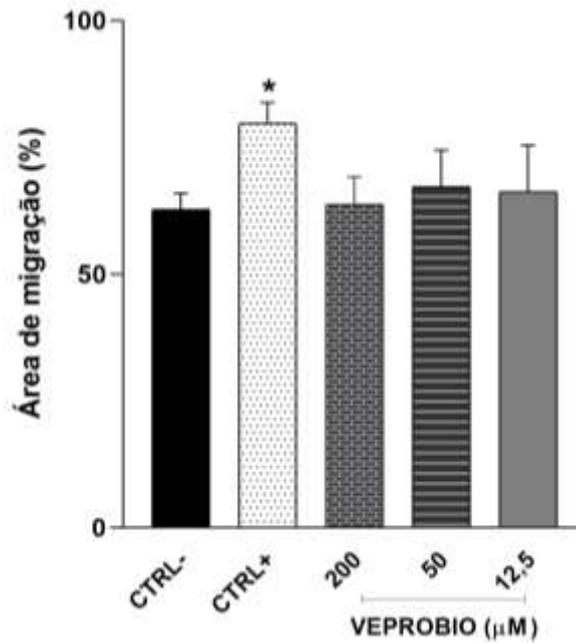


Figura 38. Efeito de vesículas extracelulares de probiótico (VEPROBIO) sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de VEPROBIO (12,5 a 200μM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão. * Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,05$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

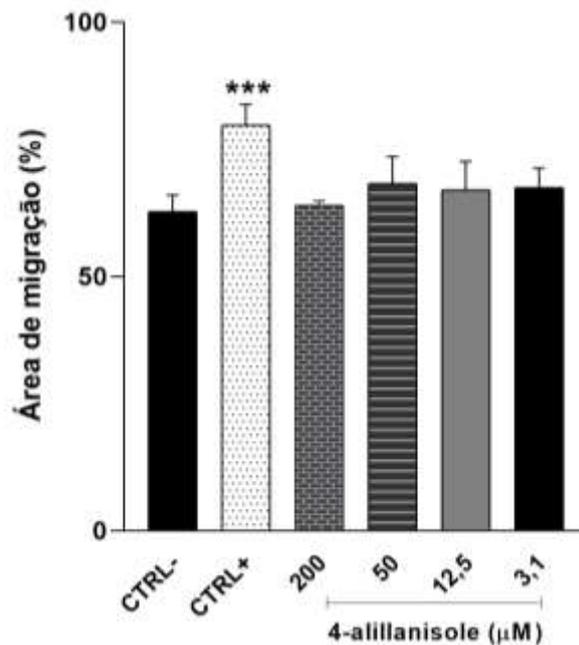


Figura 39. Efeito de 4-allianisole sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de 4-allylanisole (3,1 a 200μM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão. *** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0005$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

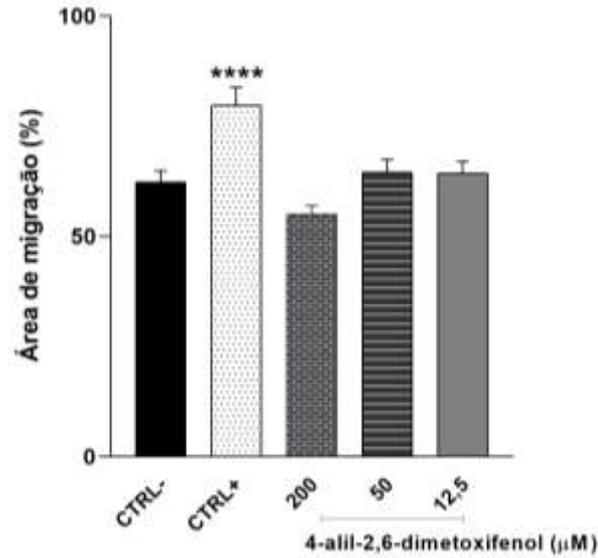


Figura 40. Efeito de 4-alil-2,6-dimetoxifenol sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol (12,5 a 200 μM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. **** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

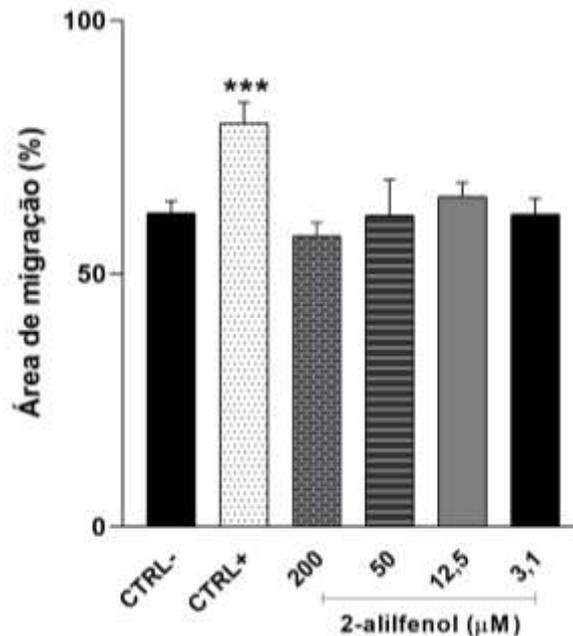


Figura 41. Efeito de 2-alilfenol sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de 2-allylphenol (3,1 a 200 μM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. *** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0005$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

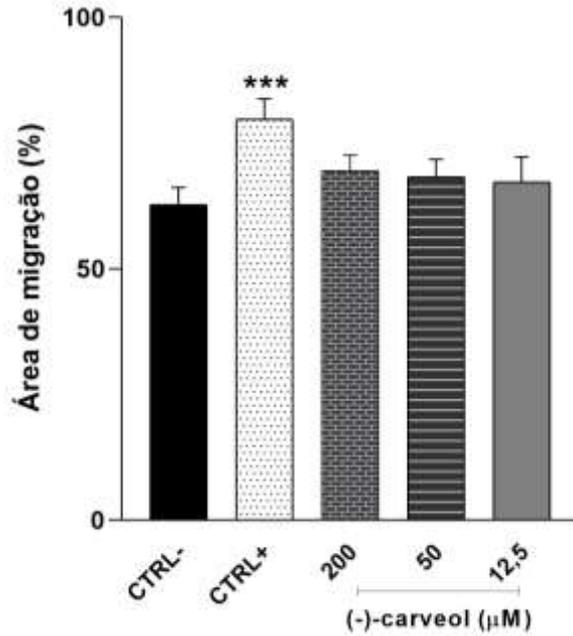


Figura 42. Efeito de (-)-carveol sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de (-)-carveol (12,5 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. *** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0005$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

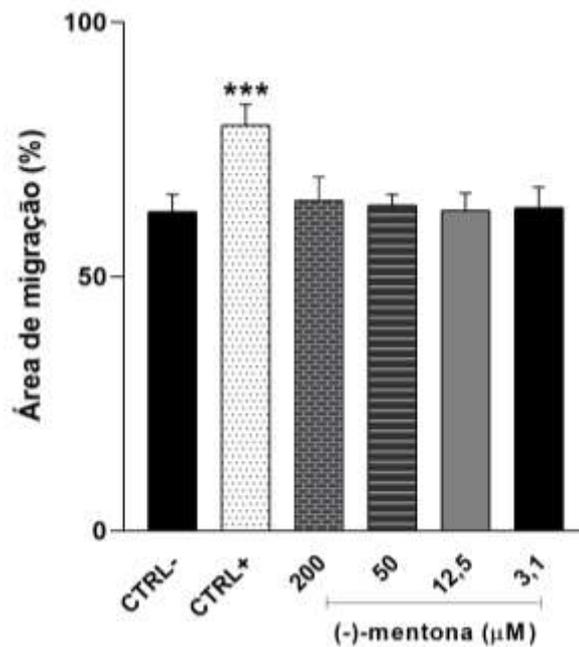


Figura 43. Efeito de (-)-menthone sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de (-)-menthone (3,1 a 200 μ M), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. *** Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,0005$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

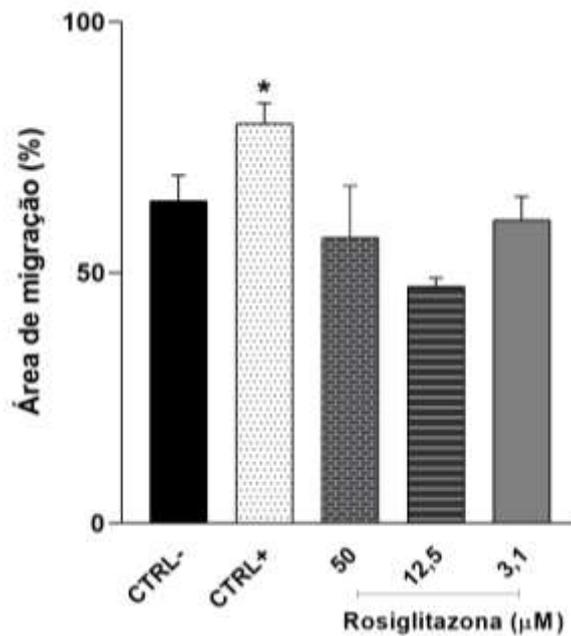


Figura 44. Efeito de rosiglitazona sobre a área de migração de fibroblastos L929 no *scratch*. Diferentes concentrações de rosiglitazona (3,1 a 50μM), veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão. * Diferente do grupo controle negativo ($p < 0,05$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Com base nos resultados do ensaio de *scratch*, os compostos que estimularam a migração de fibroblastos, e, portanto, com potencial cicatrizante, foram selecionados e investigados quanto à capacidade de modular a produção de fatores envolvidos na resposta de reparo tecidual. Assim, avançaram para a fase seguinte de testes: o óleo essencial de Patchouli, óleo essencial de copaíba e os compostos bioativos MOA, alfa-bisabolol e Fraxetina, nas concentrações de 1,56μg/mL, 6,25 μg/mL, 12,5μM, 12,5μM e 0,01μM, respectivamente. Desta forma, as células e o sobrenadante das culturas celulares tratadas com os compostos ativos nas concentrações que resultaram em efeito máximo foram avaliados por meio do ensaio ELISA e qRT-PCR.

4.3 EXPRESSÃO DE RNAm POR qRT-PCR

Para avaliar a expressão gênica, fibroblastos estimulados por 24h com as substâncias MOA, fraxetina, alfa-bisabolol, óleo essencial de copaíba e óleo essencial de patchouli, nas concentrações de efeito máximo para migração celular (12,5, 0,01 e 12,5μM, 6,25 e 1,56μg/ml, respectivamente) foram usados para análise da expressão de RNAm para importantes marcadores no processo de reparo tecidual.

Os resultados apontaram que o óleo essencial de patchouli estimulou a expressão de CXCL15 (IL-8) ($p < 0,005$, em relação ao controle negativo) (Fig. 47). Em relação aos compostos bioativos, a fraxetina aumentou a expressão de RNAm para IGF-1 (Fig. 45), VEGF (Fig. 46) e CXCL15 (IL-8) (Fig. 47) ($p < 0,0005$, $p < 0,005$ e $p < 0,005$, respectivamente, em relação ao controle negativo). MOA elevou a expressão de RNAm para FGF-2 quando comparado ao controle negativo (Fig. 48, $p < 0,005$) e COL1A2 (Fig. 49, quando comparado ao controle positivo, $p < 0,0001$). Nenhum dos compostos avaliados foi capaz de aumentar a expressão de RNAm para COL4A1 (Fig. 50) e PDGF-B (Fig. 51).

