

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Fellipe Danezi Felin

**EFEITO DE UM FORMULADO DESENVOLVIDO COM GUARANÁ E  
SEMENTE DE AÇAÍ EM MODELOS EXPERIMENTAIS PÓS-  
CIRÚRGICOS: ESTUDO DA REPARAÇÃO *IN VITRO E IN VIVO***

**Santa Maria, RS  
2021**

**Fellipe Danezi Felin**

**EFEITO DE UM FORMULADO DESENVOLVIDO COM GUARANÁ E SEMENTE  
DE AÇAÍ EM MODELOS EXPERIMENTAIS PÓS-CIRÚRGICOS: ESTUDO DA  
REPARAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Centro de Ciências da Saúde, Área de Concentração Promoção e Tecnologia em Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências da Saúde**.

Orientador: Prof. Dr. Tiango Aguiar Ribeiro  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS  
2021

Felin, Fellipe Danezi  
EFEITO DE UM FORMULADO DESENVOLVIDO COM GUARANÁ E  
SEMENTE DE AÇAÍ EM MODELOS EXPERIMENTAIS PÓS-CIRÚRGICOS:  
ESTUDO DA REPARAÇÃO IN VITRO E IN VIVO / Fellipe Danezi  
Felin.- 2021.  
123 p.; 30 cm

Orientador: Tiango Aguiar Ribeiro  
Coorientadora: Ivana B M da Cruz  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências da Saúde, RS, 2021

1. Ferida operatória 2. . Cicatrização 3. .  
Colagenização 4. . Regeneração 5. . Cirurgia I. Ribeiro,  
Tiango Aguiar II. da Cruz, Ivana B M III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, FELLIPE DANEZI FELIN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Fellipe Danezi Felin**

**EFEITO DE UM FORMULADO DESENVOLVIDO COM GUARANÁ E SEMENTE DE AÇAÍ EM MODELOS EXPERIMENTAIS PÓS-CIRÚRGICOS: ESTUDO DA REPARAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO***

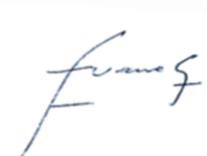
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Centro de Ciências da Saúde, Área de Concentração Promoção e Tecnologia em Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências da Saúde**.

**Aprovada em 02 de setembro de 2021:**



---

**Tiago Aguiar Ribeiro, Dr.**  
(Presidente/Orientador)



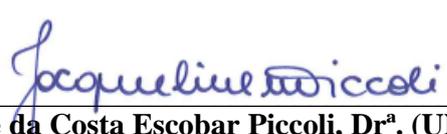
---

**Ivana Baetrice Mânica da Cruz, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Coorientadora)



---

**Neida Luiza Kaspary Pellenz, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**



---

**Jacqueline da Costa Escobar Piccoli, Dr<sup>a</sup>. (UNIPAMPA)**

Santa Maria, RS  
2021

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a minha família pelo seu amor, respeito, união, paciência, carinho, tolerância e incentivo que serviram de estímulo e base sólida para concluí-lo no momento em que terminava minha primeira e ingressava na minha segunda Residência Médica. Por tudo o que significam para mim, pois, só assim, pude vencer cada dificuldade. O amor incondicional por vocês, me fortaleceu a cada momento. Dedico a vocês este trabalho, que é fruto de perseverança e vontade.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos Roberto e Izabella, agradeço e honro a vida que me deram, assim como tudo que me proporcionam amor e dedicação incondicionais. Vocês nunca mediram esforços pela minha felicidade. Essa conquista é nossa!

Aos meus irmãos, Carollina, Giulliano, Giancarlo, Carla e Pauline pela amizade, união, cumplicidade na nossa trajetória de vida onde partilhamos alegrias e dificuldades.

Aos meus avós (*in memoriam*) Therezinha, Benito, Angelin e Arlindo; aos meus tios, Ricardo, Patrícia, Adriana, Sirlei (*in memoriam*) e Vanderlei (*in memoriam*); aos meus primos, Thereana, Júlia e Guilherme. A todos da minha família, pelo carinho e o apoio que servem de alicerce e base segura em todos os momentos da minha vida.

Ao meu Orientador, Professor Dr. Tiango Aguiar Ribeiro e a minha Co-orientadora, Professora Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz, pela oportuna, valiosa, competente e amorosa orientação que tornaram possível a realização deste trabalho. Agradeço também o profissionalismo, a prontidão e o entusiasmo pela pesquisa que tanto me contagiou, vocês dois são inspiração para mim!

À equipe do Laboratório de Biogenômica pelo apoio e ensinamentos frente a bancada, aos mestrandos, doutorandos e alunos de iniciação científica. Obrigada pela ajuda inestimável em época de pandemia, o que tornou tudo ainda mais difícil.

À Coordenação do Mestrado Profissional em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria, extensivo também a todos os docentes do programa, meus agradecimentos pelos generosos ensinamentos e compartilhamento de experiências durante esse período de grande aprendizado.

Ao secretário do Mestrado Profissional em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria, Sr. Murilo, pela atenção, cordialidade e paciência em atender toda e qualquer solicitação.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEAM.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

*“...Pesquisa para constatar, constatando, intervenho,  
intervindo, educo e me educo.  
Pesquisa para conhecer o que ainda não conheço  
e comunicar ou anunciar a novidade...”*

(Paulo Freire)

*“A recompensa que se ganha da realização de um trabalho  
são a experiência, os conhecimentos que adquirimos  
e a sensação de ter contribuído para alguma mudança”*

(Sânia T. Costa)

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
Centro de Ciências da Saúde  
Universidade Federal de Santa Maria

### EFEITO DE UM FORMULADO DESENVOLVIDO COM GUARANÁ E SEMENTE DE AÇAÍ, EM MODELOS EXPERIMENTAIS PÓS-CIRÚRGICOS: ESTUDO DA REPARAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*

AUTOR: Fellipe Danezi Felin  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Tiango Aguiar Ribeiro  
COORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

**Introdução:** O reparo dos tecidos é um processo complexo que exige ativação de mediadores e de mecanismos relacionados à cicatrização e à regeneração. A cicatrização envolve inflamação, proliferação de fibroblastos e remodelagem do colágeno. Estudos têm elucidado a modulação do reparo a nível molecular e bioquímico na tentativa de evitar cicatrizes patológicas. O reparo pode ser influenciado pelo estado nutricional do paciente e por isso ser estimulado por produtos originários de plantas, incluindo o guaraná e o açaí, que possuem efeito cicatrizante por modularem as fases inflamatória e proliferativa. É possível que a combinação destes, resulte em um potencial produto farmacológico inovador, com elevado poder cicatricial. **Objetivo:** Avaliar o efeito de um formulado, desenvolvido com semente de guaraná e de açaí, em modelo experimental de reparo pós-cirúrgico, *in vitro* e *in vivo*. **Métodos:** O estudo não necessita de aprovação em Comitê de ética. Inicialmente foi desenvolvido o extrato conjugado Guaraná- Açaí (GA) com uso de água quente e ácido cítrico, o extrato foi obtido e a análise química foi feita através de espectrofotometria de massa. A capacidade antioxidante e genoprotetora do GA foi analisada respectivamente pelo teste DPPH e Gemo. Uma curva farmacológica concentração-resposta (1, 3, 5, 10 e 30 µg / mL) em fibroblastos (HFF-1) e queratinócitos (HaCAT) ambos obtidos comercialmente foi realizada e a concentração de escolha para os demais testes foi 5 µg / mL. Em fibroblastos então realizou-se o *strach assay*, o chamado ensaio de ferida *in vitro*, após 3,6,24 e 72 horas da indução da lesão e tratamento, foram analisados marcadores oxidativos, marcador apoptótico após 24 horas, colágeno total após 24, 48 e 72 horas e a análise da expressão de genes relacionados a proliferação, colágeno e inflamação após 24 horas. Um segundo protocolo *in vivo* foi realizado utilizando minhoca *Eisenia fetida* após 1,3,6,12 e 24 horas da incisão caudal cirúrgica entre o terceiro e quinto segmento posterior e adição do tratamento com GA ou tampão fosfato para os animais controle foi realizada a análise macroscópica e histológica utilizando a coloração Masson-Goldner. O gene SOX-4 foi mensurado via RT-PCR após 3 e 24 horas. **Resultados:** Dezesesseis moléculas bioativas, incluindo algumas substâncias nunca descritas anteriormente nos extratos isolados foram identificadas. Todas as concentrações testadas no modelo celular exibiram efeitos não citotóxicos e antioxidantes além de genoprotetores. A concentração de escolha 5 µg / mL apresentou efeitos pró-regeneração em modelo *in vitro*. O extrato de GA acelerou os processos de cicatrização observados em células e por meio de análises macroscópicas e histológicas em minhocas. **Conclusão:** Apesar das limitações metodológicas, estes resultados indicaram que o extrato de GA tem potencial acelerador da cicatrização/ regeneração de feridas induzidas *in vitro* ou cirurgicamente *in vivo*. Mais estudos precisam ser realizados para que este resultados possam se transformar em um produto a ser disponibilizado a população, trazendo benefícios a sociedade como um todo.

**Palavras-chave:** Ferida operatória. Cicatrização. Colagenização. Regeneração. Cirurgia. Reparo.

## ABSTRACT

*Masters dissertation*

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Centro de Ciências da Saúde

Universidade Federal de Santa Maria

### **EFFECT OF A FORMULA DEVELOPED WITH GUARANA AND AÇAÍ SEED IN POST-SURGICAL EXPERIMENTAL MODELS: *IN VITRO* AND *IN VIVO* REPAIR STUDY**

AUTHOR: Fellipe Danezi Felin

ADVISOR: Prof. Dr. Tiango Aguiar Ribeiro

CO-ADVISOR: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

**Introduction:** Tissue repair is a complex process that requires activation of mediators and mechanisms related to healing and regeneration. Healing involves inflammation, fibroblast proliferation and collagen remodeling. Studies have elucidated the modulation of repair at the molecular and biochemical level in an attempt to avoid pathological scarring. The repair can be influenced by the patient's nutritional status and, therefore, be stimulated by products originating from plants, including guarana and açai, which have a healing effect by modulating the inflammatory and proliferative phases. It is possible that the combination of these results in a potential innovative pharmacological product, with high healing power. **Objective:** To evaluate the effect of the formula, developed with guarana and açai seeds, in an experimental model of post-surgical repair, *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** The study does not need to be approved by the Ethics Committee. Initially, the conjugate extract Guaraná-Açai (GA) was developed using hot water and citric acid, the extract was obtained and the chemical analysis was carried out through mass spectrophotometry. The antioxidant and genoprotective capacity of GA were analyzed respectively by the DPPH and Gemo tests. A pharmacological concentration-response curve (1, 3, 5, 10 and 30 µg / mL) in fibroblasts (HFF-1) and keratinocytes (HaCAT) both commercially obtained was performed and the concentration of choice for the other tests was 5 µg / mL. In fibroblasts, the strach assay was performed, the so-called *in vitro* wound assay, after 3,6, 24 and 72 hours of injury induction and treatment, oxidative markers were analyzed, apoptotic marker after 24 hours, total collagen after 24, 48 and 72 hours and analysis of the expression of genes related to proliferation, collagen and inflammation after 24 hours. A second *in vivo* protocol was performed using *Eisenia fetida* earthworm after 1,3,6,12 and 24 hours of the surgical caudal incision between the third and fifth posterior segment, and addition of treatment with GA or phosphate buffer for the control animals, macroscopic and histological analysis was performed using Masson staining -Goldner. The SOX-4 gene was measured via RT-PCR after 3 and 24 hours. **Results:** Sixteen bioactive molecules, including some substances never previously described in the isolated extracts, were identified. All concentrations tested in the cell model exhibited non-cytotoxic and antioxidant effects in addition to genoprotective. The concentration of choice 5 µg / mL showed pro-regeneration effects in an *in vitro* model. The GA extract accelerated the healing processes observed in cells and through macroscopic and histological analysis in earthworms. **Conclusion:** Despite the methodological limitations, these results indicated that the GA extract has the potential to accelerate the healing/regeneration of wounds induced *in vitro* or surgically *in vivo*. More studies need to be carried out so that these results can become a product to be made available to the population, bringing benefits to society as a whole.

Keywords: Operative wound. Healing. Collagenization. Regeneration. Surgery. Repair.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Mapa conceitual – Tipos de Reparação: Regeneração e Cicatrização.....	16
<b>Figura 2</b> – Reparo por primeira (ferida fina) e segunda intenção (cura com formação de cicatriz e contração) de acordo com a quantidade de tecido regenerado e/ou colagenizado....	17
<b>Figura 3</b> – Fases da Cicatrização de Feridas. ....	21
<b>Figura 4</b> – Sequência de acontecimentos dos eventos do reparo dos tecidos.....	21
<b>Figura 5</b> – Imagem ilustrativa da microscopia do tecido de granulação com vasos neoformados .....	25
<b>Figura 6</b> – Mapa conceitual do Remodelamento Tecidual.....	26
<b>Figura 7</b> – Guaraná e Açaí. A – Cultivo do Guaraná-Cereçaporanga. B – Cultivo do Guaraná-Maués. C – Colheita do Guaraná. D – Fruto do Açaí.....	27
<b>Figura 8</b> – Delineamento Geral do trabalho .....	32
<b>Figura 9</b> – Linhagens celulares obtidas comercialmente.....	33
<b>Figura 10</b> – Processo de obtenção dos extratos de açaí e guaraná .....	34
<b>Figura 11</b> – Método do arranhão ( <i>scratch assay</i> ) em cultura de fibroblastos.....	36

### Figuras do Artigo em Português

<b>Figura 1-</b> Os efeitos <i>in vitro</i> do extrato conjugado GA em diferentes concentrações em fibroblastos humanos HFF-1 e culturas de queratinócitos HaCAT .....	55
<b>Figura 2-</b> Avaliação do extrato conjugado GA na concentração de 5 µg / mL em fibroblastos dérmicos humanos HFF-1 submetidos ao ensaio de “ferida” <i>in vitro</i> .....	56
<b>Figura 3-</b> Os efeitos modulatórios <i>in vitro</i> em quatro marcadores do metabolismo oxidativo (superóxido, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio-ROS e lipoperoxidação).....	57
<b>Figura 4-</b> Os efeitos modulatórios <i>in vitro</i> do extrato conjugado GA na concentração de em células da derme humana, HFF-1, por avaliação da taxa de apoptose, quantificação de colágeno e expressão de genes relacionados a processos de cicatrização.....	59
<b>Figura 5-</b> Fotografias representativas da incisão cirúrgica nos segmentos anteriores de <i>Eisenia fetida</i> tratadas topicamente com extrato conjugado GA na concentração de 5 µg / mL.....	60
<b>Figura 6-</b> Análise histológica representativa de minhocas <i>Eisenia fetida</i> submetidas a incisão cirúrgica posterior dos três a cinco últimos segmentos com e sem tratamento tópico usando extrato conjugado GA na concentração de 5 µg / mL.....	62