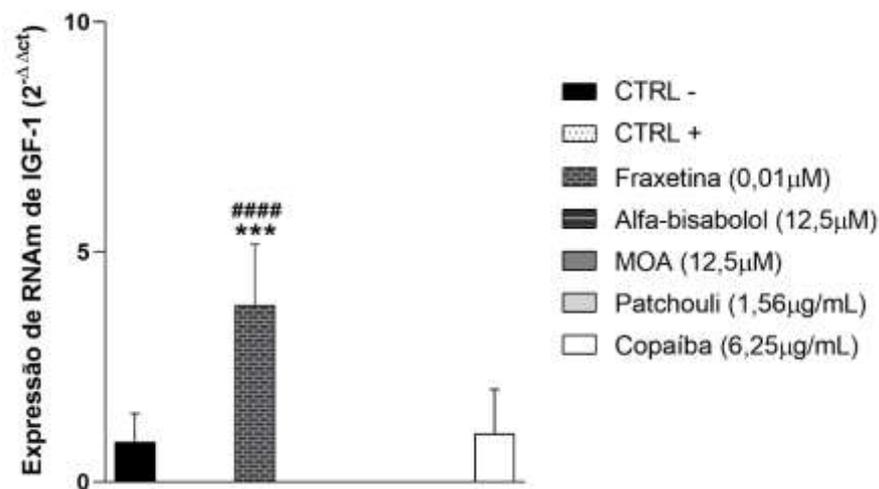


Figura 45. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de IGF-1 em fibroblastos L929. Diferentes concentrações dos compostos, veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. *** Diferente do controle negativo ($p < 0,0005$); #### diferente do controle positivo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

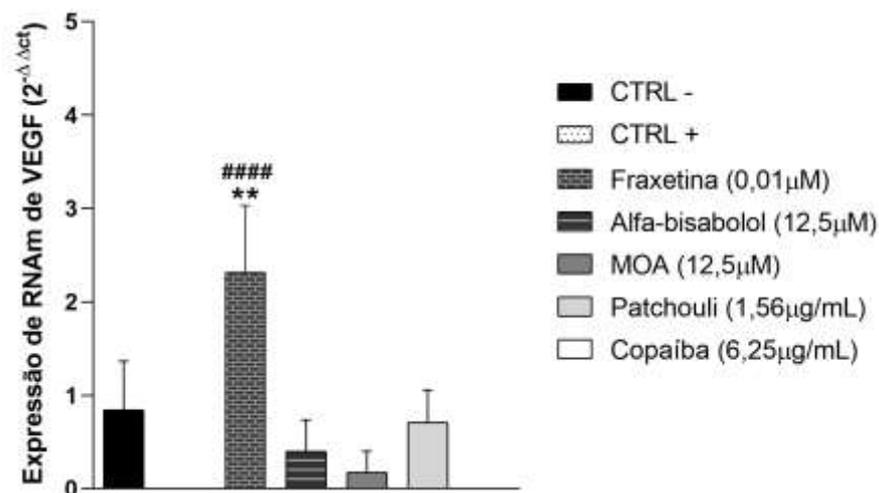


Figura 46. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de VEGF em fibroblastos L929. Diferentes concentrações dos compostos, veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. ** Diferente do controle negativo ($p < 0,005$); #### diferente do controle positivo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. ** Diferente do controle negativo ($p < 0,005$); ##### diferente do controle positivo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

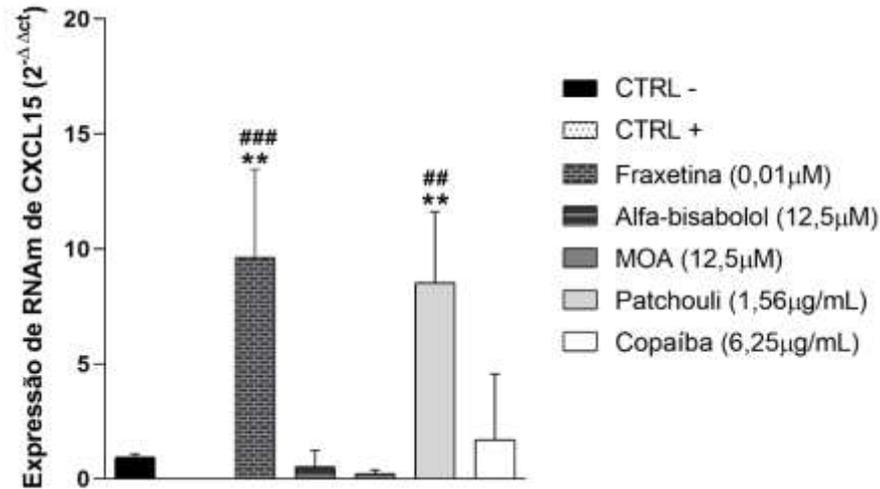


Figura 47. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de CXCL15 (IL-8) em fibroblastos L929. Diferentes concentrações dos compostos, veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. ** Diferente do controle negativo ($p < 0,005$); ## diferente do controle positivo ($p < 0,005$); ### diferente do controle positivo ($p < 0,0005$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

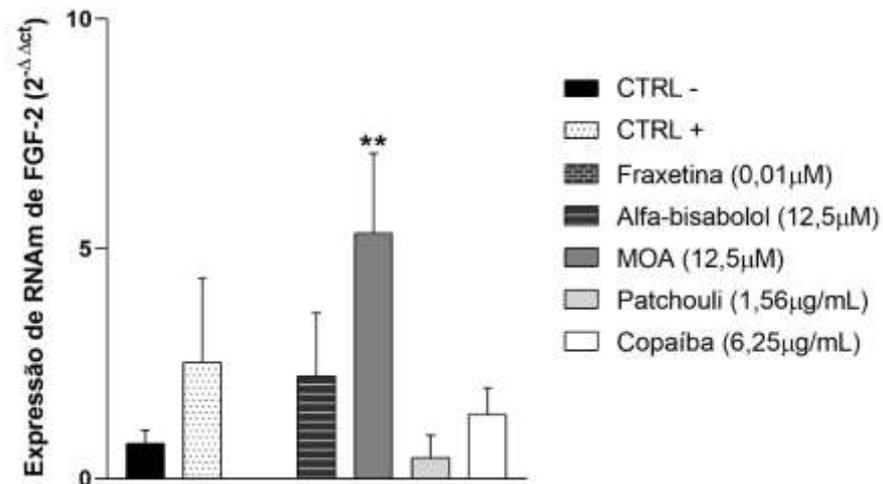


Figura 48. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de FGF-2 em fibroblastos L929. Diferentes concentrações dos compostos, veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. ** Diferente do controle negativo ($p < 0,005$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

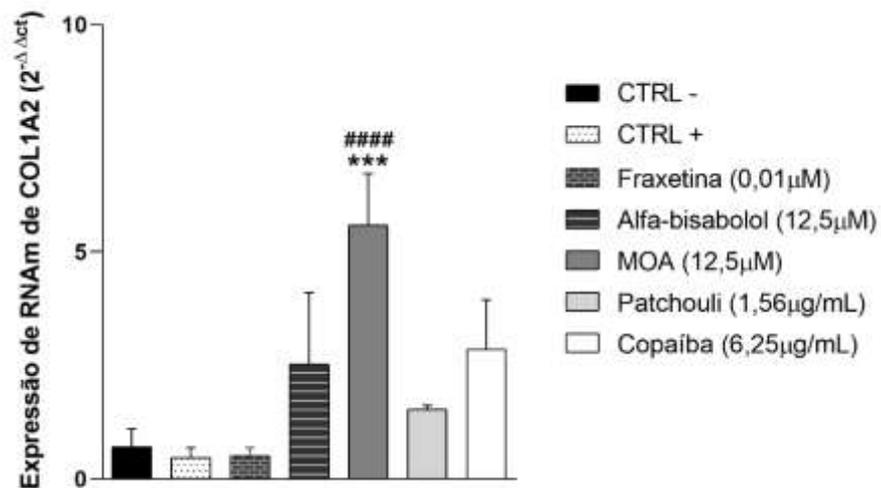


Figura 49. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de COL1A2 em fibroblastos L929. Diferentes concentrações dos compostos, veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão. *** Diferente do controle negativo ($p < 0,0005$); #### diferente do controle positivo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

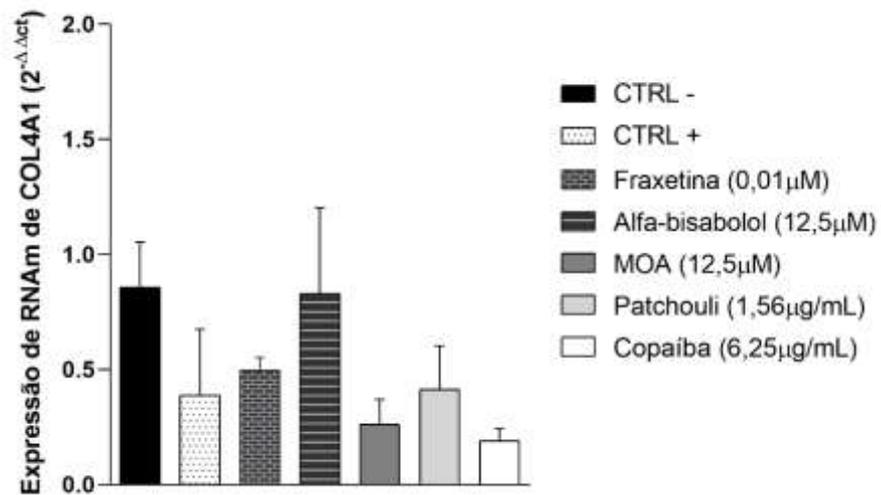


Figura 50. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de COL4A1 em fibroblastos L929. Diferentes concentrações dos compostos, veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média ± desvio padrão.

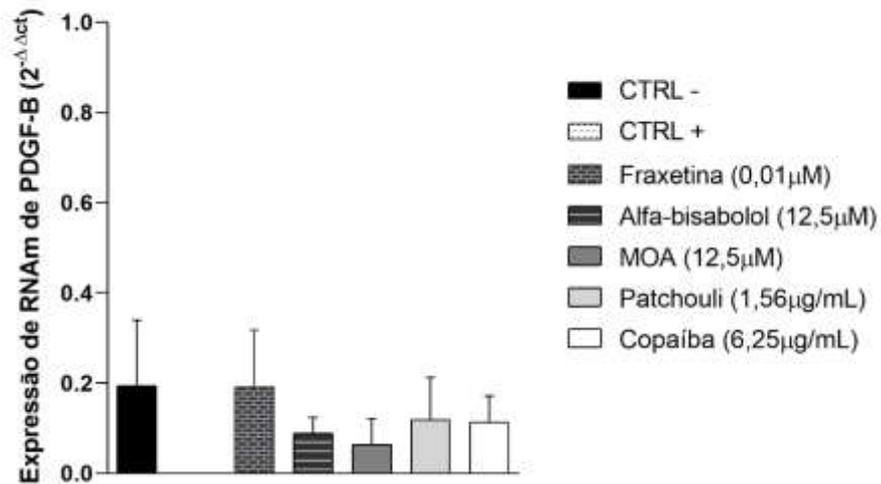


Figura 51. Efeito dos compostos estudados sobre a expressão de PDGF-B em fibroblastos L929. Diferentes concentrações dos compostos, veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão.

4.4 RESULTADOS DO ENSAIO ELISA

Os sobrenadantes da cultura de fibroblastos estimulada por 24h com os compostos MOA, fraxetina, alfa-bisabolol, óleo essencial de copaíba e óleo essencial de patchouli, em suas concentrações de efeito máximo (12,5, 0,01 e 12,5 μ M, 6,25 e 1,56 μ g/ml, respectivamente) foram usados para quantificação de IL-10.

Os resultados mostraram que, em comparação com o controle negativo, os compostos fraxetina, MOA e alfa-bisabolol ($p < 0,05$ e $p < 0,005$, respectivamente), assim como os óleos essenciais de Patchouli e de Copaíba ($p < 0,0001$), estimularam os fibroblastos a produzirem IL-10 (Fig. 52).

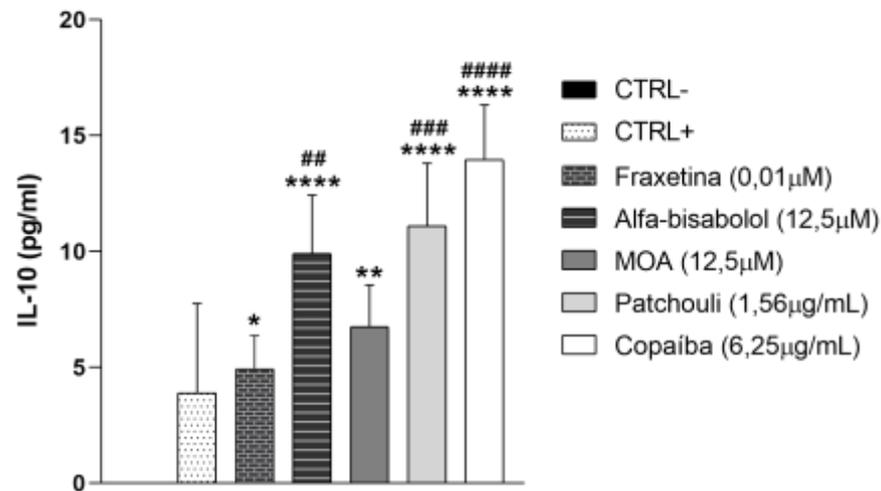


Figura 52. Efeito dos compostos estudados sobre a quantificação de IL-10 no sobrenadante de fibroblastos L929. Diferentes concentrações dos compostos, veículo (CTRL-, controle negativo) ou asiaticoside (CTRL+, controle positivo) foram adicionadas na cultura de fibroblastos e incubados por 24h. Todos os dados são relatados como média \pm desvio padrão. * Diferente do controle negativo ($p < 0,05$); ** diferente do controle negativo ($p < 0,005$); **** diferente do controle negativo ($p < 0,0001$); ## diferente do controle positivo ($p < 0,005$); ### diferente do controle positivo ($p < 0,0005$); #### diferente do controle positivo ($p < 0,0001$) conforme determinado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

A tabela 4 apresenta uma compilação dos resultados obtidos.