### Figuras do Artigo em Inglês

<b>Figura 1-</b> The <i>in vitro</i> effects of GA-conjugated extract at different concentrations on HFF-1 human fibroblasts and Hacat keratinocytes cultures.....	87
<b>Figura 2-</b> Evaluation of GA-conjugated extract at 5 µg / mL concentration on HFF-1 human dermal fibroblasts submitted to scratch assay experiment.....	89
<b>Figura 3-</b> The <i>in vitro</i> modulatory effects in four oxidative metabolism markers (superoxide, nitric oxide, reactive oxygen species-ROS and lipoperoxidation).....	90
<b>Figura 4-</b> The <i>in vitro</i> modulatory effects of GA-conjugated extract at 5 µg / mL concentration on HFF-1 human dermal by evaluation of apoptosis rate, collagen quantification and expression of genes related to wound healing processes.....	92
<b>Figura 5-</b> Representative photographs of the surgical incision in the anterior segments of <i>Eisenia fetida</i> earthworms topically treated with GA-conjugated extract at 5 µg / mL concentration.....	93
<b>Figura 6-</b> Representative histological analysis of <i>Eisenia fetida</i> earthworms submitted to posterior surgical incision of three last segments with and without topic treatment using GA-conjugated extract at 5 µg / mL concentration.....	95

## LISTA DE SIGLAS

ATCC® SCRC-1041™	Fibroblastos da linhagem HFF-1
ATP	Adenosina trifosfato
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
DAMPS	<i>Danger-associated molecular, patterns</i>
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	2,7 diclorofluoresceína diacetato
DMEM	<i>Dulbecco Modification of Minimum Essential Media</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenil-hidrazina
DP	Desvio Padrão
DPPH	Radical livre estável 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
dsDNA	DNA dupla-fita do inglês, <i>double - stranded DNA</i>
EFF	Fator de crescimento dérmico
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FGF, KGF-1	Marcadores de proliferação celular
FO	Ferida operatória
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	eróxido de hidrogênio
HaCAT	Queratinócitos da linhagem HFF-1
HFF-1	Linhagem comercial de fibroblastos
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HMGB-1	<i>High-mobility group Box 1 protein</i>
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
IL	Interleucina
IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$	Citocinas inflamatórias
IL-10	Citocina anti-inflamatória
KGF-1	Fator de crescimento
LPO	Lipoperoxidação
M	Macrófago
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases
MTT	Teste citotoxicidade método direto do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato oxidase
NIH-3T3	Linhagem comercial de células tronco
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
p21	Proteína 21
P2Y e P2X	Receptores celulares purinérgicos
p53	Proteína tumoral p53
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas

pH	Potencial hidrogeniônico
qRT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i>
RL	Radical livre
RS	Rio Grande do Sul
SD	Desvio padrão, do inglês, <i>Standard Deviation</i>
SOX-4	Gene codificação de proteínas <i>SRY-Box Transcription Factor 4</i>
SPSS	<i>Statistical Package for The Social Sciences</i>
SyBR Green	<i>Sybergreen</i> , corante assimétrico de cianina
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TGFβ	Fator beta transformador do crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 OBJETIVOS .....	20
1.1.1 Objetivo geral .....	20
1.1.2 Objetivos específicos .....	20
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	21
2.1 DINÂMICA DO PROCESSO CICATRICIAL DA PELE .....	21
2.1.1 Fase inflamatória da cicatrização .....	23
2.1.2 Angiogênese, migração e proliferação de fibroblastos .....	25
2.1.3 Formação da cicatriz e remodelamento tecidual .....	26
2.2 PAPEL DOS FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS NA CICATRIZAÇÃO ..	28
2.3 POTENCIAL USO DE EXTRATOS AMAZÔNICOS NA CICATRIZAÇÃO .....	29
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	32
3.1 DELINEAMENTO GERAL DO ESTUDO .....	32
3.1.1 Estudo <i>in vitro</i> : fibroblastos e queratinócitos .....	33
3.1.2 Estudo <i>in vivo</i> : <i>Eisenia Fetida</i> - minhoca californiana .....	34
3.2 TÉCNICAS E FERRAMENTAS QUE SERÃO UTILIZADAS PARA QUE SE ALCANCEM OS OBJETIVOS PROPOSTOS .....	34
3.2.1 Obtenção e caracterização química dos extratos e do formulado .....	34
3.2.2 Ensaios utilizados no estudo <i>in vitro</i> .....	36
3.2.3 Ensaios utilizados no estudo <i>in vivo</i> .....	40
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
3.5 ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO .....	43
<b>4 ARTIGO EM PORTUGUÊS</b> .....	44
<b>5 ARTIGO EM INGLÊS</b> .....	74
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	108
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	109
<b>ANEXO A- DECLARAÇÃO DE PERMISSÃO PARA USO DE IMAGENS FELIN E FELIN (2016)</b> .....	114
<b>ANEXO B- DECLARAÇÃO DE PERMISSÃO PARA USO DAS IMAGENS DAS FIGURAS 7A, 7B E 7C</b> .....	115
<b>Anexo C- DECLARAÇÃO DE PERMISSÃO PARA USO DE IMAGENS DA FIGURA 7D</b> ...	116
<b>ANEXO D- DECLARAÇÃO DE CONCORDÂNCIA PARA A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS NO LABORATÓRIO DE BIOGENÔMICA DA UFSM</b> .....	117
<b>ANEXO E- FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS</b> .....	118
<b>ANEXO F- DECLARAÇÃO DE PERMISSÃO PARA O USO DE IMAGENS DO LABORATÓRIO DE BIOGENÔMICA DA UFSM</b> .....	119

<b>ANEXO G- DECLARAÇÃO DE PERMISSÃO PARA O USO DE IMAGENS RIBEIRO FILHO (2019) .....</b>	<b>120</b>
<b>ANEXO H- CERTIDÃO DE CADASTRO NO SISGEN .....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO I- APROVAÇÃO GABINETE DE PROJETOS DA UFSM.....</b>	<b>122</b>
<b>ANEXO J- COMPROVAÇÃO DA SUBMISSÃO DO ARTIGO .....</b>	<b>123</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e como é responsável por revestir, delimitar, proteger e interagir com o meio exterior, sua integridade, torna-se essencial para a saúde humana. Nesse contexto, o reparo da pele agredida por lesões ou procedimentos cirúrgicos, é também de fundamental importância para a manutenção da saúde, pois a pele íntegra desempenha papel central na proteção do corpo ao meio ambiente (BARONI et al., 2012).

Histologicamente, a pele é constituída por: epiderme (derivada da ectoderme) e derme (derivada da mesoderme). Mais profundamente, encontra-se a tela subcutânea, considerada um compartimento a parte em relação à pele. Abaixo da tela subcutânea, encontra-se a fáscia profunda, e logo após, os ossos e músculos (GAMBA; PETRI; COSTA, 2016; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2016).

A pele não é apenas uma barreira de separação do meio ambiente, mas também, um sistema dinâmico de elementos epiteliais, parenquimais, glandulares e neurovasculares, exercendo papel fundamental para a manutenção da homeostase do organismo (BARONI et al., 2012).

A perda da integridade física e/ou continuidade da pele é denominada ferida ou úlcera. O processo cicatricial é comum a todas as feridas, independentemente do agente causal. Este processo é sistêmico, ativo, bioquímico, molecular, funcional, ocorre em cascata e está diretamente relacionado às condições gerais do organismo, pois vários fatores podem interferir nesse processo altamente complexo (BROUGHTON et al., 2016).

Portanto, a cicatrização de feridas envolve vários mecanismos e diversos fatores como sistema imune, estado de estresse do paciente, nutrição e manejo da ferida (BARBOSA et al., 2011; MOORE et al., 2012).

O processo cicatricial pode ser dividido em três fases: inflamatória, proliferação e de remodelamento/maturação, sendo que fibroblastos e macrófagos (localizados na derme) são células fundamentais nesses processos (KANG et al., 2017).

A lesão tecidual é o estímulo inicial que deflagra o processo de cicatrização. Através de mediadores químicos ocorre aumento da permeabilidade vascular, lesão vascular e transporte de leucócitos para a área lesada, caracterizando a fase inflamatória inicial. A partir da lesão vascular, há exposição do colágeno subendotelial com degradação da matriz extracelular (MEC) e ativação da cascata de coagulação. Com a lesão vascular, também são expostas proteases e integrinas que propiciam a migração de células endoteliais. Estas células produzem fator de crescimento endotelial vascular e angiopoetina que propiciam a formação do broto

capilar. Como a cascata de coagulação também foi ativada, os fatores de crescimento produzidos pelas plaquetas ativadas (fator de crescimento derivado de plaquetas - PDGF- e o fator beta transformador do crescimento - TGF $\beta$ ) fazem o recrutamento de células periendothelias. Toda essa cascata de eventos determina a angiogênese que ocorre especialmente até o quinto dia de reparo por colagenização/cicatrização e que caracteriza a fase inflamatória do reparo. Existem vários fatores que podem modular a angiogênese e interferir nessa fase da cicatrização (FELIN; FELIN, 2016; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

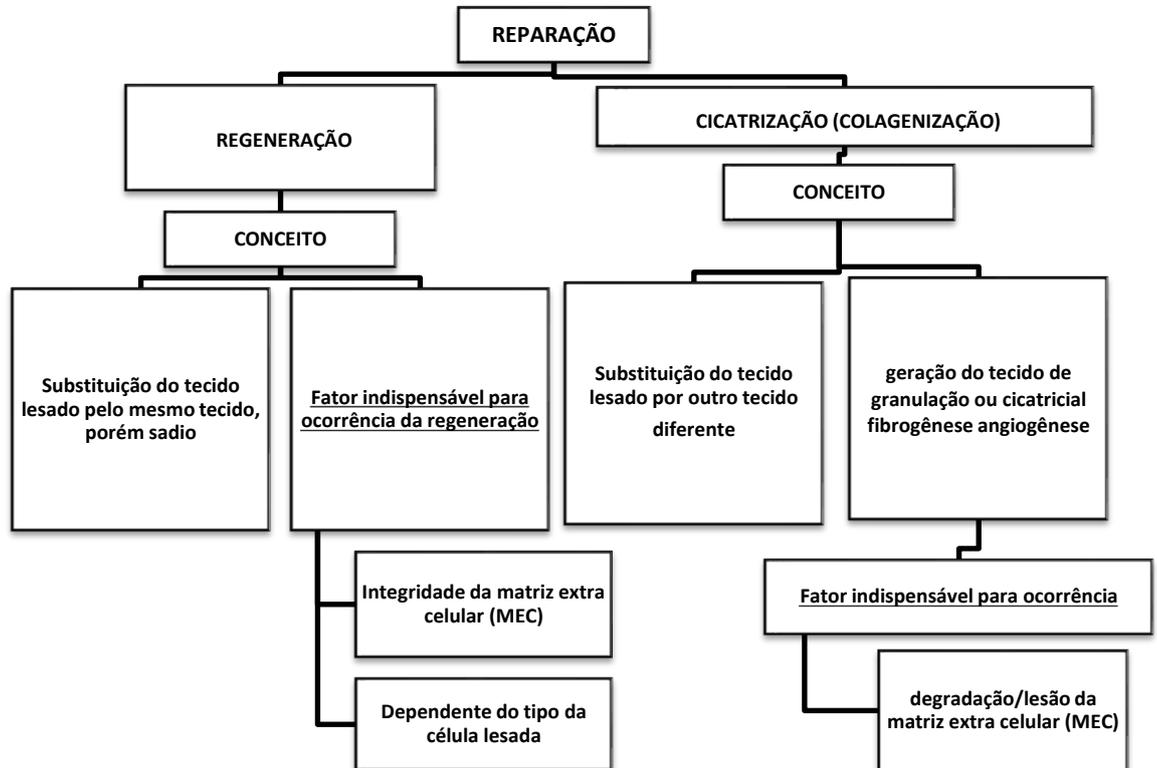
Na fase de proliferação há migração de fibroblastos ativados por fatores de crescimento produzidos especialmente por macrófagos, linfócitos e plaquetas. Esses fatores são o PDGF, o TGF $\beta$ , o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), as interleucinas 1 e 4 e o fator de necrose tumoral (TNF). Os fibroblastos ativados por esses fatores de crescimento sintetizam colágeno e elastina que são depositados para preencher perdas teciduais. Posteriormente esse colágeno é remodelado para que não seja depositado em excesso. Esse fenômeno do remodelamento/maturação ocorre através da diferenciação do fibroblasto em miofibroblasto que tem capacidade contrátil. As metaloproteinases que são um tipo de collagenase produzida por células inflamatórias, também podem agir nessa fase de remodelagem, pois degradam elementos MEC, incluindo o colágeno, atuando na remodelagem (FELIN; FELIN, 2016; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Nos processos cicatriciais das feridas, podem ocorrer disfunções em qualquer uma dessas fases, incluindo alterações referentes à produção de mediadores envolvidos, aos componentes celulares ou mesmo à síntese de colágeno, podendo gerar cicatrizes deformantes, proeminentes, deprimidas, alargadas e hiperpigmentadas. Dentre as principais afecções cicatriciais, destacam-se a cicatriz hipertrófica e o queiloide (HOCHMAN et al., 2012).

Queloides e cicatrizes hipertróficas ocorrem a partir de hiperproliferação de fibroblastos, com consequente acúmulo de matriz extracelular, especialmente pela excessiva formação de colágeno. Na cicatriz hipertrófica, o acúmulo de colágeno não excede as bordas da ferida operatória que se torna proeminente, enquanto que, no queiloide, a deposição de colágeno anormal vai além do limite da ferida operatória, gerando tumoração de tamanho superior ao da incisão (HOCHMAN et al., 2012; FELIN; FELIN, 2016).

O processo de reparo dos tecidos não envolve somente a cicatrização/colagenização onde ocorre: angiogênese, migração e proliferação de fibroblastos, síntese de elementos da MEC incluindo o colágeno e o debridamento/maturação do colágeno. O reparo envolve também a regeneração dos tecidos (Figura 1).

**Figura 1** – Mapa conceitual - Tipos de Reparação: Regeneração e Cicatrização



Fonte: Felin e Felin (2016). (com permissão – Anexo A)

Cada tecido lesado reage de uma forma diferente sob o ponto de vista regenerativo, pois depende do tipo celular lesado, ou seja, da capacidade da célula tronco remanescente (sadia) daquele determinado tecido lesado, de entrarem novamente no ciclo para exercer a mitose e poder então, regenerar, substituindo o tecido lesado pelo mesmo tecido, porém sadio. As células lábeis, como as da epiderme, tem alto poder regenerativo; porém, as células permanentes, como as do músculo cardíaco, não tem. Dependendo dessas questões, o reparo de uma ferida pode ocorrer com maior ou menor proporção de regeneração e ou colagenização/cicatrização, pois o que não consegue ser regenerado é colagenizado/cicatrizado (Figura 2). A estética da ferida operatória dependerá da proporção entre o percentual de regeneração e de colagenização/cicatrização, pois quanto maior quantidade de colágeno depositado, maior a força de contração e consequente a depressão e deformidade da cicatriz (FELIN; FELIN, 2016).