Tabela 4. Resumo dos marcadores avaliados.

COMPOSTO	NÃO CITOTÓXICO	SCRATCH (>MIGRAÇÃO)	>IL-10	FGF-2 (> EXPRESSÃO)
RIPARINA 1	X			
RIPARINA 2	X			
RIPARINA 3	X			
RIPARINA 4	X			
MOA	X	X	X	X
FRAXETINA	X	X	X	
COPAÍBA	X	X	X	
ALFA-BISABOLOL	X	X	X	
VERBENA	X			
PIMENTA ROSA	X			
PATCHOULI	X	X	X	
JUREMA BRANCA	X			
VEPROBIO	X			
ROSIGLITAZONA	X			
4-ALLYLANISOLE	X			
4-ALLYL-2,6-DIMETHOXYPHENOL	X			
2-ALLYLPHENOL	X			

CARVEOL	X
MENTHONE	X

COMPOSTO	COL1A2 (> EXPRESSÃO)	IGF-1 (> EXPRESSÃO)	VEGF (> EXPRESSÃO)
RIPARINA 1			
RIPARINA 2			
RIPARINA 3			
RIPARINA 4			
MOA	X		
FRAXETINA		X	X
COPAÍBA			
ALFA-BISABOLOL			
VERBENA			
PIMENTA ROSA			
PATCHOULI			
JUREMA BRANCA			
VEPROBIO			
ROSIGLITAZONA			
4-ALLYLANISOLE			
4-ALLYL-2,6-DIMETHOXYPHENOL			
2-ALLYLPHENOL			
CARVEOL			
MENTHONE			

COMPOSTO	CXCL15 (> EXPRESSÃO)	COL4A1 (> EXPRESSÃO)	PDGF-B (> EXPRESSÃO)
RIPARINA 1			
RIPARINA 2			
RIPARINA 3			
RIPARINA 4			
MOA			
FRAXETINA	X		
COPAÍBA			
ALFA-BISABOLOL			
VERBENA			
PIMENTA ROSA			
PATCHOULI	X		
JUREMA BRANCA			
VEPROBIO			
ROSIGLITAZONA			

4-ALLYLANISOLE
4-ALLYL-2,6-DIMETHOXYPHENOL
2-ALLYLPHENOL
CARVEOL
MENTHONE

4.5 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS ATRAVÉS DA MINERAÇÃO DE PATENTES

Constituem ainda resultados dessa dissertação uma prospecção tecnológica sobre patentes depositadas acerca de estratégias utilizadas no tratamento de feridas. Os resultados foram escritos no formato de artigo científico submetido à revista 3 Biotech. O corpo do texto encontra-se como Apêndice (Apêndice A) da presente dissertação.

Em um trabalho desta natureza onde se busca conhecer o potencial cicatricial de compostos naturais, conhecer o cenário patentário e tecnologias desenvolvidos para o tratamento de feridas, tem como objetivo vislumbrar cenários possíveis em que os resultados promissores deste trabalho poderão ser aplicados e como aplicá-los para o desenvolvimento de novas drogas e/ou curativos para o tratamento de feridas.

5 DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que fraxetina, MOA e óleo essencial de Patchouli apresentaram-se como compostos naturais promissores para o desenvolvimento de produtos tecnológicos destinados ao tratamento de feridas, visto que os mesmos foram considerados não citotóxicos e capazes de estimular a migração de fibroblastos para a área da “ferida”, bem como a expressão celular de importantes marcadores do processo de reparação tecidual.

Conforme descrito, o processo de cicatrização é didaticamente dividido em quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. A fase inflamatória tem uma participação importante no reparo tecidual, especialmente em função da solução de continuidade, que facilita a infecção da ferida, de modo que células do sistema imune inato são recrutadas como primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Os neutrófilos são o tipo leucocitário mais abundante em circulação e constituem a referida primeira linha de reconhecimento e defesa contra agentes infecciosos no tecido (SILVA, 2015). Por serem fagócitos, os neutrófilos são necessários em todo processo e precisam ser atraídos para o local da lesão por moléculas

quimiotáticas. O fragmento C5a do sistema complemento é um componente quimiotático do sistema, mas além dele, um marcador biológico importante no reparo tecidual é a citocina CXCL15 ou IL-8, reconhecidamente também como uma citocina quimiotática responsável pelo recrutamento de células do sistema imune para o local onde ocorreu uma infecção (DELVES, 2021; MARTIN e NUNAN, 2015). Cabe ressaltar que, Jiang e cols. (2017) testaram asiaticoside (controle positivo do experimento) na inflamação alérgica, e observaram que esse composto diminuiu a expressão de IL-8 em células RBL-2H3 sensibilizadas por IgE.

Neste trabalho, os compostos fraxetina e óleo essencial de Patchouli foram capazes de estimular a expressão de RNAm para CXCL15 (IL-8). Esta expressão é desejável, desde que IL-8 promove quimiotaxia, bem como estimula a expressão do receptor CXCR1 e CXCR2 em neutrófilos, potencializando a ação (NIH, 2023). Segundo Russo e cols. (2014) muitas células expressam CXCR1/CXCR2, incluindo células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e neurônios, contribuindo para os efeitos biológicos de IL-8. Há uma quantidade substancial de dados experimentais sugerindo que o IL-8 e os receptores contribuem para a eliminação de patógenos, mas também pode contribuir significativamente para processos associados a doenças, incluindo lesão tecidual, fibrose, angiogênese e tumorigênese.

A fraxetina é um dos principais constituintes da planta medicinal *Fraxinus rhynchophylla*. Possui múltiplas bioatividades como agente antimicrobiano, inibidor de apoptose, hepatoprotetor, antibacteriano (PUBCHEM, 2023; WANG et al., 2014). Estudos relatam a ação da fraxetina na inibição da degradação da matriz extracelular (WANG et al., 2020), além de efeitos antifibróticos na fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (WU et al., 2019), esse efeito é desejável para evitar a produção excessiva de MEC e consequente formação de fibrose. O presente estudo traz uma colaboração à ciência, apresentando a fraxetina como indutora de expressão de RNAm para IL-8.

Já o óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin*), vem sendo estudado pelo grupo do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental e sua composição química mostra que o princípio majoritário é o álcool de patchouli, correspondendo a 30,78%. Jia e cols. (2021) avaliaram um filme nanocompósito incorporado com óleo essencial de patchouli para curativo de feridas, e concluíram que o filme exibiu um bom efeito antibacteriano a longo prazo (> 48 h) em *Staphylococcus aureus* e não foi tóxico em fibroblastos de camundongos (células L929), este último resultado corroborando os achados do presente estudo. Além disso, Kim e cols. (2021) observaram que o álcool de patchouli melhora a cicatrização de feridas em camundongos alimentados com dieta rica em gordura através da supressão da inflamação mediada por AMPK e sinalização de TGFβ1. Este trabalho também mostrou que o óleo essencial de patchouli tem

propriedades anti-inflamatórias, visto que o mesmo foi capaz de estimular a produção de IL-10, um potente citocina anti-inflamatória.

De fato, o processo inflamatório é um evento crucial para o sucesso do reparo tecidual, no entanto, falhas nos mecanismos de ação envolvidos na inflamação podem resultar em um processo inflamatório prolongado, resultando em feridas crônicas (MORETTI et al., 2022). Neste sentido, a participação de macrófagos M2 e fibroblastos tem o objetivo de controlar a inflamação por meio da liberação de IL-10, uma potente citocina anti-inflamatória. (BRAZIL et al., 2019). Peranteau e cols. (2008); Sidgwick e cols. (2012) mostraram que a citocina IL-10 também previne a fibrose, incluindo de feridas dérmicas. Há autores que relatam o papel fundamental de IL-10 na cicatrização (SHI et al., 2013), assim como Zymek e cols. (2007) afirmam sobre a ação na renovação da matriz extracelular e na angiogênese. Além disso, estudos informam que essa citocina pode inibir mediadores pró-inflamatórios, incluindo IL-8, através de vias de sinalização mediada por STAT3 (SINGER e CLARK, 1999). Nesta pesquisa, demonstrou-se uma relação entre a produção de IL-10 e a migração celular de fibroblastos L929, visto que houve um aumento dessa citocina acompanhado de um avanço de migração celular. Todos os compostos não citotóxicos triados, Fraxetina, óleo essencial de Patchouli e copaíba, alfa-bisabolol e MOA, foram capazes de estimular a produção de IL-10.

O óleo-resina de copaíba (*Copaifera officinalis*) é extraído da árvore do gênero *Copaifera* e é constituído de sesquiterpenos (óleo essencial) e diterpenos (resina). O componente majoritário dos sesquiterpênicos é o β -cariofileno, correspondendo a 26,32% (GALÚCIO et al., 2016). O óleo de copaíba apresenta atividades anti-inflamatória, antifúngica, anticancerígena e também possui ação reparadora em feridas orais de ratos (ALVARENGA et al., 2020; DEUS, ALVES e ARRUDA, 2011; LIMA et al., 2003). A ação anti-inflamatória vem do componente majoritário, o β -cariofileno (GALÚCIO et al., 2016), dessa forma, acredita-se que o aumento da produção de IL-10 encontrado neste estudo, possa ser relacionado a presença do princípio majoritário β -cariofileno no óleo essencial.

O alfa-bisabolol, também conhecido como levomenol, é um álcool sesquiterpênico derivado de muitas plantas. Foi obtido pela primeira vez a partir de *Matricaria chamomilla*, comumente conhecida como camomila (EDDIN et al., 2022). A literatura comprova sua ação anti-inflamatória e antinociceptiva em roedores (ROCHA et al., 2011), corroborando com este trabalho. Ademais, El-Lakany e cols (2019) apresentaram estruturas 3D nanofibras com α -bisabolol capaz de acelerar a cicatrização de feridas e a regeneração de tecidos em ratos.

Em relação ao composto MOA, os dados na literatura ainda são escassos. Mas sabe-se que este composto é uma cromona isolada das partes aéreas da planta *Evolvulus linarioides*.

Apresenta atividade anti-inflamatória e inibe a produção de óxido nítrico (PEREIRA et al., 2020). Até o momento não foi relatada nenhuma ação cicatrizante.

Estudos realizados com o extrato de *Centella asiatica*, a planta medicinal de onde é produzido o controle positivo, o asiaticoside, usado neste estudo mostraram que este composto reduz a expressão da citocina IL-10 (LEE et al., 2020). Considerando o aumento da expressão de IL-10 pelos compostos fraxetina, MOA, alfa-bisabolol e óleo de copaíba, sugere-se que estes compostos poderão ter papel mais promissor que o asiaticoside no manejo de feridas.

Durante a fase proliferativa do reparo tecidual, fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais e células epiteliais são ativadas para reparo da lesão. Essas células restabelecem a continuidade do tecido por meio da deposição da matriz, angiogênese e epitelização (CHILDS e MURTHY, 2017). O fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) são importantes sinalizadores para ativação de fibroblastos (MEDEIROS e DANTAS-FILHO, 2016).

IGF-1 é um fator de crescimento que desempenha papéis reguladores na segunda fase da cicatrização de feridas (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005). Os resultados desta pesquisa mostraram que a fraxetina aumentou a expressão desse fator. Wu e cols. (2019) também mostraram que a fraxetina exerceu efeitos antifibróticos regulando vias de sinalização NF- κ B/I κ B α , MAPKs e Bcl-2/Bax. Esse efeito protetor é relevante para evitar a formação de fibrose. A literatura apresentada corrobora com os achados para o composto fraxetina.

A segunda população de fibroblastos que residem dentro da ferida prolifera menos e sintetizam mais colágeno, envolvidos na contração da matriz extracelular. A matriz consiste de monômero de colágeno, proteoglicanos e fibronectina (SCHUGAR et al., 2008). Juntas, essas substâncias restabelecem a continuidade do tecido conjuntivo entre as bordas da ferida. O colágeno tipo III torna-se mais essencial nesse processo inicial da cicatrização de feridas (MEDEIROS e DANTAS-FILHO, 2016). Entre os fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial pode-se citar o fator de crescimento fibroblástico (FGF), que estimula a proliferação celular e angiogênese (CAMPOS, BORGES-BRANCO e GROTH, 2007). A angiogênese é uma etapa que ocorre simultaneamente à fibroplasia. Nas feridas abertas, os novos capilares fundem-se e crescem na mesma direção, o que contribui para a formação do tecido de granulação. Esses eventos são regulados por meio de fatores de crescimento como FGF e VEGF (MEDEIROS e DANTAS-FILHO, 2016).

Este trabalho mostrou que fraxetina e MOA estimulam a expressão de VEGF e FGF-2, respectivamente. Yu e cols. (2012) comprovaram o efeito de EGF e bFGF na proliferação de fibroblastos e na produção de citocinas angiogênicas a partir de substitutos dérmicos cultivados,

no qual o grupo tratado com bFGF houve uma maior liberação de VEGF em comparação com o grupo controle. O marcador VEGF está sendo identificado como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005).

Como já dito anteriormente, a angiogênese contribui para a formação do tecido de granulação. É um tecido jovem, muito vascularizado, constituído por fibroblastos, glicoproteínas, proteoglicanos, colágeno entre outros. Nessa etapa o colágeno tipo III inicialmente produzido é substituído por colágeno tipo I (MEDEIROS e DANTAS-FILHO, 2016). O colágeno tipo I é o mais comum, sendo sintetizado por fibroblastos, odontoblastos, condroblastos e osteoblastos, conferindo resistência às estruturas (LIMA et al., 2020). Blanco e Neto (2003) sugerem que a relação entre a expressão de IL-10 e colágeno tipo I ocorra através da via de sinalização pelo fator de transcrição NF- κ B. Dessa forma, a produção de colágeno tipo I é importante para o processo de reparo tecidual. Este trabalho mostrou que o composto MOA foi capaz de induzir a expressão de RNAm para COL1A2.

Por fim, o óleo essencial de patchouli, MOA e fraxetina podem contribuir com o desenvolvimento das fases proliferativas e de remodelação no reparo tecidual.

6 CONCLUSÃO

- A prospecção tecnológica mostrou grande número de trabalhos que estão sendo desenvolvidos dentro da área de cicatrização com o objetivo de obter um reparo tecidual sem intercorrências, em que as inovações incluem bioimpressão 3D, hidrogéis, liberação gradual de compostos naturais etc., gerando uma melhor qualidade de vida aos pacientes e menores custos para o sistema de saúde.

- A partir da triagem de 19 compostos químicos e óleos essenciais, foi identificado que fraxetina, MOA, alfa-bisabolol e os óleos essenciais de Patchouli e copaíba mostraram-se não citotóxicos e com potencial cicatrizante;

- A fraxetina, MOA, alfa-bisabolol e os óleos essenciais de Patchouli e copaíba foram capazes de induzir os marcadores colágeno tipo 1, FGF-2, IGF-1, VEGF, IL-10 e CXCL15 relacionados às diferentes fases do reparo tecidual.

- Fraxetina, MOA e óleo essencial de Patchouli são compostos naturais promissores para o desenvolvimento de produtos tecnológicos destinados ao tratamento de feridas.

REFERÊNCIAS

- ABDUL KHALIL, H. P. S. et al. Synthesis and Characterization of Novel Patchouli Essential Oil Loaded Starch-Based Hydrogel. **Gels**, v. 8, n. 9, p. 536, 2022.
- ALISHAHEDANI, Mohammadali E. et al. Therapeutic candidates for keloid scars identified by qualitative review of scratch assay research for wound healing. **PLoS One**, v. 16, n. 6, p. e0253669, 2021.
- AL-KHATTAF, Fatimah S. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of isoniazid connected menthone derivatives and their investigation of clinical pathogens causing infectious disease. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 4, p. 533-542, 2021.
- ALTOMARE, Instituto Mariane. **Fisiologia da cicatrização**. Disponível em: <<https://institutomarianealtomare.com.br/fisiologia-da-cicatrizacao/>> Acesso em: 21 abr. 2023.
- ALVARENGA, María Olimpia Paz et al. Safety and effectiveness of copaiba oleoresin (*C. reticulata* Ducke) on inflammation and tissue repair of oral wounds in rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3568, 2020.
- ALVES, Andreia et al. Xanthan gum–Konjac glucomannan blend hydrogel for wound healing. **Polymers**, v. 12, n. 1, p. 99, 2020.
- AMBIENTE, Ministério do Meio. **Fauna e Flora**. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade/fauna-e-flora>> Acesso em: 10 dez. 2022.
- ANVISA. **Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais**. Publicado em: set. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/fitoterapicos>> Acesso em: 8 fev. 2023.
- ARAGÃO NETO, Humberto de Carvalho et al. 2-Allylphenol reduces IL-1 β and TNF- α , promoting antinociception through adenosinergic, anti-inflammatory, and antioxidant mechanisms. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019.
- ATAY, Arif et al. The role of collagen type I/III ratio in the etiology of sacrococcygeal pilonidal. **Cirurgía y cirujanos**, v. 90, n. 6, p. 719-725, 2022.
- BALAHA, Mohamed et al. Fraxetin prevented sodium fluoride-induced chronic pancreatitis in rats: Role of anti-inflammatory, antioxidant, antifibrotic and anti-apoptotic activities. **International Immunopharmacology**, v. 93, p. 107372, 2021.
- BALBINO, Carlos Aberto; PEREIRA, Leonardo Madeira; CURI, Rui. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 41, p. 27-51, 2005.
- Barbosa-Filho, J.M.; Silva, E.C.; Bhattacharyya, J. Synthesis of several new phenylethylamides of substituted benzoic acids. **Quim. Nova** 1990, 13, 332–334.
- BERNARDO, Ana Flávia Cunha; SANTOS, Kamila dos; SILVA, Débora Parreiras da. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. **Revista Saúde em foco**, v. 1, n. 11, p. 1221-33, 2019.
- BINDSCHADLER, Michael, and James L. McGrath. Sheet migration by wounded monolayers as an emergent property of single-cell dynamics. **Journal of cell science** 120.5, 2007: 876-884.

BLANCO, Marcos Luego; NETO, Antonio Condino. O fator nuclear Kappa B: uma nova perspectiva para o estudo de drogas antiinflamatórias. **Revista de Ciências Médicas**, v. 12, n. 4, 2003.

BOPAGE, Nisansala Swarnamali et al. Dual function of active constituents from bark of *Ficus racemosa* L in wound healing. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-13, 2018.

BRAZIL, Jennifer C. et al. Innate immune cell–epithelial crosstalk during wound repair. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 8, p. 2983-2993, 2019.

BREIT, Stephanie et al. Erythropoietin ameliorates the reduced migration of human fibroblasts during in vitro hypoxia. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 67, p. 1-13, 2011.

CABRITA, Miguel A.; CHRISTOFORI, Gerhard. Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. **Angiogenesis**, v. 11, p. 53-62, 2008.

CALEY, Matthew P.; MARTINS, Vera LC; O'TOOLE, Edel A. Metalloproteinases and wound healing. **Advances in wound care**, v. 4, n. 4, p. 225-234, 2015.

CAMPOS, Antonio Carlos Ligocki; BORGES-BRANCO, Alessandra; GROTH, Anne Karoline. Cicatrização de feridas. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 20, p. 51-58, 2007.

CARVALHO, Tatyelle Bezerra et al. Validação com especialistas de um instrumento para classificar a complexidade de feridas agudas e crônicas. **Estima–Brazilian Journal of Enterostomal Therapy**, v. 20, 2022.

CHEN, Sheng-Yi; LIN, Jo-Shi; YANG, Bei-Chang. Modulation of tumor cell stiffness and migration by type IV collagen through direct activation of integrin signaling pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 555, p. 1-8, 2014.

CHILDS, Dylan R.; MURTHY, Ananth S. Overview of wound healing and management. **Surgical Clinics**, v. 97, n. 1, p. 189-207, 2017.

CORTEZ, D. N. et al. Custos do tratamento de lesões cutâneas na Atenção Primária à Saúde. ESTIMA. **Braz J Enterostomal Ther**, v. 17, p. e2419, 2019.

CORY, Giles. Scratch-wound assay. **Cell Migration: developmental methods and protocols**, 2011: 25-30.

DARBY, Ian A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, p. 301-311, 2014.

DE CARVALHO, A.M., et al., Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (Omethyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chem Biol Interact**, 2013. 205(3): p. 165-72.

DELVES, Peter J. Sistema complemento. **Manual MSD: versão para profissionais de saúde**, 2021. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/imunologia-dist%C3%BArrios-al%C3%A9rgicos/biologia-do-sistema-imunit%C3%A1rio/sistema-complemento>> Acesso em: 16 mai. 2023.

DEMARIA, Marco et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. **Developmental cell**, v. 31, n. 6, p. 722-733, 2014.

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). **A matriz extracelular**. Disponível em:

<<http://patologia.medicina.ufrj.br/index.php/metodos-de-estudo/414-matriz-extracelular/176-matriz-extracelular2>> Acesso em: 16 mai. 2023.

DEUS, Ricardo Jorge Amorim de; ALVES, Claudio Nahum; ARRUDA, Mara Silvia Pinheiro. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 01-07, 2011.

DOMANSKY, C.R; BORGES, L.E. Manual para prevenção de lesões de pele. Recomendações baseadas em evidências. Rio de Janeiro: **Editora Rubio**, 2012.

DOS SANTOS, Ardilles Juan Carlos Alves et al. Schinus terebinthifolia leaf lectin (SteLL) is an immunomodulatory agent by altering cytokine release by mice splenocytes. **3 Biotech**, v. 10, p. 1-9, 2020.

EDDIN, Lujain Bader et al. Health benefits, pharmacological effects, molecular mechanisms, and therapeutic potential of α -bisabolol. **Nutrients**, v. 14, n. 7, p. 1370, 2022.

EILKEN, Hanna M.; ADAMS, Ralf H. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. **Current opinion in cell biology**, v. 22, n. 5, p. 617-625, 2010.

EL-LAKANY, Sarah A. et al. α -Bisabolol-loaded cross-linked zein nanofibrous 3d-scaffolds for accelerating wound healing and tissue regeneration in rats. **International Journal of Nanomedicine**, p. 8251-8270, 2019.

ESSELMAN PC, THOMBS BD, MAGYAR-RUSSELL G, FAUERBACH JA. Burn rehabilitation: state of the science. **American journal of physical medicine & rehabilitation**. 85:383–413, 2006.

EUL, Bastian et al. Impact of HIF-1 α and HIF-2 α on proliferation and migration of human pulmonary artery fibroblasts in hypoxia. **The FASEB journal**, v. 20, n. 1, p. 163-165, 2006.

EVANGELISTA, Afrânio Ferreira et al. Mecanismos envolvidos no efeito terapêutico de células mesenquimais de medula óssea em modelo experimental de neuropatia diabética sensorial. 2019. **Tese de Doutorado**. Instituto Gonçalo Moniz.

FRANCESCHINI, P. A pele e o seu envelhecimento. Lisboa, **Biblioteca básica da ciência e cultura Instituto Piaget**, pp. 25-75, 1994.

GALÚCIO, Cleyson de S. et al. Recuperação de sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba a partir da destilação molecular. **Química Nova**, v. 39, p. 795-800, 2016.

GARRAUD, Olivier; HOZZEIN, Wael N.; BADR, Gamal. Wound healing: time to look for intelligent, 'natural' immunological approaches?. **BMC immunology**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2017.

GOMES-FILHO, João Eduardo et al. Evaluation of photodynamic therapy on fibroblast viability and cytokine production. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 97-100, 2016.

GRADA, Ayman et al. Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 2, p. e11-e16, 2017.

GUERRERO-JUAREZ, Christian F. et al. Single-cell analysis reveals fibroblast heterogeneity and myeloid-derived adipocyte progenitors in murine skin wounds. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 650, 2019.

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

- HA, Dae Hyun et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1157, 2020.
- HAUDENSCHILD, C. C.; SCHWARTZ, S. M. Endothelial regeneration. II. Restitution of endothelial continuity. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 41, n. 5, p. 407-418, 1979.
- HINZ, Boris. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. **Journal of biomechanics**, v. 43, n. 1, p. 146-155, 2010.
- HU, Yin et al. Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function. **Theranostics**, v. 8, n. 1, p. 169, 2018.
- HUANG, Xu et al. Hyperbaric oxygen potentiates diabetic wound healing by promoting fibroblast cell proliferation and endothelial cell angiogenesis. **Life Sciences**, v. 259, p. 118246, 2020.
- ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, p. 41-51, 2001.
- JIA, Jingfu et al. Long-Term Antibacterial Film Nanocomposite Incorporated with Patchouli Essential Oil Prepared by Supercritical CO₂ Cyclic Impregnation for Wound Dressing. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 5005, 2021.
- JIANG, Jing Zhi et al. Asiaticoside mitigates the allergic inflammation by abrogating the degranulation of mast cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 37, p. 8128-8135, 2017.
- KALLURI, Raghu. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 422-433, 2003.
- KALLURI, Raghu et al. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, 2009.
- KARSDAL, Morten Asser et al. The good and the bad collagens of fibrosis—their role in signaling and organ function. **Advanced drug delivery reviews**, v. 121, p. 43-56, 2017.
- KHOSHNOODI, Jamshid; PEDCHENKO, Vadim; HUDSON, Billy G. Mammalian collagen IV. **Microscopy research and technique**, v. 71, n. 5, p. 357-370, 2008.
- KIM, Tae Jin et al. Patchouli alcohol improves wound healing in high fat diet-fed mice through AMPK-mediated suppression of inflammation and TGFβ1 signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 561, p. 136-142, 2021.
- KU, Yun Hyi et al. Rosiglitazone increases endothelial cell migration and vascular permeability through Akt phosphorylation. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2017.
- LAM, Fong W.; VIJAYAN, K. Vinod; RUMBAUT, Rolando E. Platelets and their interactions with other immune cells. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 3, p. 1265, 2015.
- LEE, Yonghyeon et al. Inhibitory effect of Centella asiatica extract on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 411, 2020.
- LI, Tao et al. Suppression of hedgehog signaling regulates hepatic stellate cell activation and collagen secretion. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 11, p. 14574, 2015.