**Figura 2** – Reparo por primeira (ferida fina) e segunda intenção (cura com formação de cicatriz e contração) de acordo com a quantidade de tecido regenerado e/ou colagenizado

REPARO POR PRIMEIRA INTENSÃO	REPARO POR SEGUNDA INTENSÃO
Perdas teciduais pequenas	Grandes perdas teciduais
Pouca resposta inflamatória	Grande resposta inflamatória
Pouco tecido cicatricial	Grande quantidade de tecido cicatricial
Reparo com mais regeneração (em áreas sem lesão matriz extracelular - MEC) ⊕ do que cicatrização (em áreas com lesão matriz extracelular - MEC)	Reparo em > parte por cicatrização, geração de tecido conjuntivo
Mais regeneração do que cicatrização	Maior cicatrização do que regeneração
Em geral, não deixa cicatriz	Em geral, deixa cicatriz
Pouca Força Ferida Operatória (FO)	Grande força de contração da Ferida Operatória (Refração)

Fonte: Elaborada pelo autor

Sendo assim, o reparo dos tecidos envolve por um lado, a colagenização, que substitui o tecido lesado por um tecido cicatricial diferente; porém, por outro lado, envolve também, a regeneração que faz um reparo totalmente eficaz, substituindo tecido lesado pelo mesmo tipo de tecido, porém sadio, preservando a funcionalidade. Desta forma, caracterizamos o processo do reparo dos tecidos como um fenômeno ativo, sucessivo, bioquímico, morfológico, funcional, envolvendo fenômenos vasculares e celulares, resposta inflamatória e síntese de colágeno para colagenização. Além de perfeita atividade de células tronco sadias para executarem a regeneração.

Além disso, vários fatores sistêmicos e locais podem alterar a cicatrização das feridas, tais como: diabetes mellitus, deficiências vitamínicas (a fase de hidroxilação da síntese do colágeno é dependente de vitamina C), hipotireoidismo, doenças hereditárias (síndrome de *Ehler-Danlos*), alterações da coagulação, idade, trauma grave, queimaduras, sepse, insuficiência hepática e renal, insuficiência respiratória, tabagismo, radioterapia (diminui a deposição de colágeno, fragilizando anastomoses), desnutrição proteica (prolonga a fase inflamatória e diminui a síntese de colágeno) e o uso de corticosteroides (inibe a inflamação e

a remodelagem por inibir metaloproteinases), drogas antineoplásicas, Ciclosporina A, Colchicina e Penicilamina (BROUGHTON et al., 2016).

Por ser algo tão complexo, com tantas variáveis, como a síntese de mediadores, de vários fatores de crescimentos e componentes celulares, além de todos os fatores sistêmicos e locais que podem interferir no reparo, esse assunto merece ser estudado no sentido de que, cada vez mais, haja o desenvolvimento de produtos que modulem adequadamente os processos cicatriciais desejáveis para um reparo eficaz, sem geração de cicatriz deformante ou disfuncional.

A fitoterapia aplicada à saúde e a estética no que se refere ao reparo, vem sendo relatada há algum tempo (HAYTA et al., 2014; WHO, 2012), mas, atualmente vem despertando interesse especial, pois alguns produtos vem sendo relacionados à diversas atuações nas fases da cicatrização, e com isso, associados à aplicação médica, estética e cosmética. Com o aumento da expectativa de vida da população brasileira e conseqüentemente, envelhecimento humano, esse interesse aumentou consideravelmente.

Diversos estudos que avaliaram a cicatrização das feridas operatórias *in vivo*, testando fitoterápicos (BALDEZ et al., 2006; BEZERRA et al., 2006; GOMES et al., 2006; VALE et al., 2006), demonstraram melhora na cicatrização da parede abdominal, anastomoses colônicas e gástricas. Esses estudos se realizaram mediante avaliação histológica e também análise da força da ruptura das anastomoses cirúrgicas e foram comprovados os efeitos dos fitoterápicos testados na cicatrização das feridas. Entre esses fitoterápicos estão: a *Passiflora edulis* (maracujá); o *Orbignya phalerata* (babaçu), a *Jatropha gossypifolia* L. (pião roxo) e a *Schimus terebinthifolius raddi* (aroeira).

Considerando-se que o Brasil é um país com extrema diversidade, com destaque para a biodiversidade da Amazônia, onde há um amplo uso de produtos naturais pelas comunidades tradicionais, o que é indicativo de eficácia e segurança (BARREIRO; BOLZANI, 2009), a busca por novos produtos que favoreçam a cicatrização adequada é pertinente.

Dentre estes produtos utilizados pelos povos tradicionais tem-se o guaraná (*Paullinia cupana*) e o açaí (*Euterpe oleracea*), os quais isoladamente, alguns estudos já demonstraram potencial anti-inflamatório (KREWER et al., 2014; MACHADO et al., 2015), e pró-proliferação celular (MACHADO et al., 2015; MALDANER et al., 2019), características interessantes para um processo cicatricial adequado. Assim, a concepção de um novo produto/formulado composto a partir da mistura entre esses compostos amazônicos (açaí e guaraná) com potencial efeito pró-cicatrização é plausível, possível e extremamente interessante e justificado.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de um formulado desenvolvido com semente de guaraná e de açaí, em modelos experimentais pós-cirúrgicos: estudo da reparação *in vitro* com células de linhagem comercial e *in vivo* utilizando como modelo experimental *Eisenia Fetida*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um formulado a base de semente de guaraná e de açaí, combinados, visando uma maior concentração de moléculas bioativas com atividade antioxidante, anti-inflamatória e pró- colágeno e conseqüentemente alto poder de reparo;
- Analisar o efeito pró-cicatrizial do composto desenvolvido em *modelo in vitro* (cultura de fibroblastos e queratinócitos), através da análise de marcadores oxidativo, apoptóticos e fatores de crescimento;
- Analisar o reparo por regeneração no modelo *in vivo* (minhocas), através da expressão de genes associados à regeneração e dos padrões de regeneração (via microscopia) nos animais que sofreram incisão caudal, bem como análises histológicas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O Brasil é um dos países que mais realiza cirurgias plásticas, sendo a da mama o procedimento mais frequentemente realizado pelas mulheres saudáveis (redução, aumento ou levantamento das mamas) ou por mulheres portadoras de câncer de mama (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA ESTÉTICA, 2015). O principal elemento crítico e complicador da cirurgia estética relaciona-se à cicatrização. Quando este processo sofre alterações do padrão esperado pode gerar problemas estéticos não desejados no local da cicatriz (JOYCE et al., 2015). Apesar dos avanços da área, existe necessidade de desenvolvimento de estratégias complementares que melhorem a qualidade da regeneração tecidual e minimizem assim as complicações relacionadas aos processos cicatriciais (HO et al., 2017).

### 2.1 DINÂMICA DO PROCESSO CICATRICIAL DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo e consiste na epiderme, derme, camadas de tecido subcutâneo, bem como apêndices de pele como cabelos e glândulas. É muito vascular e altamente inervada, sendo funcionalmente responsável pela manutenção da homeostase do organismo vivo uma vez que está diretamente relacionada à regulação da temperatura, hidratação e síntese de vitamina D. Além disto, é considerada a barreira protetora contra produtos químicos e patógenos externos. Assim, o dano a qualquer parte da pele leva ao desenvolvimento de feridas que podem comprometer a saúde (HO et al., 2017).

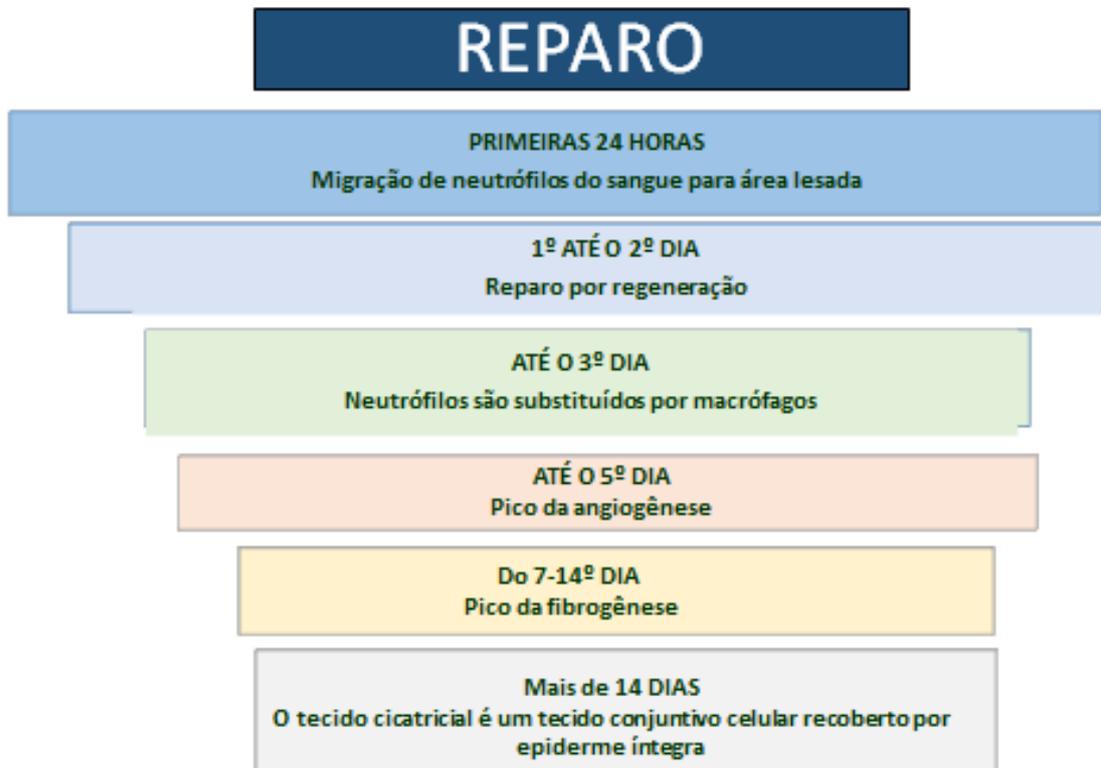
A cicatrização de feridas na pele é um processo dinâmico e complexo, coordenada por uma cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem, e determinam a reconstituição do tecido. A sequência ordenada dos eventos cicatrizais foi descrita há mais de um século por Carrel e foi, subsequentemente, dividida em cinco etapas: (1) inflamação; (2) angiogênese; (3) migração e proliferação de fibroblastos; (4) formação da cicatriz e (5) remodelamento (BROUGHTON et al., 2006; HO et al., 2017). Outros autores consideram que a cicatrização de feridas pode ser compreendida a partir de três fases definidas e integradas que são: inflamação, proliferação e remodelamento (Figuras 3 e 4) (AZULAY et al., 2013; BLANES; FERREIRA, 2014; TAZIMA et al., 2008).

**Figura 3** – Fases da Cicatrização de Feridas. Após a injúria, o primeiro evento é a ativação das plaquetas. Depois, de maneira definida e integrada, ocorrem a inflamação, proliferação celular e remodelamento do tecido. Estes eventos envolvem a ativação de diversas células de modo coordenado.

C I C A T R I Z A Ç Ã O  D E  F E R I D A S	<b>Ativação Plaquetária</b> ↓ *Coagulação	<b>Inflamação</b> ↓ *Infiltração Imune *Limpeza dos restos celulares *Morte por patógenos	<b>Proliferação</b> ↓ *Proliferação de fibroblastos *Formação de Cicatrizes *Síntese de colágeno *Angiogênese	<b>Remodelamento</b> *Epitelização *Remodelamento da matriz extracelular *Maturação/ Contração da Cicatriz *Apoptose	
	Plaquetas Fibrina	Neutrófilos Linfócitos	Proteoglicanos Fibroblastos Colágenos	Epitélio Endotélio	
	Injúria	Horas	Dias	Semanas	Meses/Anos

Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 4** – Sequência de acontecimentos dos eventos do reparo dos tecidos



Fonte: Elaborada pelo autor

### 2.1.1 Fase inflamatória da cicatrização

Em geral qualquer processo inflamatório do organismo possui duas fases complementares, onde a primeira visa limpar a área lesionada de restos celulares e outros resíduos ocasionados pelo trauma do corte, via resposta pró-inflamatória dos macrófagos M1 residentes no tecido conjuntivo, e de outras células imunes recrutadas para o local lesionado. Nesta fase, os macrófagos M1 passam a produzir uma cascata de citocinas pró inflamatórias como a interleucina (IL) 1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Esta fase está associada ao aparecimento dos sintomas clínicos a inflamação que incluem edema, dor e calor na região lesada. Este processo estimula a transformação dos macrófagos M1 em macrófagos M2, que passam a ter atividade anti-inflamatória via produção de citocinas como a IL-10. Esta segunda fase inibe a produção das citocinas pró-inflamatórias e estimula a regeneração do tecido lesado (DELAVARY et al., 2011; MINUTTI et al., 2017).

Durante a primeira etapa da lesão, os queratinócitos reagem ao dano celular. A hemostasia é alcançada por vasoconstricção endotelial ativada e pela indução de uma cascata de coagulação (BROUGHTON et al., 2006). As plaquetas têm um papel de grande relevância na cicatrização, já que além de participarem da cascata coagulatória liberam para o meio diversas moléculas sinalizadoras, como TGF- $\beta$ , fator de crescimento derivado de plaquetas (PDFF), FGF, fator de crescimento dérmico (EFF), prostaglandinas e tromboxanos. Estas moléculas se difundem e agem no local lesionado aumentando a vasodilatação, a permeabilidade vascular e promovendo a recrutamento para o local, de células do sistema imune, com destaque aos neutrófilos e macrófagos (BROUGHTON et al., 2006; HO et al., 2017).

Os neutrófilos atuam diretamente na limpeza do tecido lesado via fagocitose. No caso, a regulação da diferenciação dos monócitos em macrófagos envolve o TGF-  $\beta$ . Estes eventos são vitais para o desencadeamento da resposta inflamatória local. Os neutrófilos são os primeiros a chegarem à região lesada, através do fenômeno da diapedese, onde se inicia a inflamação. Portanto, são os tipos celulares predominantes no primeiro e segundo dias. Após cessar a migração destas células, estas permanecem localizadas difusamente no coágulo formado (BROUGHTON et al., 2006; ZIEGLER et al., 2012).