- LI, Wei et al. Extracellular heat shock protein-90 α : linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. **The EMBO journal**, v. 26, n. 5, p. 1221-1233, 2007.
- LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. 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.
- LIAO, Ming-Huei et al. The stimulatory effects of alpha1-adrenergic receptors on TGF-beta1, IGF-1 and hyaluronan production in human skin fibroblasts. **Cell and tissue research**, v. 357, n. 3, p. 681-693, 2014.
- LIMA, Igor Costa de et al. Quantificação de colágeno tipos I e III em lesões de pele de pacientes portadores de hanseníase. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, 2020.
- LIMA, Sylvia RM et al. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 17, n. 9, p. 1048-1053, 2003.
- LINDHOLM, Christina; SEARLE, Richard. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. **International wound journal**, v. 13, p. 5-15, 2016.
- LIU, Ting et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2017.
- LOPEZ-JORNET, Pia et al. Effects of potassium apigenin and verbena extract on the wound healing process of SKH-1 mouse skin. **International wound journal**, v. 11, n. 5, p. 489-495, 2014.
- LOPEZ-ROMERO, Julio Cesar et al. Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- MACIAS-PEREZ, Ines et al. Loss of integrin α 1 β 1 ameliorates Kras-induced lung cancer. **Cancer research**, v. 68, n. 15, p. 6127-6135, 2008.
- MACIEL, Ana J. et al. Antichemotactic and antifungal action of the essential oils from *Cryptocarya aschersoniana*, *Schinus terebinthifolia*, and *Cinnamomum amoenum*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 8, p. e1900204, 2019.
- MARTIN, Paul; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 2, p. 370-378, 2015.
- MEDEIROS, Aldo Cunha; DANTAS-FILHO, Antônio Medeiros. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of surgical and clinical research**, v. 7, n. 2, p. 87-102, 2016.
- MIRICESCU, Daniela et al. Growth Factors, Reactive Oxygen Species, and Metformin—Promoters of the Wound Healing Process in Burns?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9512, 2021.
- MONTEIRO, Dandara Soares et al. Incidência de lesões de pele, risco e características clínicas de pacientes críticos. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 30, 2021.
- MONTENEGRO, Iván et al. Carveoylphenols and their antifungal potential against pathogenic yeasts. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 185, 2019.
- MORETTI, Leandro et al. The interplay of fibroblasts, the extracellular matrix, and inflammation in scar formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 2, 2022.

- MUNIZ, Débora Feitosa et al. In vitro and in silico inhibitory effects of synthetic and natural eugenol derivatives against the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*. **Food Chemistry**, v. 337, p. 127776, 2021.
- NAKSANG, Porawan et al. Assessment of antimicrobial activity, mode of action and volatile compounds of *Etlíngera pavieana* essential oil. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3245, 2020.
- NASCIMENTO, Olívia Azevêdo et al. Pharmacological properties of riparin IV in models of pain and inflammation. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1757, 2016.
- NASCIMENTO JÚNIOR, Braz José do. **Anatomia humana sistemática básica**. 2020.
- NAVARRO-REQUENA, Claudia et al. Wound healing-promoting effects stimulated by extracellular calcium and calcium-releasing nanoparticles on dermal fibroblasts. **Nanotechnology**, v. 29, n. 39, p. 395102, 2018.
- NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.
- NIH, National Library of Medicine. **Chemokine (C-X-C motif) ligand 15**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20309>> Acesso em: 20 abr. 2023. Atualizado em 12 de abril de 2023.
- OLIVEIRA, Dalila Cunha de. Avaliação do controle da expressão gênica de citocinas pró inflamatórias mediado pela IL-10. Participação da IL-10 na modulação da resposta inflamatória exercida pela glutamina e na restrição alimentar. 2017. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.
- PARANHOS, Sheila Barbosa et al. Chitosan Membrane Containing Copaiba Oil (*Copaifera* spp.) for Skin Wound Treatment. **Polymers**, v. 14, n. 1, p. 35, 2022.
- PERANTEAU, William H. et al. IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 7, p. 1852-1860, 2008.
- PEREIRA, Laiane CO et al. Bioactive compounds from the aerial parts of *Evolvulus linarioides*. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 5, p. 1515-1523, 2020.
- PINTO, Bronson I. et al. A Bench-Top In Vitro Wound Assay to Demonstrate the Effects of Platelet-Rich Plasma and Depleted Uranium on Dermal Fibroblast Migration. **Applied In Vitro Toxicology**, v. 2, n. 3, p. 151-156, 2016.
- PINTO, Bronson I. et al. In vitro scratch assay to demonstrate effects of arsenic on skin cell migration. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 144, p. e58838, 2019.
- PLIKUS, Maksim V. et al. Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. **Science**, v. 355, n. 6326, p. 748-752, 2017.
- PRASATHKUMAR, Murugan; SADHASIVAM, Subramaniam. Chitosan/Hyaluronic acid/Alginate and an assorted polymers loaded with honey, plant, and marine compounds for progressive wound healing—Know-how. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 186, p. 656-685, 2021.
- PUBCHEM, National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5273569, Fraxetin. Available in: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fraxetin>> Accessed 18 may. 2023.

- PUSNIK, Mascha et al. The agar diffusion scratch assay-A novel method to assess the bioactive and cytotoxic potential of new materials and compounds. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.
- PUZEY G. The use, of pressure garments on hypertrophic scars. **Journal of tissue viability**; 12:11–15, 2002.
- RAMEZANPOUR, Mahnaz et al. Deferiprone has anti-inflammatory properties and reduces fibroblast migration in vitro. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 2378, 2019.
- REITAMO, S. et al. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. **The Journal of clinical investigation**, v. 94, n. 6, p. 2489-2492, 1994.
- RIPPA, Alexandra L.; KALABUSHEVA, Ekaterina P.; VOROTELYAK, Ekaterina A. Regeneration of dermis: scarring and cells involved. **Cells**, v. 8, n. 6, p. 607, 2019.
- ROCHA, Nayrton Flávio Moura et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 384, p. 525-533, 2011.
- RODRIGUES, Melanie et al. Wound healing: a cellular perspective. **Physiological reviews**, v. 99, n. 1, p. 665-706, 2019.
- RUSSO, Remo C. et al. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. **Expert review of clinical immunology**, v. 10, n. 5, p. 593-619, 2014.
- SAHLE, Fitsum F. et al. Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy. **Skin pharmacology and physiology**, v. 28, n. 1, p. 42-55, 2015.
- SANTO, Espírito. **Anatomia, fisiologia e bioquímica da pele e anexos cutâneos**. Disponível em: <<http://admin.institutoalfa.com.br/materialaluno/matdidatico70820.pdf>> Acesso em: 30 jun. 2022.
- SANTOS, Girlaine Café et al. Leukemia inhibitory factor (LIF) overexpression increases the angiogenic potential of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 778, 2020.
- SCHUGART, Richard C. et al. Wound angiogenesis as a function of tissue oxygen tension: a mathematical model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 7, p. 2628-2633, 2008.
- SCHULTZ, Gregory S. et al. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 2, p. 134-148, 2011.
- SHI, Ji-Hong et al. Protection against TGF- β 1-induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for the reduction of skin scarring. **Archives of dermatological research**, v. 305, p. 341-352, 2013.
- SIDGWICK, G. P.; BAYAT, A. Extracellular matrix molecules implicated in hypertrophic and keloid scarring. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, n. 2, p. 141-152, 2012.
- SILVA, Ítala Cristine. Neutrófilos: aspectos clássicos, plasticidade e novas funções imunorregulatórias. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 7, n. 1, 2015.
- SINGER, Adam J.; CLARK, Richard AF. Cutaneous wound healing. **New England journal of medicine**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

- TANDARA, Andrea A.; MUSTOE, Thomas A. Oxygen in wound healing—more than a nutrient. **World journal of surgery**, v. 28, p. 294-300, 2004.
- TANG, Bing et al. Asiaticoside suppresses collagen expression and TGF- β /Smad signaling through inducing Smad7 and inhibiting TGF- β RI and TGF- β RII in keloid fibroblasts. **Archives of dermatological research**, v. 303, p. 563-572, 2011.
- TANG, Huaqiao et al. Triterpenoid acids isolated from *Schinus terebinthifolia* fruits reduce *Staphylococcus aureus* virulence and abate dermonecrosis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
- TASSINARY, João. Raciocínio clínico aplicado á estética facial. Ed. **Estética experts**. 32-42 p., 2019.
- TOMASEK, James J. et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 3, n. 5, p. 349-363, 2002.
- TONNESEN, Marcia G.; FENG, Xiaodong; CLARK, Richard AF. Angiogenesis in wound healing. In: **Journal of investigative dermatology symposium proceedings**. Elsevier, 2000. p. 40-46.
- UNIT, Immunology Research. **Sistema imunitário e imunidade no porco: a pele**. Disponível em: <https://www.3tres3.com.pt/artigos/sistema-imunitario-e-imunidade-no-porco-a-pele_11392/> Acesso em: 21 abr. 2023. Publicado em 13 de abril de 2018.
- VIDAL, L. M. T. Polimorfismo de alcaloides naturais da *Aniba riparia* (NEES) MEZ (LAURACEAE). 2019. 61 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- VOGLER, Melanie et al. Hypoxia modulates fibroblastic architecture, adhesion and migration: a role for HIF-1 α in cofilin regulation and cytoplasmic actin distribution. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69128, 2013.
- WAGNER, Vivian Petersen et al. Effects of copaiba oil topical administration on oral wound healing. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 8, p. 1283-1288, 2017.
- WANG, Haiting e cols. Mecanismo antibacteriano da fraxetina contra *Staphylococcus aureus*. **Relatórios de Medicina Molecular**, v. 10, n. 5, p. 2341-2345, 2014.
- WANG Q, Zhuang D, Feng W, Ma B, Qin L, Jin L. Fraxetin inhibits interleukin-1 β -induced apoptosis, inflammation, and matrix degradation in chondrocytes and protects rat cartilage *in vivo*. **Saudi Pharm J**. 2020.
- WERNER S, KRIEG T, SMOLA H. Keratinocyte–fibroblast interactions in wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**. 127:998–1008, 2007.
- WERNIG, Gerlinde et al. Unifying mechanism for different fibrotic diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 18, p. 4757-4762, 2017.
- WIETECHKA, Mateusz S.; CERNY, Wendy L.; DIPIETRO, Luisa A. Mechanisms of vessel regression: toward an understanding of the resolution of angiogenesis. **New perspectives in regeneration**, p. 3-32, 2013.
- WU, Bin et al. Antifibrotic effects of Fraxetin on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by targeting NF- κ B/I κ B α , MAPKs and Bcl-2/Bax pathways. **Pharmacological Reports**, v. 71, n. 3, p. 409-416, 2019.
- YU, Akane et al. Effect of EGF and bFGF on fibroblast proliferation and angiogenic cytokine production from cultured dermal substitutes. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 23, n. 10, p. 1315-1324, 2012.

ZHOU, Guoliang et al. Rosiglitazone accelerates wound healing by improving endothelial precursor cell function and angiogenesis in db/db mice. **PeerJ**, v. 7, p. e7815, 2019.

ZYMEK, Pawel et al. Interleukin-10 is not a critical regulator of infarct healing and left ventricular remodeling. **Cardiovascular research**, v. 74, n. 2, p. 313-322, 2007.

APÊNDICE

APÊNDICE A – ARTIGO DE PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA SUBMETIDO A REVISTA THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY

TECHNOLOGICAL PROSPECTING ON STRATEGIES USED IN WOUND HEALING THROUGH PATENT MINING

Dhara Leite Lopes, Cristiane Flora Villareal and Paulo José Lima Juiz

Abstract

Treatment of wounds could be considered a health issue. This paper presents a comprehensive understanding of the technological development in drug discovery. The present work was carried out through exploratory document research in a patent database and on scientific journal websites, an approach that is both qualitative and quantitative. Patent mapping was performed using the Orbit Intelligence database. This study has described 2153 innovative wound treatment strategies focused on the four stages of the healing process: hemostasis, inflammation, proliferation, and maturation. China has been considered a potential market for technologies related to wound healing, with 38.92% of all patents having been filed in this country. The innovative wound treatment strategies, including dressings that gradually release hydrophilic and hydrophobic molecules to ameliorate the healing process and 3D bioprinting of tissues to mimic the natural environmental system, possibly incorporating living cells, growth factors, and biomolecules were designed to decrease inflammation, increase coagulation and vascularization, stimulate fibroblast mitosis and migration, and increase collagen synthesis by fibroblasts. The management market is expected to grow further, focusing on developing dressing capable of restricting bacterial growth, controlling inflammation, and stimulating wound healing.