O segundo tipo de célula imune que chega ao local da lesão, são os macrófagos formados a partir da diferenciação dos monócitos circulantes no sangue. Estes começam a atuar entre o 2º e 5º dia, e ao contrário dos neutrófilos são elementos celulares críticos no processo de reparo

tecidual (Di PIETRO, 1995). Os macrófagos estão praticamente presentes durante todas as etapas do processo de reparação e, a depleção condicional durante as diferentes fases da cicatrização de feridas revelou que os macrófagos cumprem funções funcionais distintas enfatizando a grande diversidade e plasticidade destas células no processo cicatricial (MINUTTI et al., 2017).

Além dos macrófagos derivados de monócitos, dois tipos de populações de macrófagos residem na pele e também atuam na cicatrização. As células de Langerhans (células dendríticas), que estão localizadas principalmente na camada epidérmica e os macrófagos residentes na derme. Entretanto, o papel das células de Langerhans ainda não está totalmente esclarecido (MINUTTI et al., 2017).

Na lesão, as células danificadas liberam cálcio, que atua nos macrófagos residentes ativando a enzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato oxidase (NADP), que por sua vez produz níveis elevados de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O cálcio e o  $H_2O_2$  mobilizam células epiteliais e imunes para o local da ferida. Nos monócitos, o aumento de  $H_2O_2$  ativa a liberação da proteína *High-mobility group Box 1 protein* (HMGB-1). A HMGB-1 e moléculas como a adenosina trifosfato (ATP), ativam a resposta inflamatória não-microbiana associada a lesões teciduais, sendo em conjunto conhecidas como moléculas *Danger-associated molecular patterns* (DAMPs). Quando uma célula se rompe, o ATP acaba sendo liberado para o meio extracelular, sendo rapidamente reconhecido por receptores celulares purinérgicos (P2Y e P2X) presentes na membrana dos macrófagos residentes na derme. Esta ligação atrai estes macrófagos para o local da lesão e fazendo com que os mesmos liberem citocinas pró-inflamatórias armazenadas no citoplasma sob uma forma inativa. Estas incluem, por exemplo a IL-1 $\beta$  e a IL-6. Logo a seguir, ocorre a produção do TNF- $\alpha$  (HO et al., 2017; MINUTTI et al., 2017; WYNN; VANNELLA, 2016).

Estas citocinas (com destaque para IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) produzidas principalmente por macrófagos induzem a vasodilatação que age a fim de lentificar a circulação sanguínea, diminuindo sua força de arraste, e auxiliando o ingresso de contingentes de células imunes do sangue para a lesão. A produção do TNF- $\alpha$ , atua na amplificação maior da resposta inflamatória e na formação de tecido de granulação (WYNN; VANNELLA, 2016).

### 2.1.2 Angiogênese, migração e proliferação de fibroblastos

O acúmulo de células como neutrófilos e a ativação dos macrófagos no local lesado, diminui o aporte de oxigênio e nutrição no local. Esta condição acaba aumentando a hipóxia, e conseqüentemente as concentrações de ácido láctico levando a diminuição do potencial hidrogeniônico (pH) tecidual. Esta combinação atua nos macrófagos induzindo estas células a produzirem fatores de crescimento. Novamente aqui, os macrófagos possuem papel fundamental no processo (FELIN; FELIN, 2016; HO et al., 2017).

Na continuidade da cicatrização, ocorre a chamada fase proliferativa que tem uma duração máxima de 14 dias, e abrange múltiplos processos como a angiogênese, formação do tecido de granulação, deposição de colágeno e epitelização. Assim a proliferação celular junto com a angiogênese são processos que devem ocorrer sendo estimulados pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e FGF (HO et al., 2017; MINUTTI et al., 2017).

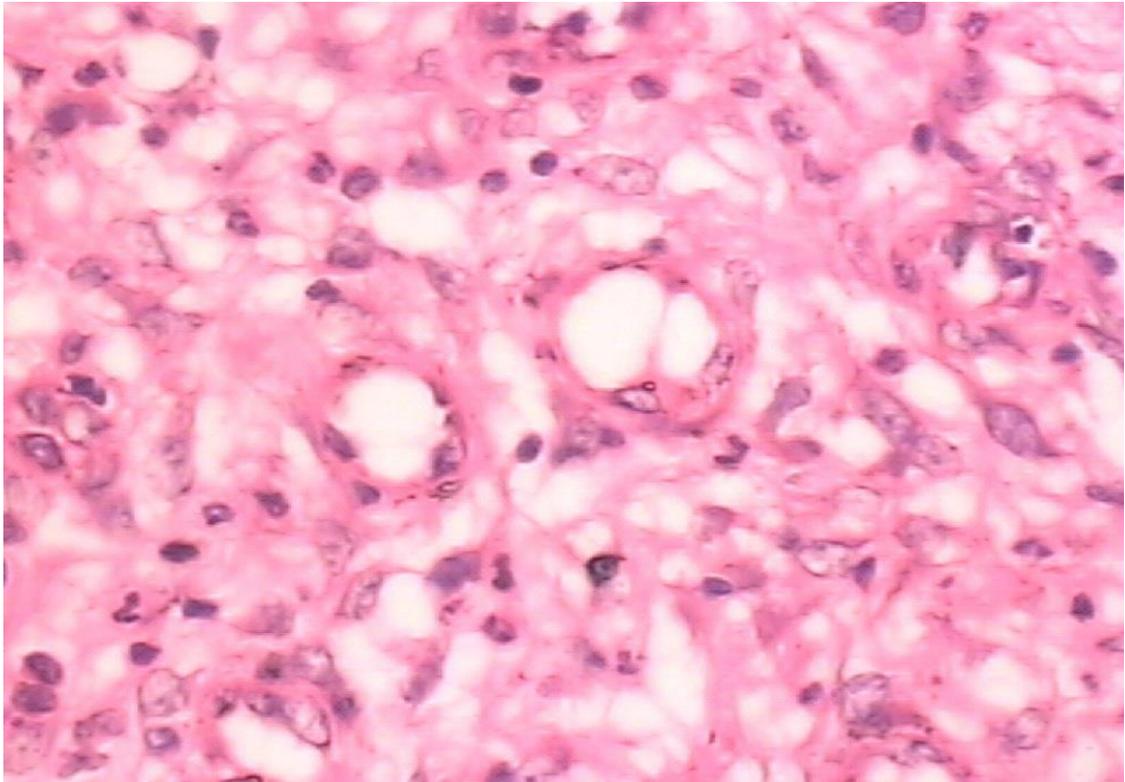
Os fibroblastos são predominantes nos estágios iniciais da cicatrização e alguns se transformam em miofibroblastos, que são responsáveis pela contração da ferida. Os fibroblastos secretam componentes da matriz extracelular, que formam as bases para o reparo da pele (TRACY et al., 2016).

O processo de re-epitelização com proliferação e migração de células epiteliais começa cedo após a lesão e continua na fase de remodelação. O aumento da atividade fibroblástica resulta na produção e depósito de colágeno tipo III, que inicialmente pode representar 30% do colágeno cicatricial da ferida. Gradualmente, o colágeno III é substituído por colágeno de tipo I e na segunda semana, a produção de tipo I passa a ser predominante. Tanto o colágeno tipo I quanto o III são produzidos durante a cicatrização de feridas, mas é a proporção de sua produção que determina a proporção de colágeno. O acúmulo líquido de colágeno atinge seu ápice na terceira semana após a ocorrência da lesão. Durante o restante do estágio de remodelação, taxas elevadas de colágeno são produzidas, sem que haja um aumento global de líquido. Este processo ocorre porque a taxa de produção e degradação de colágeno chegam a um equilíbrio (HO et al., 2017; MADDEN; PEACOCK, 1968).

Com a migração e proliferação dos fibroblastos começa a se formar o tecido de granulação (Figura 5) por volta do 4º dia (GUIDUGLI-NETO, 1987), composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que são mantidos por uma matriz extracelular frouxa formada principalmente por fibronectina, ácido hialurônico e colágenos do tipo I e II. O aspecto deste tecido é edemaciado devido a presença de enormes espaços vazios, já que os vasos sanguíneos são ainda imaturos, muito exsudativos e sangram facilmente. Esta etapa da

cicatrização é um processo essencial porque irá permitir a nutrição e a troca gasosa adequada das células ativas (EMING et al., 2014; HO et al., 2017).

**Figura 5** – Imagem ilustrativa da microscopia do tecido de granulação com vasos neoformados



Fonte: Felin e Felin (2016). (com permissão – Anexo A)

### **2.1.3 Formação da cicatriz e remodelamento tecidual**

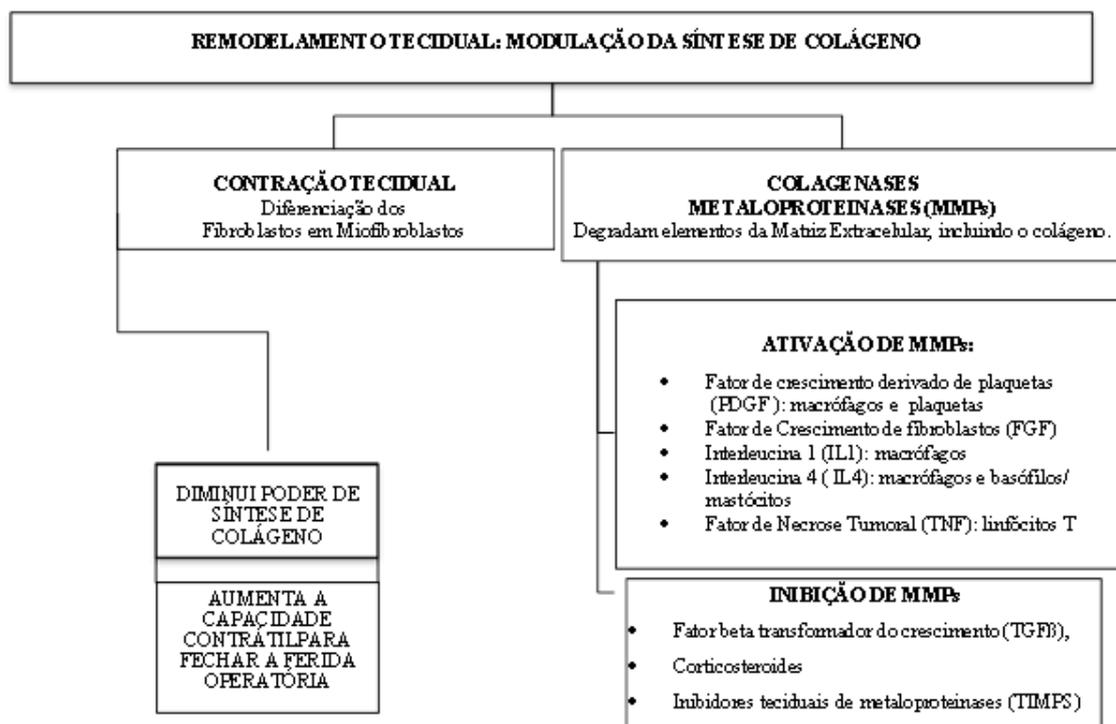
O leito de uma ferida aberta precisa ser preenchido, e este processo ocorre a partir de dois mecanismos diferentes e complementares. O primeiro envolve a natureza anatômica da ferida que irá proporcionar estímulos que levam a migração e proliferação das células para o local (fibroblastos, queratinócitos) a partir das margens teciduais não lesadas. Este fenômeno é conhecido como “efeitos de vizinhança” (MONTESANO; ORCI, 1988). O segundo envolve o movimento das margens da ferida, uma em direção a outra como se sofressem uma tração invisível (PEACOCK, 1984).

É relevante salientar que a superfície da ferida, como está oxigenada e bem umedecida acelera o processo de migração das células epiteliais para o centro da ferida. Quando as células epiteliais encontram a crosta da ferida ocorre um retardo na sua velocidade de migração sendo acionado um mecanismo conhecido como “inibição por contato”, e as células voltam a

apresentar um padrão citológico original. No final desta fase, o leito da ferida já está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação já foi reestabelecida pela angiogênese e a rede linfática começa também a se regenerar. De modo lento, o tecido de granulação é enriquecido com maior quantidade de fibras colágenas o que fornece a aparência da cicatriz da região lesada em consequência do acúmulo de massa fibrosa no local (MINUTTI et al., 2016;).

O remodelamento é a fase final HO et al., 2017 do processo de reparo por cicatrização/colagenização e se caracteriza por modulação da síntese do colágeno sintetizado pelo fibroblasto quando ativado para a colagenização. Esse processo de remodelagem pode ocorrer através de dois mecanismos distintos: contração tecidual por diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos e síntese de metaloproteinases (MMPs), capazes de degradar o colágeno depositado (FELIN; FELIN, 2016) (Figura 6).

**Figura 6** – Mapa conceitual do Remodelamento Tecidual



Fonte: Elaborada pelo autor, baseado em Felin e Felin (2016). (com permissão, Anexo A).

## 2.2 PAPEL DOS FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS NA CICATRIZAÇÃO

O reparo do tecido lesado visa restaurar as funções de proteção ao organismo desempenhadas pela pele. Para que isto ocorra, são reconhecidas diferentes fases já mencionadas e explicadas neste projeto. Dos diversos tipos de células e moléculas envolvidas no processo é preciso destacar os fibroblastos e queratinócitos.

Os fibroblastos desempenham papel fundamental na cicatrização, pois são responsáveis pela síntese de vários componentes da MEC, incluindo colágenos, fibrina, fibronectina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e proteínas matricelulares (TRACY et al., 2016).

Os queratinócitos são o principal tipo celular da epiderme. Eles sintetizam e expressam várias proteínas estruturais e lipídios durante a sua maturação, em especial a queratina, proteína responsável pela impermeabilização da pele. Inicialmente as células-tronco do estrato basal se desprendem da membrana basal, se diferenciam em queratinócitos ativos que migram para formar os estratos subsequentes (OLCZYK et al., 2014). O processo de desprendimento das células do estrato basal da membrana basal é desempenhado por enzimas conhecidas como metaloproteinases que degradam colágeno da membrana basal. A metaloproteinase do tipo 1 ou colagenase intersticial contribui na migração de queratinócitos das camadas mais profundas a mais externa da epiderme por uma rede de colágenos (OLCZYK et al. 2014).

Fibroblastos e queratinócitos são tipos celulares, essenciais a regeneração da pele, e que exercem uma forte interação um sobre o outro no processo. Os queratinócitos estimulam os fibroblastos a sintetizar fatores de crescimento, que por sua vez estimularão a proliferação de queratinócitos de maneira parácrina dupla. Ainda, os fibroblastos podem adquirir um fenótipo de miofibroblastos sob o controle de queratinócitos (WERNER et al., 2007).

Desta forma, fatores solúveis derivados de fibroblastos, incluindo IL-6, KGF, fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), difundem-se na epiderme e influenciam o crescimento e a diferenciação dos queratinócitos. Em resposta, os queratinócitos secretam IL-1, que estimula os fibroblastos a produzirem o KGF, além de aumentar a sua proliferação e a deposição de colágeno (STUNOVA; VISTEJNOVA, 2018).