Keywords: Drug discovery, biotechnology, wound healing

1. Introduction

Treatment of wounds could be considered a health issue. Wounds are estimated to account for USD 30.38 Billion by 2030¹ – approximately £ 5 billion annually, according to data from the UK². For the Smith & Nephew Foundation³, the phenomenon of wounds has been called the "Silent Epidemic," not only because of the implications related to the financial cost

of wound management but also because of the effect on the quality of life described as pain, distress, social isolation, anxiety, extended hospital stay, chronic morbidity or even mortality⁴. Many of these issues are preventable, especially if the correct material or treatment is chosen.

The overall costs associated with chronic wound treatment seemed to be the core of the problem. Chronic wounds result from an impairment of the physiological process of wound healing, which includes four steps: hemostasis, inflammation, proliferation, and maturation, whose correct and well-coordinated work ensures proper healing^{5,6}.

The first stage of wound healing is hemostasis, and vasoconstriction of the vessel walls is the primary function of terminating bleeding and preventing blood loss. The platelet is the critical cell involved in this process; the critical matrix component is fibrinogen⁷. Platelets activate the coagulation complexes leading to thrombus formation, the provisional wound matrix for infiltrating other cells in the subsequent stages of healing⁸.

The second stage of wound healing is inflammation. The injury activates an immune response against pathogens entering the wound, finally preparing the tissue for restoring anatomical integrity. Neutrophils are the first responders to injury. They release toxic granules, producing an oxidative burst, initiating phagocytosis, and generating neutrophil extracellular traps (NETs) to destroy bacteria. In addition, other innate and adaptive immune cells, such as macrophages, mast cells, Langerhans cells (LCs), T cells, and B cells, participate in the process⁸.

The proliferative phase involves the formation of granulation tissue, neovascularization, and re-epithelialization⁹. During this stage, the participation of M2 macrophages and fibroblasts is crucial. Pro-wound healing macrophages release IL-10, a potent anti-inflammatory mediator, and Platelet-Derived Growth Factor (PDGF- β) to induce epithelial repair. Similarly, this subset of macrophages inhibits the actions of matrix metalloproteinases (MMPs)¹⁰. In addition, fibroblasts are activated in the granulation tissue, acquiring α -SM actin expression, thus becoming myofibroblasts. These myofibroblastic cells synthesize and deposit the extracellular matrix components that eventually replace the provisional matrix¹¹.

The maturation phase of healing involves a progressive remodeling of the granulation tissue and scar formation, where proteolytic enzymes, essentially matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinases) play a significant role¹². Progressively, elastin is produced, and collagen type III is replaced by collagen type I, which is the main structural component of the dermis.

However, when the aforementioned organized process fails, skin tissue healing is delayed, resulting in chronic wounds. Standard features of non-healing wounds are exudation,

repeated infection, tissue necrosis, defective re-epithelization, decreased angiogenesis, and overproduction of Reactive Oxygen Species (ROS)^{5,6}.

Therefore, medical drugs should be applied to chronic and acute wounds to prevent the overexpression of inflammation and wound infection. In this context, due to the biological properties found in medicinal plants, natural compounds are promising molecules.

Phytochemicals are reported to possess remarkable wound healing activity¹³. Dorjsembe and colleagues¹⁴ have shown that flavonoids such as chlorogenic acid, apigenin, artemetin, luteolin, quercetin, and shaftoside are anti-inflammatory and stimulate collagen expression and keratinocyte differentiation. In addition, Triterpenoids, flavonoids, coumarins, and quinones promote fibroblast proliferation¹⁵. Carotenoids (crocin, crocetin, picrocrocetin, and safranal), monoterpenoids, flavonoids, and phenolic acids reduce the level of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6), increase the level of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10), and enhance vascularization and fibroblast proliferation^{15,16,17}. The principal advantages of these natural compounds are low cost, high availability, and reduced side effects.

In order to pave the way for promoting wound healing, a comprehensive understanding of the technological development will be helpful in biomedical device manufacturing for addressing chronic wound healing. Hence, this article gives a general overview of the recent advances in wound healing, focusing on patented scientific research.

2. Material and Methods

The present work was carried out through exploratory document research in a patent database and on scientific journal websites, an approach which is both qualitative and quantitative. Patent mapping was performed using the Orbit Intelligence database, produced by Questel Orbit Inc, a French-American company and one of the global leaders in this segment since the 1970s. The syntax to access patent data related to biomaterial used in wound healing was (WOUND HEALING)/TI/AB/CLMS AND (A61L-2300)/IPC/CPC. The keywords were therefore typed into the search fields TI (Title), AB (Abstract), and CLMS (Claims), as shown in the syntax. In addition, we determined the International Patent Classification (IPC) to obtain a portfolio more aligned with the research proposal. The IPC chosen was A61L-2300, which means Biologically active materials used in bandages, wound dressing, absorbent pads, or medical devices. Only patents filed after 2003 were included in this study, and the survey was carried out on March 23rd, 2023. The exclusion criteria for the selection of documents were

1. Exclusion of same and unrelated patents,

2. Exclusion of patents related to devices used for administration or methods to extract bioactive compounds.

The theoretical framework on the subject was described in books, articles, theses, and on Scielo, Lilacs, and Pubmed databases.

Based on the results found, we analyzed the assignees and applications of the patents. For data analysis, we used graphic representations provided by the database and electronic spreadsheets to organize the records obtained. Finally, we presented the perspectives for the sector analyzed, considering the compilation of this information.

3. Results and Discussion

Wounds are open cuts, scrapes, or punctures that disrupt the tissue's barrier function and mechanical integrity. Wounds trigger a regulated and complex process to repair injured tissue to maintain body homeostasis. When the skin is injured, different cell types, such as keratinocytes, fibroblasts, functional cells, and growth factors (GFs), are recruited and involved in wound regeneration. However, when the aforementioned organized process fails, skin tissue healing is delayed, resulting in chronic wounds.

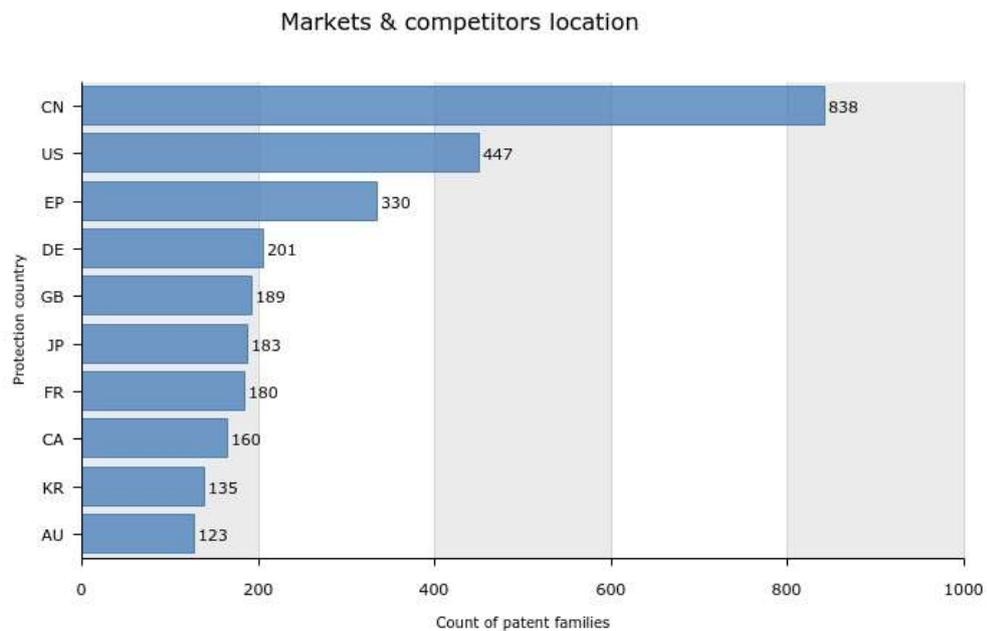
In a population of 1 million, approximately 3500 people will be living with a wound, of which 525 will have had their wound for over one year¹⁸. Posnett and colleagues⁴ have suggested that between 27% and 50% of hospital beds are occupied by patients requiring wound management, which accounts for 3% of all healthcare expenditures³. Therefore, to overcome this health problem, the scientific community has been researching a broad range of chemical compounds and materials to develop functional biomedical device manufacturing for addressing chronic wound healing.

Considering the complex stages of wound healing, and according to Deng and colleagues¹⁹, the challenge is to develop an intelligent wound dressing with antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant properties that, if possible, can positively affect almost all wound types.

In this scenario, the present technological prospecting found 2153 patent applications. Shows the trends in the number of patent applications submitted from 2003 to 2022, with an increasing volume from 2016 to 2022, with peaks of 224 patents in 2018 and 243 patents in 2021. Over the years, the increased number of patent applications has resulted from novel technological improvements in biomedical research technologies in wound healing. According to Tottoli and colleagues²⁰, research in wound healing is constantly updated by several efforts

in different fields, including interdisciplinary science, material science engineering, and gene therapies.

Patent rights are territorial, meaning a patent granted in one country does not have an effect on a foreign country. Therefore, if a business demands an exclusive market for its technology or wants to prevent competitors from copying or stealing it, filing the application in each country a crucial market strategy. From this parameter, data collection (Figure 1) identified that China is a potential market for technologies related to wound healing since 38.92% of all patents were filed in this country, followed by the United States at 20.76% and the European Patent Office at 15.32%. Wounds in China are severe problems, and China has a considerable demand for tissue repair and regeneration. This is partly due to its massive population, which implies extensive health care for traumatic diseases, and the rapid economic growth and modernization, accompanied by numerous injuries and accidents²¹.

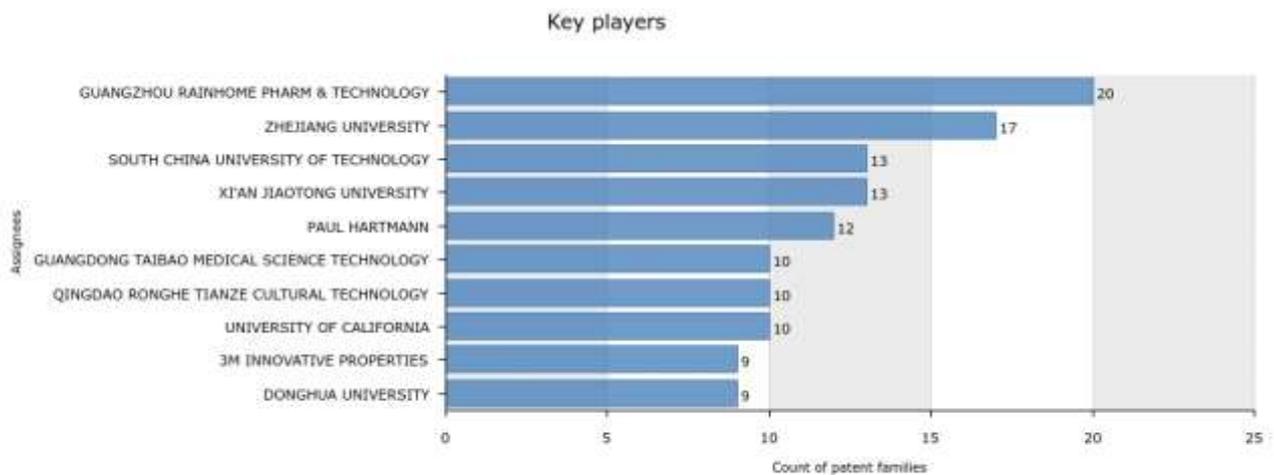


© Questel 2023

Figure 1. Market and competitors location considering the number of patent family related to wound healing. CN-China, US-United States, EP-European Patent, DE-Germany, GB-Great Britain, JP-Japan, FR-France, CA-Canada, KR-Korea, AU-Australia

Moreover, with significant development in genetics, auxology, stem cell biology, and tissue engineering, Chinese companies are trying to progress in science-based innovation. Essential measures have been taken to raise research and development spending and train scientists. Chinese companies in science-based industries are developing their approaches by taking advantage of China's lower cost and the significant number of researchers to industrialize and accelerate experimentation in drug discovery²².

Among the top 10 key players (Figure 2), the primary patent holder is the assignee Guangzhou Rainhome Pharm & Technology, with 20 patent families filed. Rainhome is a national high-tech manufacturer focused on designing, developing, producing, and supplying medical wound dressing and negative pressure wound therapy systems. The company has approved the completion certificates for exporting, such as FDA, CE, ISO EN13485, and Medical Device Production License. Rainhome was established in 2004 and is located in Guangzhou City, China. its mission is caring for life, researching health, and providing better wound dressings for its customers²³.



© Questel 2023

Figure 2. Top 10 Key players considering the number of patent family related to wound healing.

In the second to fourth positions, the results showed three Chinese universities, Zhejiang University, South China University of Technology, and Xi'an Jiaotong University. Universities play a crucial role in a country's national innovation system, driving economic development, technological performance, and competitiveness. Several studies show university patenting in China. Hong²⁴ has presented the importance of universities in the Chinese innovation system, describing the industry's heavy dependence on university research. Li²⁵ has indicated that the increased number of patent applications by Chinese universities is stimulated by regional patent subsidy programs, increasing R&D expenditures, and an increasingly patent-friendly legal environment.

In addition, to identify relevant patent documents, an analysis of the CPC code was performed. The CPC code is an indication of the technological application of the innovation. Table 1 shows the top 10 CPC codes described in this research. According to Chae and Gim²⁶, patent classification systems can show the trends in applicants' technological inventions, as well as predicting future technology market trends and the impact of technology in a specific area.

The data presented in Table 1 strengthen the focus on research and development of methods and materials for bandages, dressings, absorbent pads, or surgical articles. Some patents received more than one classification related to genetic engineering (IPC code C12N), peptides-based products (IPC code C07K), and polysaccharides-based products (IPC code C08B). These results are supported by literature data¹⁹ showing that many polymers mimic the skin, rendering suitable conditions and structures to different wound types. Moreover, incorporating peptides (i.e., growth factors), active agents, stem cells, and a range of biomedical devices (i.e., nanofibrous scaffolds, hydrogels, wearable wound monitors) can facilitate wound healing¹⁹.

Table 1. IPCs related to patent used for wound healing

IPC Code	Brief description of IPC meaning	Total of patents
A61L	METHODS OR APPARATUS FOR STERILISING MATERIALS OR OBJECTS IN GENERAL; DISINFECTION, STERILISATION OR DEODORISATION OF AIR; CHEMICAL ASPECTS OF BANDAGES, DRESSINGS, ABSORBENT PADS OR SURGICAL ARTICLES; MATERIALS FOR BANDAGES, DRESSINGS, ABSORBENT PADS OR SURGICAL ARTICLES	2153
A61K	PREPARATIONS FOR MEDICAL, DENTAL OR TOILETRY PURPOSES	811
A61P	SPECIFIC THERAPEUTIC ACTIVITY OF CHEMICAL COMPOUNDS OR MEDICINAL PREPARATIONS	577
A61F	FILTERS IMPLANTABLE INTO BLOOD VESSELS; PROSTHESES; DEVICES PROVIDING PATENCY TO, OR PREVENTING COLLAPSING OF, TUBULAR STRUCTURES OF THE BODY, e.g. STENTS; ORTHOPAEDIC, NURSING OR CONTRACEPTIVE DEVICES; FOMENTATION; TREATMENT OR PROTECTION OF EYES OR EARS; BANDAGES, DRESSINGS OR ABSORBENT PADS; FIRST-AID KITS	315
C08J	WORKING-UP; GENERAL PROCESSES OF COMPOUNDING; AFTER-TREATMENT NOT COVERED BY SUBCLASSES C08B, C08C, C08F, C08G or C08H	137
C07K	PEPTIDES	114
C12N	MICROORGANISMS OR ENZYMES; COMPOSITIONS THEREOF; PROPAGATING, PRESERVING, OR MAINTAINING MICROORGANISMS; MUTATION OR GENETIC ENGINEERING; CULTURE MEDIA	107
A61Q	SPECIFIC USE OF COSMETICS OR SIMILAR TOILETRY PREPARATIONS	105
C08B	POLYSACCHARIDES; DERIVATIVES THEREOF	76

Throughout the healing process, there are phases called hemostasis, inflammatory, proliferative, and regeneration phases, including maturation, scar formation, and re-epithelialization²⁷. This article also presents innovative strategies for each step to ameliorate the healing process.

In the primary hemostasis and coagulation phase, blood platelets present hemostatic roles, forming a fibrin clot to cease blood flow and providing a scaffold for incoming

inflammatory cells²⁸. To improve this process, the invention CN114225096, "Composite hydrogel for promoting wound healing and preparation method and application thereof," provides a composite hydrogel for promoting wound healing. The composite comprises a hydrogel matrix formed by cross-linking methacrylate silk fibroin, methacrylate glucan associated with platelet-rich plasma, and an acellular dermal matrix. In addition, the invention US5165938, "Wound healing agents derived from platelets," is described as a composition containing materials released by platelets during the platelet release reaction, applied directly to wounds for accelerating wound healing by increasing vascularization, stimulating fibroblast mitosis and migration and increasing collagen synthesis by fibroblasts. Indeed, activating platelets is a critical process to form a net of fibrin, fibronectin, vitronectin, and thrombospondin to protect from bleeding^{29,30}. Additionally, a blood clot protects an injured environment against bacterial invasion²⁹.

Healing is a complex process, and inflammation has a crucial role. The healing process becomes pathologic as long as the regulatory mechanism is impaired. Neutrophils are the "first responders" for tissue injury. The central role of neutrophils is to prevent bacterial invasion due to their high-efficiency phagocytosis of pathogens³¹. Furthermore, neutrophils amplify inflammation by releasing cytokines and chemokines, such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, CXCL8, CXCL2, and MCP-1³² and recruit M1 macrophages. Although the inflammatory phase is required for wound healing, overexpression of pro-inflammatory cytokines is associated with poorly healing wounds; in other words, the inflammatory process should be controlled; consequently, macrophages polarize from a pro-inflammatory M1 phenotype towards a pro-healing reparative M2 phenotype. Aligning with this idea, this study described patents whose purpose was to control inflammation.

The invention CN114225098, "Medical dressing capable of resisting bacteria and promoting wound healing," discloses an antibacterial medical dressing capable of promoting wound healing. The dressing is made of PEGylated chitosan, responsible for antibacterial properties and polarization of macrophages into an M2 phenotype with an anti-inflammatory repairing effect.

In addition, the invention CN114081894, "Pharmaceutical application of calycosin-7-glucoside/calycosin for promoting wound healing and gelatin sponge based on calycosin glycoside/calycosin," describes the application of calycosin-7-glucoside/calycosin in preparing a medicine for promoting wound healing and gelatin sponge based on the calycosin-7-glucoside/calycosin properties, used for increasing the level of M2 type cell factors. In-vitro experiments have shown that the calycosin reduces the expression of M1 type factors IL-1 β ,

IL-6, and IL-12 and promotes the expression of M2 type macrophage anti-inflammatory cytokine IL-10. Modifying macrophage phenotype may become a promising therapeutic approach to treat chronic skin inflammation³³, and the release of IL-10 by wound-associated macrophages induces epithelial repair⁹. Moreover, Peripheral blood Tregs express IL-10 to suppress inflammation by inhibiting Th1, Th2, Th17 cells, and CD8+ T lymphocytes³⁴. Notably, Haertel and colleagues³⁵ have shown that Treg depletion compromised normal acute wound healing, leading to impaired re-epithelialization and delayed vessel maturation.

During the proliferative phase, Growth factors (GFs) such as PDGFs, FGFs, the epidermal growth factor (EGF), TGF- β , VEGF, and the granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) are essential in cell growth, proliferation, migration, and differentiation. For these reasons, an important approach of a patent designed to promote wound healing is to induce the expression of GFs. In line with this idea, the invention CN113402733, "Composite hydrogel as well as preparation method and application thereof," describes a composite hydrogel to promote vascularization, up-regulating the expression levels of TGF-beta, EGF, and VEGF. Another method described (CN113144283 "TSCP-GelMA hydrogel for promoting wound healing as well as preparation and application of TSCP-GelMA hydrogel") is the preparation of a TSCP-GelMA hydrogel based on tilapia polypeptide to promote wound collagenous fiber proliferation and expression of TGF-beta1.

Innovative strategies in tissue engineering offer materials that can influence cell behavior and promote wound healing. Bioactive dressings have been developed in this scenario to release active substances, like growth factors. According to Nardini and colleagues³⁶, these dressings gradually release hydrophilic and hydrophobic molecules to ameliorate the healing process. For this purpose, the patent CN114601960 comprises a polyacrylamide hydrogel and calcium alginate microspheres loaded with a vascular endothelial growth factor (VEGF). The VEGF can be released slowly to promote angiogenesis, an essential step in forming granulation tissue. Angiogenesis represents the formation of new blood vessels required to transport nutrients, oxygen, GFs, and circulating cells for wound healing and tissue regeneration³⁷.

In the regeneration phase, fibroblasts express α -SM actin and become myofibroblasts with contractile properties, playing a role in the contraction and maturation of the granulation tissue³⁸. A Pearl polypeptide gel was designed by Ruan HuaJun, Tao JunJun, and Tang Zhangming to promote wound healing. Experiments have proven that the pearl polypeptide gel promotes the proliferation and migration of skin fibroblasts (CN115057908). In addition, a medical hyaluronic acid hydrogel dressing containing chlorogenic acid and paeoniflorin used for covering wounds, moisturizing, and slowly releasing drugs also promotes fibroblast

proliferation and migration, besides neovascularization and reducing inflammatory response (CN112791229).

The third healing phase, scar formation, involves matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinases). Progressively, collagen type III, the major component of the granulation tissue, is replaced by collagen type I, which is the main structural component of the dermis³⁹.

In this context, gene-based strategies have been used for treating and repairing tissue defects. For instance, a medical yeast recombinant III-type collagen dressing preparation method is described in the patent CN113813439. The preparation method comprises parts of yeast recombinant III-type collagen, glycerin, carbomer, and purified water. After adjusting pH to 5-7.5, the dressing stock solution is filtered and injected into a sheet-shaped forming mold. A frozen dressing product is prepared, dried, and used to obtain the flaky medical yeast recombinant III type collagen dressing applied to skin inflammation reactions. The risk of hyperpigmentation and scar formation after inflammation is reduced.

Alternatively, 3D bioprinting of tissues has been an innovative technique to create biocompatible 3D structures mimicking the natural environmental system, possibly incorporating living cells, growth factors, and biomolecules⁴⁰, as observed in the patent CN114191601, which describes a starch gel hemostatic material based on a 3D printing technology with active and passive hemostatic functions to promote skin wound healing. According to the invention CN113181419, a novel composite hydrogel stent prepared by a 3D biological printing technology with a rough surface benefits cell adhesion and provides a microenvironment similar to an in-vivo extracellular matrix for cells, collagen deposition is accelerated, and scar formation is reduced.

An important point to ponder is the microbes' role in wound healing. Gram-positive bacteria, including *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* and Gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* species, and *Morganella* species present in the wound tend to degrade the ECM and growth factors. These bacteria generally produce biofilms as a barrier to protect them from immune cells. Additionally, this biofilm is toxic to the other skin cells, contributing to the delay in wound healing^{41,42}. Since many bacteria have become resistant to antibiotic therapy, using antibiotics to treat chronic wounds has been challenging⁴³. Table 2 presents recent innovative strategies for dressing with antimicrobial properties.

Table 2. Innovative strategies for dressing with antimicrobial properties.