### 2.3 POTENCIAL USO DE EXTRATOS AMAZÔNICOS NA CICATRIZAÇÃO

Para Guilhermino et al. (2012) o desenvolvimento de um fitomedicamento com a devida comprovação científica de segurança, eficácia e qualidade, demanda menos recursos e menos riscos do que o desenvolvimento de um medicamento sintético.

Entretanto, o Brasil vive uma situação paradoxal, apesar de possuir um grande número de plantas que são altamente promissoras para uso clínico-cirúrgico, e a produção científica a respeito das mesmas ser relativamente expressiva (CALIXTO, 2008; PALMEIRA FILHO; CAPANEMA, 2010) estudos que gerem novas tecnologias e produtos relacionados ainda são muito escassos. Em se tratando de plantas com potencial terapêutico, a Amazônia é um bioma que atrai fortemente a atenção das indústrias farmacêuticas e cosméticas nacionais e internacionais, que vem buscando nas plantas nativas ou domesticadas na região, essências, moléculas bioativas e formulações para produção de medicamentos, vacinas e cosméticos. Atualmente estima-se a industrialização e comercialização em larga escala de, aproximadamente, 5000 princípios ativos amazônicos (*International Tropical Timber Organization*) (ARAÚJO et al., 2005).

Neste contexto o guaraná e o açaí (Figura 7) são dois dos frutos mais consumidos e estudados no mundo.

**Figura 7** – Guaraná e Açaí. A - Cultivo do Guaraná-Cereçaporanga. B - Cultivo do Guaraná- Maués. C - Colheita do Guaraná. D - Fruto do açaí



Fonte: Figura organizada pelo autor. (com permissões: Figuras 7A, 7B e 7C – Anexo B; Figura 7D – Anexo C)

O guaraná (*Paullinia Cupana*) é uma espécie nativa da Amazônia, pertencente à família *Sapindaceae*. As populações tradicionais lhe atribuem propriedades medicinais, estimulantes, energéticas e afrodisíacas. Comercialmente o guaraná pode ser obtido em diversas formas, como em cápsulas gelatinosas, xaropes, bebidas energéticas, refrigerantes, entre outros (MACHADO et al., 2015).

Já existe uma boa quantidade de estudos científicos (estudos *in vitro*, em modelos experimentais e em seres humanos), relatando as propriedades biológicas do guaraná tais como: antioxidante, antiplaquetário, anti-inflamatória, energética, antitumoral, termogênica, antiobesogênica, hipolipídica, na modulação neuro-cognitiva, antibacteriana e antifúngica (SMITH; ATROCH, 2010; SCHIMPL et al., 2013), retardo na senescência celular, e pró proliferação celular (MACHADO et al., 2015).

Estas propriedades biológicas importantes estão relacionadas a composição química do fruto, rico em moléculas com potencial farmacológico importante como alcaloides, teofilina, cafeína, teobromina, bem como terpenos, flavonoides dentre outras substâncias (HOWELL et al., 2005).

O grupo de pesquisa Biogenômica, (do qual faço parte desde 2013), realizou importantes estudos sobre o efeito do guaraná em células da pele como é o caso dos fibroblastos. Inicialmente em 2013, foi realizado um estudo *in vitro* utilizando uma linhagem comercial de células tronco obtidas comercialmente, as quais eram provenientes de fibroblastos (NIH-3T3). Bittencourt e colaboradores (2013), realizaram a exposição aguda das células ao nitroprussiato sódico, um agente pró-oxidação e inflamação, e a diferentes concentrações de guaraná. O fruto demonstrou forte modulação antioxidante, mostrando efeitos benéficos frente ao agente causador de dano.

Com base no estudo supracitado, o grupo de pesquisa realizou o estudo de Machado e colaboradores (2015) o qual o guaraná modulou o metabolismo oxidativo de células tronco mesenquimais adultas senescentes, diminuindo ou até mesmo revertendo a senescência destas células quando cultivadas *in vitro*. Vale ressaltar que as células utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de tecido adiposo humano coletado de pacientes submetidos a cirurgia de lipoaspiração no Hospital da Unimed (Santa Maria, RS, Brasil).

Outro fruto bastante importante e consumido da Amazônia é o açaí (*Euterpe Oleracea*). Com uma composição química rica em fitoquímicos e polifenóis, os quais os principais encontrados na polpa do fruto são as antocianinas, proantocianidinas, lignanos e outros flavonoides. As antocianinas são potentes antioxidantes que têm como funções, já comprovadas cientificamente, melhor circulação sanguínea, proteção das espécies reativas de oxigênio,

diminuição da quelação de íons metálicos e favorecem a regeneração de alfa-tocoferol. Atuam também nas inflamações, úlceras e viroses (BARCELLOS et al., 2010).

A capacidade antioxidante do açaí, combatendo o estresse oxidativo, que é o principal fator de causa dos sinais de envelhecimento dermatológico, fazem com que o mesmo tenha se tornado um alvo de produtos cosméticos (GUIMARÃES et al., 2017).

Estudos já mostraram que a formação de cicatrizes hipertróficas ou não desejáveis, está intimamente relacionada ao estresse oxidativo, que provavelmente estimula a inflamação crônica que ocorre quando o processo de cicatrização da ferida não é eficientemente desencadeado (SHROFF; MAMALIS; JAGDEO, 2014). Diante das informações apresentadas e sabendo que o estresse oxidativo e a inflamação são fatores fortemente interligados e que se retroalimentam, o guaraná e o açaí são frutos amazônicos que tem total potencial para o desenvolvimento de um novo composto a partir da sua mistura.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 DELINEAMENTO GERAL DO ESTUDO

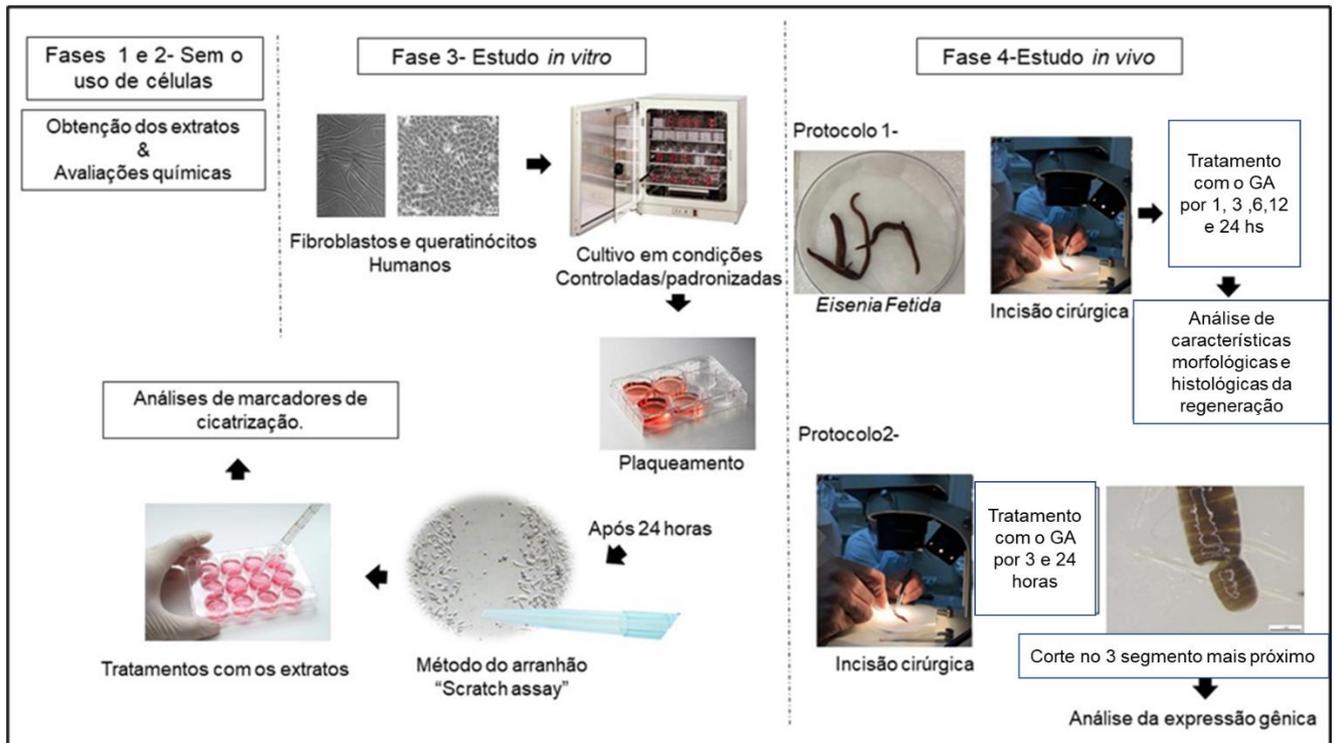
O estudo foi conduzido nas dependências do Laboratório de Biogenômica- Departamento de Morfologia - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), coordenado pela co-orientadora professora Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

O presente estudo foi constituído de quatro etapas, resumidas no formulário de coleta de dados (Anexo E):

1. Obtenção dos extratos hidroalcóolico a partir do guaraná e semente de açaí;
2. Avaliação do efeito antioxidante e genoprotetora do formulado desenvolvido, comparando sua capacidade com os extratos isolados, nesta fase os testes não envolveram cultura de células (Teste DPPH e Gemo).
3. Estudo *in vitro* de cicatrização através de cultura de fibroblastos e queratinócitos obtidos comercialmente, submetidos ao *Strach Assay*, com posterior análise dos parâmetros de proliferação celular, oxidativos, inflamatórios e de fatores de crescimento.
4. Estudo *in vivo* dos padrões da regeneração em *Eisenia fétida*, após incisão caudal, semelhante à ferida cirúrgica.

É importante ressaltar que todos os experimentos *in vitro* foram conduzidos em triplicatas independentes (três placas por vez, em três dias diferentes). Em relação ao modelo animal, cada grupo teve suas triplicatas compostas cinco animais, e os testes foram repetidos de forma independente em três dias distintos. Todos os resultados descritos como % do controle de cada ensaio. Este trabalho segue os preceitos da *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), esta organização que publica orientações para a condução de estudos *in vitro* e *in vivo* de maneira fidedigna e ética. A Figura 8 resume o delineamento geral do trabalho:

**Figura 8** – Delineamento Geral do trabalho

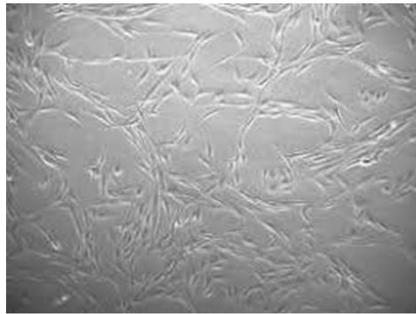


Fonte: Elaborado pelo autor (com permissão para uso de imagens do Laboratório de Biogenômica – Anexo F)

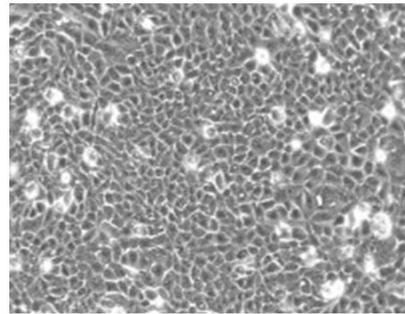
### 3.1.1 Estudo *in vitro*: fibroblastos e queratinócitos

Fibroblastos da linhagem HFF-1 (ATCC® SCRC-1041™) e queratinócitos da linhagem (HaCAT), obtidos via Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cultivados em meio *Dulbecco Modification of Minimum Essential Media* (DMEM) suplementado com 15% de soro bovino fetal, 1% de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina) e 1% de antifúngico (Anfotericina B) (Figura 9). As células permaneceram em cultivo celular, em condições estéreis, em incubadora apropriada, a 37°C, com saturação de 5% de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>), durante o tempo necessário para se adquirir a quantidade de células mínima para a realização dos experimentos. Os fibroblastos e os queratinócitos íntegros e rasgados foram expostos ao formulado composto desenvolvido à base de pó de guaraná e semente de açaí e também aos extratos isolados. Foram avaliados os efeitos: A- na migração e proliferação celular dos fibroblastos, B- nos marcadores do metabolismo oxidativo, C- nos marcadores apoptóticos, D- na expressão de genes *FGF-2* (Fibroblast Growth Factor 2), *FGF-7* (Fibroblast Growth Factor 7), *COL-1* (Collagen Type 1), *MMP-1* and *NLRP3* (NLR pyrin domain-containing protein 3).

**Figura 9** – Linhagens celulares obtidas comercialmente



HFF-1- Linhagem de Fibroblastos



Hacat- Linhagem de Queratinócitos

Fonte: Banco de Imagens, Laboratório Biogenômica, UFSM (com permissão – Anexo F)

### 3.1.2 Estudo *in vivo*: *Eisenia Fetida* - minhoca californiana

Em *Eisenia fetida* já foram identificados genes pluripotentes que são expressos em um padrão específico durante a regeneração. Deste modo, o presente estudo foi conduzido a partir da extirpação da extremidade caudal da minhoca adulta clitelada e análise do padrão regenerativo 1, 3, 6, 12, 24 horas via análise morfológica, e 24, 48 e 72 horas análise do gene SOX-4

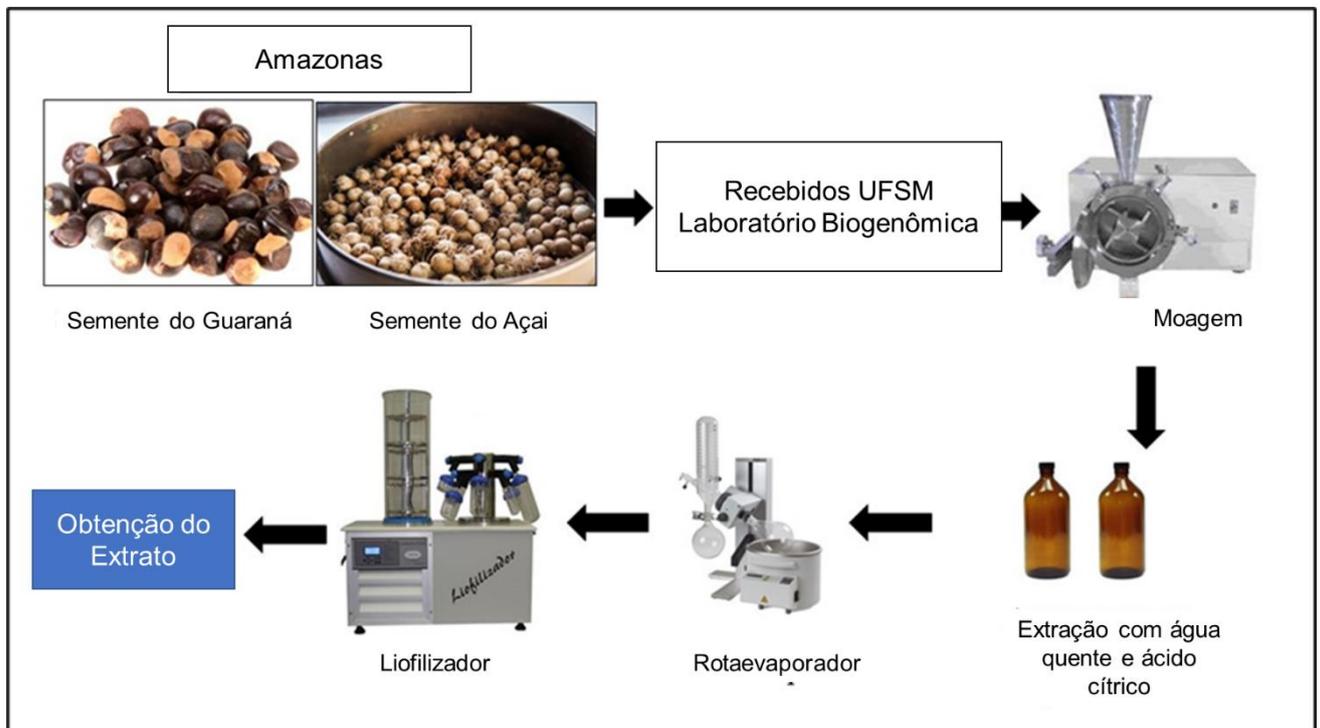
## 3.2 TÉCNICAS E FERRAMENTAS QUE SERÃO UTILIZADAS PARA QUE SE ALCANCEM OS OBJETIVOS PROPOSTOS