TITLE	ASSIGNEE	DESCRIPTION
CN114404648 Preparation method of degradable antibacterial hemostatic hydrogel for promoting diabetes wound repair	ZHANG PEIHUA LI JIN FAN XIANMOU	A preparation method of degradable antibacterial hemostatic hydrogel capable of promoting diabetic wound repair. The hydrogel is prepared from dopamine grafted oxidized natural polysaccharide and jellyfish collagen through a cross-linking agent. The collagen is derived from plankton, and compared with animal-derived collagen, prevent zoonosis transmission.
CN114470298 Antibacterial nano-silver/lignin polyurethane dressing and one-step method for preparing dressing	NINGBO INSTITUTE OF MATERIALS TECHNOLOGY & ENGINEERING - CHINESE ACADEMY OF SCIENCES	In the antibacterial dressing, lignin is uniformly distributed in polyurethane, nano-silver is uniformly loaded on the surface of lignin polyurethane, and the loading capacity of the nano-silver is 0.001%-0.01%. The low-content nano-silver can reduce toxic damage to human body.
CN113663122 Anti-inflammatory, antibacterial and anti-tumor multifunctional hydrogel material as well as preparation method and application thereof	SHAANXI UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY	The invention provides an anti-inflammatory, antibacterial and anti-tumor multifunctional hydrogel which composition contains doxorubicin solution, ascorbic acid solution and a sodium selenite solution into a sodium alginate in a mixed solution.
CN114796593 Antibacterial peptide-hydrogel for medical dressing as well as preparation method and application of antibacterial peptide-hydrogel	UNIVERSITY SICHUAN SCIENTIFIC & ENGINEERING CHENGDU PANWISHU BIOTECHNOLOGY	An antibacterial peptide-hydrogel for medical dressings as well as a preparation method and application of the antibacterial peptide-hydrogel. The antibacterial peptide-hydrogel is prepared from N-isopropylacrylamide, ammonium persulfate, N-N methylene bisacrylamide, NNNN-tetramethylethylenediamine and water. Its antibacterial effect was shown on <i>Staphylococcus aureus</i> .
CN112891616 Chitosan sodium hyaluronate antibacterial liquid film and preparation method thereof	ZHOU JIANDA GENG JINXIU CENG HANLING CHEN ZHENG CHEN JIA TANG FENGJIE	A chitosan sodium hyaluronate antibacterial liquid film which comprises chitosan, cell growth factors, sodium hyaluronate, glyceryl phospholipid, coconut oil, propylene glycol, butyl acetate and ethyl acetate. The chitosan sodium hyaluronate antibacterial liquid film is waterproof, breathable, and biocompatible.
CN114053473 Preparation method and application of ferroferric oxide composite nano-enzyme antibacterial agent	KUNMING UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY	A biocompatible ferroferric oxide composite nano-enzyme antibacterial agent. In the presence of potassium persulfate, the Fe3O4-CNT-Hemin/ATP has a strong bacteriostatic and bactericidal effect on pathogenic bacteria.
CN113476645 Antibacterial hydrogel dressing for diabetic wound repair and preparation method thereof	JILIN UNIVERSITY	An antibacterial hydrogel dressing for diabetic wound repair which composition is TiO2/Ag3PO4 phosphate suspension, a polyacrylic acid (PAA) aqueous solution, a calcium chloride aqueous solution and a glucose oxidase aqueous solution. Long-acting and high antibacterial activity and low cytotoxicity are maintained, and healing of a diabetic wound is promoted.

CN114028607 Liquid dressing and preparation method thereof	QINGDAO ORIGINHERB MEDICAL TECHNOLOGY	The liquid dressing is prepared from high-purity water, antibacterial agent, menthol, polyvinyl alcohol, octenidine, sodium benzoate, wound healing accelerant, hemostatic, glycerol, absolute ethyl alcohol and sodium carboxymethyl cellulose. The chitosan oligosaccharide and octenidine play an bactericidal activity.
CN114191603 Composite liposome hydrogel medical dressing and preparation method thereof	JIANGSU ADVANCED POLYMER MATERIALS RESEARCH INSTITUTE NANJING YANFANG TECHNOLOGY	A composite liposome hydrogel medical dressing. The drug-loaded liposome is dispersed into the hydrogel to prepare the drug-loaded hydrogel capable of controlling the active molecule release capability and enhancing the mechanical property.

4. Conclusion

This study has described 2153 innovative wound treatment strategies focused on the four stages of the healing process: hemostasis, inflammation, proliferation, and maturation. Biomedical research technologies in wound healing are promising since the patent application number has risen from 2003 to 2022. Because China has a massive population, a great number of traumatic diseases, and a significant number of researchers to industrialize and accelerate experimentation in drug discovery, China has been considered a potential market for technologies related to wound healing, 38.92% of all patents having been filed in this country. At the time that this paper was written, the primary patent holder is the assignee Guangzhou Rainhome Pharm & Technology, with 20 patent families filed. The innovative wound treatment strategies – including dressings that gradually release hydrophilic and hydrophobic molecules to ameliorate the healing process, and 3D bioprinting of tissues to mimic the natural environmental system, possibly incorporating living cells, growth factors, and biomolecules—were designed to decrease inflammation, increase coagulation and vascularization, stimulate fibroblast mitosis and migration, and increase collagen synthesis by fibroblasts. Due to increasing life expectancy, comorbidities, and drug resistance, the wound care and management market is expected to grow further, focusing on the development of dressing capable of restricting bacterial growth, the control of inflammation, and the stimulation of wound healing.

References

- 1 Market, Research Community. “Wound Care Market Share, Size by Product (Advanced Wound Dressing), By Application (Chronic Wounds), End-Use (Hospitals), and Region (Asia Pacific, Europe, North America, Middle East, and Africa, Latin America), and forecast period-2022 – 2030”. Report ID - MRC_691. Pages – 215. Category - Healthcare and Pharma, 2023. Web 16 Apr. 2023. Available in: https://marketresearchcommunity.com/wound-care-market/?gclid=EAIaIQobChMIxNT5iNeB_gIVcMmUCR0C0QleEAAYASAAEgKXDPD_BwE
- 2 Guest JF, Ayoub N, Mcilwraith T, Uchegbu I, Gerrish A, Weidlich D, Vowden K, Vowden P. Health economic burden that wounds impose on the national health service in the uk. *Bmj Open* 2015; 5:e009283.
- 3 Smith & Nephew Foundation. Skin breakdown – the silent epidemic. Smith & Nephew foundation, hull, 2007.
- 4 Posnett J, Gottrup F, Lundgren H, Saal G. The resource impact of wounds on health-care providers in europe. *J Wound Care* 2009, 18: 154–61.
- 5 Huang, Y.Z.; Gou, M.; Da, L.C.; Zhang, W.Q.; Xie, H.Q. Mesenchymal stem cells for chronic wound healing: current status of preclinical and clinical studies. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2020, 26, 555–570.
- 6 Larouche, J.; Sheoran, S.; Maruyama, K.; Martino, M.M. Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets. *Adv. Wound Care* 2018, 7, 209–231.
- 7 Rumbaut, R. E.; Thiagarajan, P. Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis. *Synthesis Lectures on Integrated Systems Physiology: from molecule to function*, v. 2, n. 1, p. 1-75, 2010.
- 8 Rodrigues, M.; Kosaric, N.; Bonham, C. A.; Gurtner, G. C. Wound healing: a cellular perspective. *Physiological reviews* 2019, 99(1), 665-706.
- 9 Ellis, S.; Lin, E.J.; Tartar, D. Immunology of wound healing. *Curr. Dermatol. Rep.* 2018, 7, 350–358.
- 10 Brazil, J.C.; Quiros, M.; Nusrat, A.; Parkos, C.A. Innate immune cell-epithelial crosstalk during wound repair. *J. Clin. Investig.* 2019, 129, 2983–2993.
- 11 Darby, I.A.; Laverdet, B.; Frédéric B.F.; Desmoulière, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 2014, 7: 301–311
- 12 Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003, 92(8):827–839.
- 13 Zohra, T.; Ovais, M.; Khalil, A.T.; Qasim, M.; Ayaz, M.; Shinwari, Z.K. Extraction optimization, total phenolic, flavonoid contents, HPLC-dad analysis and diverse pharmacological evaluations of dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants. *Nat. Prod. Res.* 2019, 33, 136–142
- 14 Dorjsembe, B.; Lee, H.J.; Kim, M.; Dulamjav, B.; Jigjid, T.; Nho, C.W. *Achillea asiatica* extract and its active compounds induce cutaneous wound healing. *J. Ethnopharmacol.* 2017, 206, 306–314.
- 15 Dinda, M.; Mazumdar, S.; Das, S.; Ganguly, D.; Dasgupta, U.B.; Dutta, A.; Jana, K.; Karmakar, P. The water fraction of calendula officinalis hydroethanol extract stimulates in vitro and in vivo proliferation of dermal fibroblasts in wound healing. *Phytother. Res. Ptr* 2016, 30, 1696–1707.
- 16 Givol, O.; Kornhaber, R.; Visentin, D.; Cleary, M.; Haik, J.; Harats, M. A systematic review of calendula officinalis extract for wound healing. *Wound Repair Regen.* 2019, 27, 548–561.

- 17 Shafeie, N.; Naini, A.T.; Jahromi, H.K. Comparison of different concentrations of calendula officinalis gel on cutaneous wound healing. *Biomed. Pharmacol. J.* 2015, 8, 979–992
- 18 Lindholm C, Searle R. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *Int Wound J* 2016, 13:5–15
- 19 Deng, X.; Maree, G. M.; Ali, M.A. A review of current advancements for wound healing: biomaterial applications and medical devices. *J Biomed Mater Res.* 2022, 110:2542–2573.
- 20 Tottoli, Erika Maria, Rossella Dorati, Ida Genta, Enrica Chiesa, Silvia Pisani and Bice Conti. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics* 2020, 12, 735; doi:10.3390/pharmaceutics12080735
- 21 Xiaobing Fu, MD. Wound care in China: from repair to regeneration. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* 2012, 11(3) 143–145.
- 22 Mckinsey Global Institute. The China effect on global innovation. Available in: <https://www.mckinsey.com/~media/mckinsey/featured%20insights/innovation/gauging%20the%20strength%20of%20chinese%20innovation/mgi%20china%20effect_full%20report_october_2015.ashx> Access at: 3 april 2023. Published in: october 2015.
- 23 Rainhome. Guangzhou Rainhome Pharm & Tech Co., Ltd. China. Available in: <<http://www.rainhomedical.com/>> Access at: 5 april 2023.
- 24 Hong, W. (2008). Decline of the center: the decentralizing process of knowledge transfer of chinese universities from 1985 to 2004. *Research policy*, 37, 580–595.
- 25 Li, X. (2012). Behind the recent surge of chinese patenting: an institutional view. *Research policy*, 41, 236–249.
- 26 Chae, S. and Gim, J. A study on trend analysis of applicants based on patent classification systems. *Information* 2019, 10, 364; doi:10.3390/info10120364.
- 27 Singer A.J.; Clark R.A. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999; 341(10):738–746.
- 28 Clark R.A. Fibrin is a many splendored thing. *J Invest Dermatol* 121: xxi–xxii, 2003.
- 29 Del Amo, C.; Perez-Valle, A.; Perez-Zabala, E.; Perez-Del-Pecho, K.; Larrazabal, A.; Basterretxea, A.; Bully, P.; Andia, I. Wound dressing selection is critical to enhance platelet-rich fibrin activities in wound care. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 624.
- 30 Opneja, A.; Kapoor, S.; Stavrou, E.X. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thromb. Res.* 2019, 179, 56–63.
- 31 Kirchner, S.; Lei, V.; Macleod, A.S. The cutaneous wound innate immunological microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 8748
- 32 Phillipson, M.; Kubes, P. The healing power of neutrophils. *Trends Immunol.* 2019, 40, 635–647
- 33 Dipietro, L.A.; Wilgus, T.A.; Koh, T.J. Macrophages in healing wounds: paradoxes and paradigms. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 950.
- 34 Boothby, I.C.; Cohen, J.N.; Rosenblum, M.D. Regulatory T cells in skin injury: at the crossroads of tolerance and tissue repair. *Sci. Immunol.* 2020, 5.
- 35 Haertel, E.; Joshi, N.; Hiebert, P.; Kopf, M.; Werner, S. Regulatory T cells are required for normal and activin-promoted wound repair in mice. *Eur. J. Immunol.* 2018, 48, 1001–1013.
- 36 Nardini Marta, Sara Perteghella, Luca Mastracci, Federica Grillo, Giorgio Marrubini, Elia Bari, Matteo Formica, Chiara Gentili, Ranieri Cancedda, Maria Luisa Torre and Maddalena Mastrogiacomo. Growth Factors Delivery System for Skin Regeneration: An Advanced Wound Dressing. *Pharmaceutics* 2020, 12, 120; doi:10.3390/pharmaceutics12020120
- 37 An, Y.; Liu, W.J.; Xue, P.; Ma, Y.; Zhang, L.Q.; Zhu, B.; Qi, M.; Li, L.Y.; Zhang, Y.J.; Wang, Q.T.; Jin, Y. Autophagy promotes MSC-mediated vascularization in cutaneous wound healing via regulation of VEGF secretion. *Cell Death Dis.* 2018, 9, 58.
- 38 Hinz B, Gabbiani G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost.* 2003; 90(6):993–1002

- 39 Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 1995; 146(1):56–66.
- 40 Antezana, P.E.; Municoy, S.; Álvarez-Echazú, M.I.; Santo-Orihuela, P.L.; Catalano, P.N.; Al-Tel, T.H.; Kadumudi, F.B.; Dolatshahi-Pirouz, A.; Orive, G.; Desimone, M.F. The 3D bioprinted scaffolds for wound healing. *Pharmaceutics* 2022, 14, 464.
- 41 Landén, N.X.; Li, D.; Ståhle, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol. Life Sci.* 2016, 73, 3861–3885.
- 42 Rahim, K.; Saleha, S.; Zhu, X.; Huo, L.; Basit, A. Bacterial contribution in chronicity of wounds. *Microb. Ecol.* 2017, 73, 710–721.
- 43 Tchero, H.; Kangambega, P.; Noubou, L.; Becsangele, B.; Fluieraru, S.; Teot, L. Antibiotic therapy of diabetic foot infections: a systematic review of randomized controlled trials. *Wound Repair. Regen.* 2018, 26, 381–391.