### 3.2.1 Obtenção e caracterização química dos extratos e do formulado

Os extratos de guaraná e semente de açaí foram obtidos, a partir de frutos obtidos na Embrapa/Manaus-AM. Os frutos foram transportados até o Laboratório Biogenômica, e os extratos foram obtidos do seguinte modo: os frutos do guaraná e o carroço do açaí permaneceram em contato com álcool 70% por 21 dias, em ambiente escuro (evitando a degradação de moléculas bioativas), em temperatura ambiente, sendo agitadas diariamente. Após, a parte líquida foi coada e então separada, na parte líquida estavam as moléculas bioativas extraídas, em seguida passaram por processo de rotaevaporação para retirada do álcool, e por fim a “pasta” que restou da rotaevaporação foi liofilizada, ou seja, todo o líquido foi retirado e, por fim, obtivemos os extratos a serem utilizados no estudo (Figura 10), maiores detalhes

metodológicos da técnica de obtenção dos extratos podem ser obtidos em Machado et al. (2015; 2017).

**Figura 10** – Processo de obtenção dos extratos de açaí e guaraná



Fonte: Banco de Imagens, Laboratório Biogenômica, UFSM (com permissão – Anexo F)

Em seguida, foi feita a identificação dos compostos químicos do extrato de açaí-guaraná por ESI-ToF-MS. O extrato de açaí-guaraná foi submetido à análise de triagem por alta resolução via espectrometria de massa de tempo de voo de ionização por eletropulverização (ESI-ToF-MS, modelo Xevo G2 Qtof, Waters Inc., Milford, EUA). O extrato foi solubilizado em H<sub>2</sub>O ultrapura anteriormente filtrado através de uma seringa com membrana de PTFE (13 mm x 0,22 µm) e subsequentemente diluído em 1,5 mL de metanol com 20 µL de ácido fórmico para o modo positivo e 20 µL de hidróxido de amônio para o modo negativo. A ionização por ESI positivo e ESI modos negativos foi monitorada.

Ainda foram realizadas as análises não celulares com os compostos isolados: DPPH e GEMO. O ensaio DPPH baseia-se na medição da capacidade antioxidante do extrato para sequestrar o radical estável DPPH (radical livre que gera a cor purpura intensa), assim, quanto maior o potencial antioxidante dos extratos em diferentes concentrações, mais clara será a cor e menor absorbância por espectrofotometria (ZHANG et al., 2007). Os resultados dos extratos serão comparados com o controle positivo que é a rutina, um antioxidante padrão. Outro teste

não-celular que foi realizado, é o Teste Gemo: que utiliza para esse fim um DNA dupla-fita (dsDNA) de timo de bezerro, ou seja um DNA padrão de concentração conhecida, obtido comercialmente e um pró-oxidante de referência no caso o peróxido de hidrogênio, um corante específico que se liga a DNA dupla fita somente, e cada um dos extratos a serem investigados. Caso o extrato testado tenha capacidade genoprotetora menos DNA será lesado pelo peróxido de hidrogênio, então haverá mais moléculas de DNA dupla fita para o corante se ligar e assim será emitida mais fluorescência. Mais detalhes metodológicos podem ser obtidos em Cadoná et al. (2014). Os testes não celulares servem para uma primeira análise de atividade antioxidante, bem como de uso com segurança, já que é analisada a capacidade de proteger ou não contra dano em DNA.

### **3.2.2 Ensaio utilizado no estudo *in vitro***

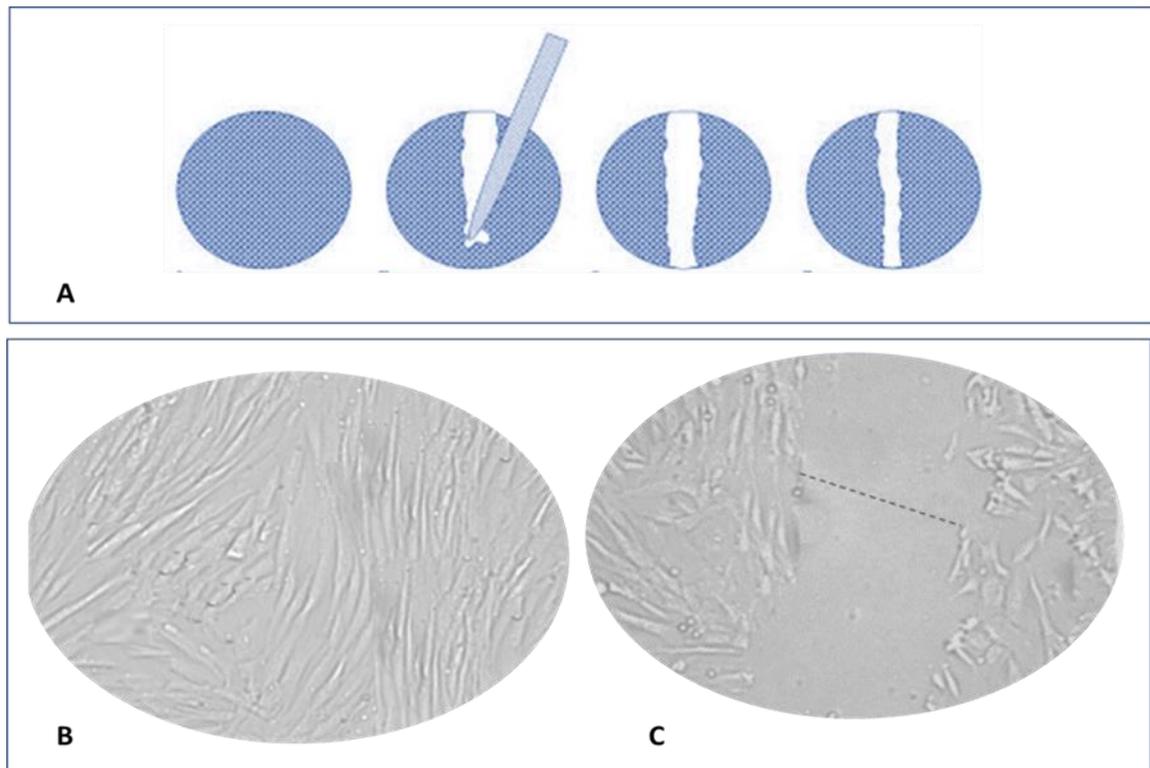
Inicialmente foi realizada uma curva farmacológica para determinação das concentrações dos extratos de açaí e guaraná a serem utilizadas no experimento, a curva foi composta de cinco pontos (ou seja, cinco concentrações diferentes de cada extrato), que fibroblastos e queratinócitos íntegros foram tratados e após 24 horas foi feita a análise de viabilidade celular pelos Testes: MTT, Vermelho neutro e ATP. Após 72 horas MTT, Vermelho neutro e ATP foram repetidos como análise da proliferação celular.

#### *3.2.2.1 Efeito no processo de cicatrização/ Scratch Assay*

O efeito no processo de cicatrização foi analisada via taxa de migração dos fibroblastos para a área rasgada e de proliferação celular em culturas de 0, 6, 24 e 72 horas, utilizando-se microscopia eletrônica, via análise pelo Software Digimazer. Aqui é importante explicar o que seria esta área rasgada o chamado *Strach Assay*, descrito por Nicolaus et al. (2017). Resumidamente, as células foram semeadas a uma densidade padrão em uma placa de cultura de 24 poços e incubadas por 24 horas, somente células e meio de cultura, com o objetivo que as células possam se aderir ao fundo da placa e formar uma monocamada. Após a incubação, o meio de cultura foi retirado e a camada celular aderente, estava no fundo da placa, sendo arranhada/ rasgada com uma ponta de pipeta amarela estéril (Figura 11). Para retirada dos detritos das células que foram lesionadas foi realizada uma adição de meio de cultura que foi imediatamente retirado, num processo de “lavagem”. Por fim, o meio de cultura foi adicionado aos poços, e o tratamento com o extrato foi realizado. Após o período de incubação. A imagem

da área arranhada foi capturada sob microscopia de campo claro (20 ×) e a migração analisada usando o software Digimizer (versão 5.3.4).

**Figura 11** – Método do arranhão (*scratch assay*) em cultura de fibroblastos. (A) Inicialmente, os fibroblastos são colocados em condições padronizadas de cultura celular até formarem uma monocamada. Logo após com o auxílio de uma pipeta com ponteira para 10 a 200  $\mu\text{L}$  é feito um arranhão (rasgo) na parte central da monocamada. Este rasgo mimetiza “in vitro” as condições de uma ferida ou corte cirúrgico, permitindo avaliar a taxa de migração celular para o local que ocorreu a ruptura mecânica e os marcadores de proliferação celular que são ativados na presença do arranhão; (B) microfotografia de uma monocamada íntegra de fibroblastos; (C) microfotografia de uma monocamada “arranhada” de fibroblastos em microscopia ótica (100  $\mu\text{m}$ ).



Fonte: Ribeiro-Filho (2019) (com permissão – Anexo G)

### 3.2.2.2 O efeito nos marcadores do metabolismo oxidativo

- ❖ **Lipoperoxidação através da técnica TBARS (JENTZSCH et al., 1996):** A lipoperoxidação (LPO) pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres (RL) sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, gerando principalmente  $L\bullet$ ,  $LO\bullet$  e  $LOO\bullet$ , levando à grave alteração da membrana celular, causando perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembrana. As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade. A geração de RL e a LPO são reações extremamente rápidas, que são, geralmente, mensuradas pelos seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre as quais o malondialdeído é o principal. A formação de malondialdeído, pela quebra de ácidos graxos poli-insaturados, é um conveniente método para se determinar o grau de peroxidação lipídica, sendo assim uma ferramenta para o monitoramento das propriedades antioxidantes de qualquer substância (PATOCKOVA et al., 2003).
  
- ❖ **Carbonilação de proteínas conforme LEVINE et al. (1994):** A carbonilação consiste na modificação das cadeias laterais de aminoácidos com a formação de grupamentos do tipo aldeídos, cetonas, amidas, carboxilas e ésteres. A reação dos grupos de proteínas com reagentes específicos para grupos carbonilados fornece um método de detecção e quantificação da oxidação proteica catalisada por metais e estresse oxidativo. Classicamente, se utiliza a 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), um reagente que reage com as proteínas carboniladas para a mensurar a carbonilação proteica (REZNICK; PACKER, 1994).
  
- ❖ **Espécies reativas do oxigênio (EROs) através de ensaio Fluorimétrico:** O ensaio fluorimétrico da 2,7 diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para detecção de EROs baseia-se na capacidade desta substância ser desacetilada por esterases citosólicas para diclorodihidrofluoresceína (DCFH), produto não fluorescente, que por sua vez, é convertido por espécies reativas para diclorofluoresceína (DCF) que, enfim, pode ser facilmente visualizada por sua forte fluorescência a 525nm quando excitada a 488nm. Este ensaio é comumente utilizado para ver o conteúdo de espécies reativas (mais

sensível para peróxido de hidrogênio) que será diretamente proporcional à intensidade da fluorescência, fornecendo uma medida indireta da taxa total de espécies reativas, bem como do potencial antioxidante do extrato ou substância que está sendo testada, através da avaliação do nível de estresse oxidativo da amostra frente ao controle do estudo (ESPOSTI et al., 2002; HALLIELL; WHITEMAN, 2004).

### 3.2.2.3 Marcadores apoptóticos

#### **Via Citometria de Fluxo teste Apoptose celular via kit Anexina V + Iodeto de Propídio**

A marcação com FITC (Isotiocianato de fluoresceína) de anexina V é normalmente usado em conjunto com um corante vital, tal como iodeto de propídio (PI) ou 7-amino-actinomicina (7-AAD) permitem ao investigador identificar células apoptóticas precoce (PI negativo, FITC anexina V positivo). As células viáveis com membranas íntegras não permitem a marcação por PI, as membranas das células mortas e danificadas são permeáveis à PI. Por exemplo, células que são consideradas viáveis são FITC anexina V e PI negativo; células que estão em apoptose precoce são FITC anexina V positiva e PI negativa; e as células que estão em apoptose tardia ou já estão mortas são ambos FITC anexina V e PI positivo. Detalhes da execução do protocolo podem ser encontrados em na bula do KIT disponível em <<http://equipal.com.br/produto/556547-anexina-v-kit-de-deteccao-de-apoptose-fitc-i/>>.

### 3.2.2.4 Análise da expressão gênica

Os genes relacionados a fatores de crescimento: FGF-2, FGF-7; formação e degradação de colágenos respectivamente: COL-1, MMP-1 e da rota inflamatória NLRP3 foram analisados via qRT-PCR após 24 48 e 72 horas de tratamento.

**Etapas preparatórias da técnica qRT-PCR: Etapa 1-** O RNAm precisa ser extraído com protocolo utilizando Trizol e álcoois. **Etapa 2-** A quantidade de RNAm extraída é quantificada em espectrofotômetro Nanodrop® que mede a concentração de RNAm. Este passo é fundamental, para que a concentração de RNA em todas as amostras seja padronizada, uma vez que todas as amostras de um mesmo experimento precisam estar na mesma concentração. **Etapa 3-** Conversão de RNAm em cDNA pela ação de uma enzima transcriptase Reversa, num processo com uso de termociclador (etapas de aquecimento e resfriamento). Depois de completa a reação de transcriptase reversa, é gerado o cDNA. O cDNA é uma cópia da mensagem, codificada pelo RNAm. No cDNA não há introns, o que facilita a determinação direta da

sequência da mensagem codificada pelo RNAm. Outra vantagem é a estabilidade da molécula de cDNA, notavelmente superior.

**Técnica qRT-PCR propriamente dita:** Nesta reação são adicionados: A-iniciadores; B- amostra de cDNA a ser quantificada; C-tampão para que a reação ocorra; D- fluoróforo, no caso o Sybergreen (SyBR Green), um corante intercalante que se liga à dupla fita de DNA e promove um aumento da fluorescência proporcional à quantidade de DNA de dupla fita presente. Assim, à medida que aumenta a quantidade de fragmentos sintetizados, ocorre um aumento do sinal fluorescente, gerando curvas de monitoramento de fluorescência que ilustram a amplificação em tempo real. A emissão de luz será proporcional à quantidade de produto gerado no tubo de reação. Esse é, por sua vez, proporcional à quantidade inicial de alvos da reação de amplificação. Deste modo, é possível através de análise dos dados em programas específicos, determinar se um gene está mais ou menos expresso.

### 3.2.3 Ensaios utilizados no estudo *in vivo*

O efeito do formulado foi avaliado em modelo *in vivo* de reparação por regeneração corporal, via incisão cirúrgica na região caudal de minhocas californianas (*Eisenia fétida*).

Para isso, após a incisão caudal, os animais foram imediatamente tratados com o formulado composto desenvolvido (com pó de guaraná mais semente de açaí) , para as minhocas controle foi aplicado apenas o tampão LBBS.

Foram realizados dois protocolos distintos para o estudo *in vivo*.

O primeiro protocolo do estudo *in vivo* avaliou características morfológicas de regeneração nas minhocas (protocolo similar ao descrito por Tao et al., 2018), após 1, 3, 6, 12 e 24 horas da incisão caudal, previamente tratadas com formulado composto desenvolvido e as minhocas controles tratadas com LBBS.

O segundo protocolo do estudo *in vivo* avaliou o efeito do produto desenvolvido na modulação da expressão do gene SOX-4, através de análise da expressão gênica (conforme BARBISAN et al. 2014 via qRT-PCR), após 24 horas do procedimento cirúrgico em minhocas, previamente tratadas com formulado composto desenvolvido, e controles.

#### 3.2.3.1 Primeiro protocolo do estudo *In Vivo*: análise dos padrões de regeneração

Protocolo similar ao descrito por Tao et al (2018), especificado a seguir:

A- Aquisição comercial de minhocas californianas para a realização dos experimentos.

- B- Aclimatização das minhocas em condições laboratoriais. Por dez dias, mantidas em 50% de terra e 50% de humus comercialmente adquirido, ao qual se foi adicionado 5% de esterco seco como fonte de nutrientes para as minhocas. O substrato foi mantido a 60% de umidade, pH entre 7.2 e 7.6, em recipiente escuro fechado, temperatura média de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo intercalado claro/escuro de 12 em 12 horas.
- C- Para a realização do experimento as minhocas foram divididas em dois grupos: C.1- LBBS (controle negativo) C.2- Com o extrato aplicado diretamente no local em que houve a amputação.
- D- Realização da incisão cirúrgica na região caudal seguindo as seguintes etapas:
- As minhocas foram retiradas da terra e permaneceram por 24 horas em processo de “limpeza intestinal”, onde por 24 horas os animais permanecem em ambiente com alta umidade para que “a limpeza intestinal” ocorra.
  - No dia do experimento as minhocas foram acondicionadas em placa de petri com gelo; e mantidas por 1 minuto e 30 segundos em freezer -  $20^\circ\text{C}$ . Essa etapa auxiliará na paralisia temporária, uma “espécie” de paralisia para que não sintam dor durante o corte.
  - A seguir, as minhocas foram retiradas do congelador mas mantidas na Placa de Petri com água congelada para finalizar o processo de crioanestesia. Este processo fará com que a minhoca não se enrole, fique imobilizada, permitindo a incisão cirúrgica caudal, realizada nos últimos cinco segmentos, com o auxílio de um bisturi;
  - Assim que uma dada minhoca foi anestesiada, a mesma disposta sobre uma Placa de Petri invertida, recoberta com parafilme e observada na lupa. Após ajustar a minhoca e garantir visibilidade, os últimos 3 a 5 segmentos foram contados e a incisão cirúrgica entre o 3º e o 5º segmento foi feita;
- E- Logo após a incisão cirúrgica caudal, foi adicionada na ferida, com auxílio de pipeta  $2 \mu\text{L}$  do formulado ou de LBBS.
- F- As minhocas foram transferidas placas de Petri com papeis filtros (90 mm x 10 mm). No fundo de cada uma das Placas de Petri será colocado um papel filtro previamente tratado com 1 mL de LBBS para os animais controles ou com LBBS+ extrato na concentração  $5\mu\text{G/mL}$ . Após todos os animais foram mantidos em incubadora.
- G- A área da incisão de cada minhoca foi fotografada utilizando-se uma lupa com sistema de foto integrado da marca Leica®.

H- Após 0, 3, 6, 12 e 24 horas, as minhocas foram novamente anestesiadas a baixas temperaturas, e em seguida colocadas em 15 mLs, de formol 4%. Cotes histológicos foram realizados e após foi realizada a análise dos padrões de regeneração: onde observou-se características morfológicas, analisadas e comparadas entre minhocas submetidas à incisão cirúrgica caudal, tratadas com o formulado composto :

- Ocorrência de regeneração;
- Coloração da área regenerada (quanto mais rápido for o processo, mais escuro e definido fica o segmento regenerado);
- Presença de segmentos indicando regeneração de órgãos e não só do tecido externo (pele);
- Presença de vascularização na área regenerada.

### 3.2.3.2 Segundo protocolo do estudo *In Vivo*: análise da expressão gênica

O segundo protocolo será realizado para avaliar o efeito do produto desenvolvido na modulação da expressão do gene SOX-4, seguindo as etapas A, B, C, D, E e F do item 3.2.3.1.

Após 24, 48 e 72 horas, as minhocas foram retiradas da incubadora onde estavam acondicionadas em Placas de petri, em seguida foram anestesiada por crioterapia por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida, na mesma região onde havia sido feita a primeira incisão cirúrgica foi realizado corte dos 3 segmentos posteriores. Os segmentos cortados (no máximo de 5 minhocas de mesmo tratamento) foram acondicionados em microtubos de 2 mLs, contendo 400 µL de trizol, em seguida procedeu-se a extração de RNA.

Este tecido será então processado em trizol para extração do RNA, e a análise da expressão gênica será realizada conforme descrito anteriormente por Barbisan e colaboradores (2014), em processo de extração idêntico ao utilizado em cultura de células, descrito detalhadamente no item 3.2.2.4.

## 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os tratamentos foram realizadas usando o software GraphPad Prism (v.8.02, 2019). Os dados foram comparados entre os tratamentos por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de *Tukey* ou *Dunnet*. Os dados nos gráficos são

apresentados como médias acrescidas de intervalos de confiança (IC) de 95%, que foram os parâmetros estatísticos mais representativos para a comparação dos tratamentos. As variáveis categóricas foram comparadas usando os testes qui-quadrado ou exato de Fisher e são apresentadas como frequências relativas (%). A área dos corpos marrons (BB; em  $\mu\text{m}$ ) foi comparada usando o pacote de software de análise de imagem Digimizer (v.5.4.1, MedCalc Software, Bélgica), que permitiu medições manuais, bem como detecção automática de objetos, para a medição do objeto características. Todos os testes foram considerados estatisticamente significativos para  $p \leq 0,05$

### 3.4 ÉTICA

Por se tratar de um estudo que utilizará linhagens celulares comerciais e minhocas californianas (*Eisenia Fetida*), ambas obtidas comercialmente, sem envolver contato direto com vertebrados, não haverá necessidade de aprovação em Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) segundo normativas do próprio Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde.

### 3.5 ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO

O acesso ao patrimônio genético serão feitos mediante autorização do projeto, que já está cadastrado no sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado (SisGen) sob número AFC0D3A (Anexo H).

#### 4 ARTIGO EM PORTUGUÊS

##### **Extratos conjugados de guaraná e açaí da Amazônia melhoram a cicatrização de fibroblastos arranhados e a amputação cirúrgica da cauda de *Eisenia fetida* por meio da modulação do metabolismo oxidativo**

Fellipe Danezi Felin<sup>1#</sup>, Ednea Aguiar Maia-Ribeiro<sup>2#</sup>, Carollina Danezi Felin, Nathália de Affonso Bonotto<sup>4</sup>, Bárbara Osmarin Turra<sup>5</sup>, Isabel Roggia<sup>4</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>2,4</sup>, Cibele Ferreira Teixeira<sup>5</sup>, Moisés Henrique Mastella<sup>5</sup>, Daniel Santos<sup>6</sup>, Érico M.M. Flores<sup>6</sup>, Fernanda Barbisan<sup>4,5,7</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>4,5\*</sup>, Tiango Aguiar Ribeiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Mestrado Profissional em Ciências da Saúde- Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS-Brasil.

<sup>2</sup> Fundação Universidade Aberta da Terceira Idade (FUNATI)- Manaus- AM-Brasil.

<sup>3</sup> Acadêmica de Medicina Universidade Franciscana- (UFN)- Santa Maria-RS-Brasil.

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Gerontologia- Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS-Brasil.

<sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia- Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS-Brasil.

<sup>6</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS-Brasil.

<sup>7</sup> Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS-Brasil.

# Fellipe Danezi Felin e Ednea Aguiar Maia-Ribeiro contribuíram igualmente para a produção deste estudo.

\*Autora Correspondente: Avenida Roraima, 1000, prédio 19, sala 3102, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS CEP: 97105-900 *E-mail*: [ivana.ufsm@gmail.com](mailto:ivana.ufsm@gmail.com) (Ivana Beatrice Mânica da Cruz).

## RESUMO:

**Introdução:** Estudos anteriores sugeriram que o guaraná (*Paullinia cupana*) e o açaí (*Euterpe oleracea*) possuem propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e proliferativas, indicando sua potencial ação terapêutica na cicatrização de feridas. Para analisar essa hipótese, produzimos um extrato conjugado de guaraná-açaí (GA) e testamos sua ação cicatrizante em um modelo de ferida *in vitro* utilizando linhagem comercial de fibroblastos HFF-1 e modelo *in vivo* de minhocas (*Eisenia fetida*) submetidas à amputação da cauda por incisão cirúrgica. **Métodos:** Um extrato aquoso obtido de sementes torradas de guaraná e frutos frescos de açaí foi caracterizado quimicamente por espectrometria de massa de alta resolução (ESI-ToF-MS). A capacidade antioxidante e genoprotetora do extrato de GA. O ensaio das feridas *in vitro* foi realizado, e analisados parâmetros de viabilidade e proliferação celular, apoptose e marcadores oxidativos, além de genes relacionados ao processo cicatricial. Na minhoca californiana, clitelada os últimos três a cinco segmentos posteriores da cauda criada em condições padronizadas foram amputados cirurgicamente com um bisturi. Em seguida, solução salina com fosfato (LBBS) tópico ou extrato de GA (2 µL) foi aplicado na ferida cirúrgica. A taxa de migração celular e regeneração de tecido no local da ferida foi avaliada histologicamente em 1, 3, 6, 12 e 24 horas após o procedimento usando coloração de Masson-Goldner. A expressão do gene SOX4 que atua na transição epitelial-mesenquimal foi determinada por RT-PCR. **Resultados:** Dezesesseis moléculas bioativas, incluindo algumas substâncias descritas anteriormente, foram identificadas. Todas as concentrações testadas exibiram efeitos não citotóxicos e antioxidantes além de genoprotetores. O extrato de GA acelerou os processos de cicatrização observados em células e por meio de análises macroscópicas e histológicas em minhocas. **Conclusão:** Os resultados indicaram que o extrato de GA tem potencial acelerados da cicatrização de feridas induzidas *in vitro* ou cirurgicamente *in vivo*.

**Palavras-chave:** frutas amazônicas; Cicatrização de feridas; Minhoca californiana; cultura de células

## 1- Introdução

Existe uma clara correlação entre o envelhecimento demográfico da população e o aumento da frequência de cirurgias plásticas, uma vez que as pessoas estão vivendo mais e estão mais preocupadas em manter uma aparência mais jovem, autonomia pessoal e saúde. Embora os procedimentos cirúrgicos estéticos sejam tipicamente eletivos e geralmente realizados em pacientes saudáveis, algumas complicações pós-cirúrgicas indesejáveis podem ocorrer, incluindo infecções, toxicidade sistêmica do anestésico local, alterações eletrolíticas e hematológicas, desvios de fluido intravascular e anormalidades na cicatrização de feridas (Montrief, Bornstein, Ramzy, Koyfman e Long, 2020). Portanto, o manejo ideal das feridas pós-operatórias é importante para prevenir complicações potenciais, como o aparecimento de

cicatrizes espessas e deformadas, queloides e o desenvolvimento de nódulos sob a pele, que é causado pela formação de tecido duro (Harris et al., 2017).

Um fator que parece amenizar a ocorrência de complicações na cicatrização cirúrgica é o estado nutricional do paciente. Evidências demonstram que a desnutrição ou a deficiência de certos nutrientes e moléculas bioativas presentes em alguns alimentos podem causar comprometimento dos complexos eventos biológicos e moleculares do processo de cicatrização de feridas. Por exemplo, a deficiência pode alterar eventos pós-cirúrgicos, como coagulação, inflamação, migração, proliferação e remodelação da pele (Barchitta et al., 2019). Além da ingestão oral, estudos atuais sugeriram que a aplicação tópica de certos extratos ou drogas com base em moléculas bioativas de frutas e outras plantas poderia ter efeitos benéficos nos processos de cicatrização de feridas (Alminderej et al., 2021; Khedir et al., 2017; Ojeh et al., 2016; Orłowski et al., 2020; Ud-Din et al., 2019).

As populações que vivem na floresta amazônica usam plantas herbais e produtos obtidos de certas frutas para aliviar vários sintomas clínicos, como inflamação, dor, febre e para a cicatrização de feridas. É o caso do pó de semente de guaraná (*Paullinia cupana*) e do açaí (*Euterpe oleracea*), que apresentam importantes propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (Algarve et al., 2019; Alves et al., 2019; Benatrehina, Pan, Naman, Li, e Kinghorn, 2018; Chang, Alasalvar e Superfruits 2019; de Almeida et al., 2020; de Souza et al., 2020; Schimpl, da Silva, Gonçalves e Mazzafera, 2013). Estudos têm demonstrado que esses frutos têm efeito na reversão dos estados disfuncionais mitocondriais e propriedades anti-envelhecimento (de Oliveira et al., 2011; Machado et al., 2015, 2016; relatou que as interações entre a terapia a laser de baixa intensidade e o extrato de guaraná apresentam efeitos antioxidantes, antiinflamatórios e antiapoptóticos e promovem a proliferação de fibroblastos.

Esses resultados anteriores sustentam a hipótese de que um extrato conjugado à base de sementes torradas de guaraná e sementes frescas de açaí (GA) poderia ter efeito sobre os processos de cicatrização decorrentes de traumas agudos, como procedimentos cirúrgicos. Para testar essa hipótese, produzimos um extrato aquoso conjugado com GA no qual foram identificadas as principais moléculas bioativas. Após testes de segurança utilizando linhagens celulares de queratinócitos e fibroblastos, foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* com fibroblastos humanos e amputação cirúrgica das caudas da minhoca vermelha da Califórnia *Eisenia fetida*. O papel da modulação do metabolismo oxidativo nos processos de cicatrização nesses modelos experimentais também foi determinado.

## **2- Materiais e Métodos**

### **2.1. Químicos e equipamentos**

Todos os produtos químicos usados neste estudo foram adquiridos das seguintes empresas: Gibco® Life Technologies Inc. (Grand Island, NY, EUA), Vitrocell-Embriolife (Campinas, São Paulo, Brasil), Qiagen (Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany), Ludwig Biotechnology (Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA) e Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA), Promega Corporation (Madison, Wisconsin, EUA). Os reagentes de biologia molecular foram os seguintes: reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, EUA), kit de síntese de cDNA iScript (Bio-Rad Laboratories [Hercules, CA, EUA]), DNase (Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA, EUA), QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen [Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany]) e Equipamentos NanoDrop™ 1000 Espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific [Grand Island, NY, EUA]), termociclador MaxyGene II, Axygen®, (Corning Incorporated, Nova York, EUA), Rotor-Gene Q 5plex HRM System (Qiagen [Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany]). As linhas celulares HFF-1 e HaCAT foram obtidas na American Type Culture Collection (ATCC, EUA). Ambas as linhagens foram obtidas por intermédio banco de células do Rio de Janeiro. Protocolos envolvendo análises espectrofotométricas e fluorimétricas foram realizados usando um leitor de microplacas de 96 poços (SpectraMax M2 / M2e Multimode Plate Reader; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Microscópio Leica DMI 4000 B (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) e FACSCanto Flow Cytometer™ II (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA). O Kit de detecção de apoptose V-FITC da Anexina (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA), a aquisição de dados e análise de conteúdo celular foram realizadas usando o software FlowJo vX.0.7 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, EUA). A análise das imagens de *Eisenia Fetida* foi realizada via Digimizer Image Analysis Software (Acacialaan, Ostend, Bélgica)

### **2.2 Materiais da Planta**

As sementes de guaraná torradas e as bagas de açaí frescas foram obtidos de produtores agrícolas da cidade de Maués, no Amazonas, e transferidos para o laboratório onde o extrato foi produzido. As bagas de açaí foram despulpadas e apenas as sementes foram utilizadas para a produção do extrato conjugado de GA. O uso da semente de açaí se justifica porque a industrialização da polpa do açaí gera uma grande quantidade de resíduos que são considerados poluentes ambientais e que ainda podem ter propriedades biológicas de interesse para a saúde humana (Santos et al., 2020). O extrato foi produzido apenas com água quente e baixo pH por

meio da adição de ácido cítrico. Os detalhes do processo de obtenção do extrato conjugado de GA são confidenciais, uma vez que o registro da patente foi solicitado ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) do Brasil (número de registro: BR 10.2020.000439-5). O extrato conjugado com GA foi rotaevaporado e então liofilizado para análise posterior de sua composição química usando espectrometria de massa de tempo de voo com ionização por eletrospray de alta resolução (ESI-ToF-MS), bem como para os ensaios *in vitro*, não celulares e *in vivo*.

### 2.3 Protocolo Experimental Geral

Os seguintes protocolos experimentais foram conduzidos: (1) indicadores de segurança do extrato conjugado com GA nas concentrações de 0, 1, 3, 5, 10 e 30  $\mu\text{g} / \text{mL}$  para avaliar o efeito sobre a viabilidade e a taxa de proliferação de duas linhagens celulares comerciais humanas: queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos (HFF-1). As capacidades antioxidante e genoprotetora dos extratos foram determinadas pelos testes 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazil (DPPH) e GEMO não celular, respectivamente. No geral, esses resultados nos permitiram escolher a concentração mínima de extrato conjugado com GA com propriedades adequadas de segurança e eficácia. Os seguintes protocolos foram realizados com a concentração do extrato conjugado de GA escolhida; (2) o extrato conjugado com GA foi avaliado *in vitro* em culturas de fibroblastos por meio de ensaios de cicatrização de feridas arranhadas analisando culturas 3, 6, 24 e 72 h após a lesão física em monocamada (Borges et al., 2017). O efeito modulador do extrato de GA nos marcadores oxidativos, apoptose, ciclo celular e expressão gênica associada à função dos fibroblastos foram analisados em culturas de células de 24 e 72 hs; (3) ensaios *in vivo* foram realizados usando *Eisenia fetida* como um modelo experimental em que de 3 a 5 segmentos posteriores terminais da cauda foram removidos cirurgicamente com um bisturi. As feridas foram lavadas com 1 mL de solução salina fisiológica imediatamente após o corte e uma vez ao dia durante 3 dias. A cauda da minhoca ferida foi então exposta a 2  $\mu\text{L}$  de solução tampão (controle) ou extrato conjugado com GA. A migração celular e os eventos de cicatrização foram avaliados histologicamente 1, 3, 6, 12 e 24 horas após o procedimento. Como o gene do fator de transcrição SOX-4 é considerado um gene importante na transição epitelial-mesenquimal (EMT) (Lourenço e Coffey, 2017), sua modulação foi comparada em tecidos lesados de minhocas com e sem exposição ao extrato conjugado de GA 3 e 24 horas após a incisão cirúrgica da cauda.

## 2.4 Cultura de células e tratamentos com células integras

As investigações *in vitro* usaram duas linhas de células comerciais, queratinócitos (HaCaT) e uma linha de células de fibroblastos (HFF-1), foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% de soro fetal bovino (FBS), suplementado com 1% de penicilina / estreptomicina e anfotericina B. As células foram mantidas a 37 ° C em 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de atmosfera umidificada e foram expandidas pela obtenção da quantidade ideal para os experimentos. Após as células foram semeadas em placas de 6 ou 96 poços conforme a necessidade do teste, ambas as linhagens foram tratadas com extrato conjugado com GA nas concentrações de 1, 3, 5, 10 e 30 µg / mL. Após determinar a concentração dos extratos conjugados com GA, uma curva de tempo foi traçada em 1, 3, 6 e 24 h para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e os níveis de ânion superóxido, óxido nítrico e lipoperoxidação.

Uma vez determinada a concentração-resposta em células integras, o próximo passo foi a realização do scratch assay.

## 2.5 Ensaio Scratch *in vitro*

Na confluência de 80%, a célula da monocamada de fibroblasto foi riscada em linha reta usando uma pipeta estéril de 200 µL, simulando assim uma ferida *in vitro*. Em seguida, usamos tampão fosfato (PBS) estéril para lavar as células e remover os resíduos celulares. Em seguida, adicionamos o meio de cultura apropriado e o tratamento com o extrato de GA conjugado. Fotografias da ferida foram tiradas em 0, 6, 24 e 72 h para investigar e analisar a ferida arranhada. A área arranhada foi medida usando o Digimizer Image Analysis Software. Fotografias digitais foram obtidas usando um microscópio Leica DMI 4000 B.

## 2.6 Ensaio de viabilidade celular

Três protocolos complementares foram usados para análise de viabilidade após 24 h de exposição aos extratos conjugados de GA: (1) MTT, (2) vermelho neutro e (3) ensaios de ATP.

### *MTT*

O ensaio de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) foram realizados de acordo com as instruções fornecidas por Azzolin et al. (2016). Resumidamente, os sobrenadantes dos tratamentos foram removidos e as células foram ressuspensas em PBS (0,01 M; pH 7,4). O MTT foi dissolvido a 5 mg / mL em PBS e 10 µL foram adicionados a uma

placa de 96 poços contendo tratamentos de amostra e foi subsequentemente incubado por 1 h a 37 ° C. O sobrenadante foi removido dos poços e as células ressuspensas em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorvância óptica foi medida a 560 nm.

#### *Vermelho Neutro*

O ensaio de absorção de vermelho neutro fornece uma estimativa quantitativa do número de células viáveis em uma cultura, com base na capacidade das células viáveis de se ligar e incorporar corante vermelho neutro em lisossomos. Resumidamente, 100 µL (50 µg / mL) de corante vermelho neutro foram adicionados a placas de cultura de células de 96 poços. As placas foram então incubadas durante 3 h a 37 ° C no escuro. As células foram então lavadas com PBS pH 7,4 e 100 µL da solução de dessorção (50% de EtOH, 49% de H<sub>2</sub>O, solução de ácido acético glacial a 1%) foram adicionados. A absorvância óptica foi medida em um comprimento de onda de 540 nm (Repeto et al., 2008).

#### *Ensaio ATP*

De acordo com o fabricante, Promega Corporation, o ensaio de viabilidade celular CellTiter-Glo® (Promega Corporation [Madison, Wisconsin, EUA]) detecta células vivas por meio da quantificação da quantidade de ATP presente nas células vivas. O reagente lisa rapidamente as células, estabiliza o ATP presente e gera um sinal luminescente proporcional à quantidade de ATP presente. O sinal é diretamente proporcional ao número de células vivas na amostra. O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante contidas na bula do kit.

## **2.7 Ensaaios antioxidantes não celulares e genoprotetores**

#### *Ensaio DPPH*

A capacidade antioxidante do extrato conjugado com GA foi avaliada usando ensaios de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) para comparar amostras com rutina, uma molécula antioxidante pura. Todos os testes foram realizados em triplicata. As capacidades antioxidantes foram descritas em termos de IC<sub>50</sub> (concentração de amostra necessária para eliminar 50% dos radicais livres DPPH).

#### *Genoprotetor - ensaio GEMO*

O DNA de fita dupla (dsDNA) de timo de bezerro, um pró-oxidante de referência, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e um corante específico para dsDNA, PicoGreen, que faz parte do kit Quant-IT™ (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, EUA), foi utilizado para verificar o potencial genoprotetor dos extratos. PicoGreen DNA. O teste assume que, se o composto investigado tiver capacidade protetora, a fragmentação do DNA será atenuada e a fluorescência de um grupo

de teste diminuirá em comparação com um grupo de controle positivo (obtido pela exposição de DNA de bezerro a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A placa de 96 poços foi preenchida com 10 µL de DNA de timo de bezerro (1 µg / mL mais 70 µL de tampão TE) contendo concentrações variáveis do extrato conjugado com GA e 70 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 µM). A mistura reacional foi então incubada durante 30 min. Após 30 min, foi adicionado o corante de DNA PicoGreen® e a fluorescência foi lida (excitação a 480 nm / emissão a 520 nm). O efeito genoprotetor foi considerado presente quando a absorbância foi inferior à do grupo controle positivo. (Cadoná et al., 2014).

### **2.8 Detecção de apoptose por citometria de fluxo**

A análise complementar via citometria de fluxo confirmou que o tratamento com o extrato conjugado de GA era seguro. A citotoxicidade foi avaliada usando o kit de detecção de apoptose de anexina V-FITC, permitindo a avaliação de células apoptóticas precoces (anexina V positiva, iodeto de propídio (IP) negativo), células necróticas (anexina V positiva, IP positiva) e células viáveis (anexina V negativo, PI negativo). O protocolo foi realizado de acordo com as instruções da BD Bioscience® (San Jose, Califórnia, EUA). Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 6 poços com densidade de  $1 \times 10^6$  células / mL, após 24 horas foi "feita" a ferida *in vitro*. As placas foram imediatamente tratadas com extrato conjugado com GA (5 µg / mL) e incubadas por 24 horas. Após a incubação, as células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes com PBS pH 7,0 e ressuspensas em tampão de ligação 1 ×. As células ressuspensas foram suavemente agitadas com vórtex e coradas com 5 µL de Anexina-V-FITC e 5 µL de PI. Após 15 min de incubação no escuro a 22-25°C, 400 µL de tampão de ligação 1 × foram adicionados a cada tubo, e a fluorescência de cada célula foi analisada por citometria de fluxo de acordo com as especificações do fabricante.

### **2.9 Ensaio de marcador oxidativo**

A modulação do estresse oxidativo foi avaliada em células de cultura da linhagem HFF-1 3, 6, 24 e 72 h após o *scratch assay* e o tratamento com extrato conjugado de GA (5 µg / mL) por meio da análise dos níveis de superóxido, ROS, nítrico óxido e lipoperoxidação.

#### *Superóxido*

Os níveis de superóxido foram quantificados por ensaio colorimétrico que produz um sal de formazan via reação com nitroblue cloreto de tetrazólio (NBT), de acordo com protocolo estabelecido por Morabito et al. (2010).

#### *ROS por diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína*

DCFH-DA é um produto químico não fluorescente que é desacetilado pelas enzimas esterases mitocondriais em DCFH, que reage com ROS para formar DCF, uma molécula fluorescente. O ensaio foi realizado conforme descrito por Halliwell e Whiteman (2004).

#### *Óxido nítrico*

Os níveis de óxido nítrico foram quantificados indiretamente por meio da análise da abundância de nitrato usando o reagente de Griess, conforme descrito por Choi, Shin, Lee e Kim (2012).

#### *Lipoperoxidação*

A peroxidação lipídica foi estimada espectrofotometricamente por meio da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme previamente descrito por Jentsch, Bachmann, Fürst e Biesalski (1996).

### **2.10 Quantificação de colágeno total sintetizado via corante ácido Sirius Red**

Após 24, 48 ou 72 hs do scratch assay em placas de 96 poços, o meio foi retirado e os poços lavados com PBS 0,1M. Em seguida, adicionados 100µL de Fluido de Bouin (ácido pícrico, formaldeído e ácido acético glacial) para fixação durante 1 hora. Novamente, as amostras foram lavadas com PBS, e então adicionado o corante Sirius Red, permanecendo incubado com as células por 1 hora. Após, foi removido o máximo do corante e foi feita a lavagem com 150µL de solução de ácido hidrolórico 0,01M por 30 segundos para remoção do corante que não se ligou ao colágeno. O próximo passo, o corante foi retirado das camadas celulares com a adição de solução de NaOH 0,1M que permaneceu incubado por 30 minutos. Alíquotas de 100µL das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa e a absorbância foi medida em um leitor a 660nm.

### **2.11 Condições de criação de minhocas e questões éticas**

Minhocas foram obtidas comercialmente e aclimatadas no Laboratório de Biogenômica 144 da Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, por 7 dias a  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  em uma incubadora de Demanda de Bio-oxigênio (BOD) (Thoth, São Paulo, Brasil) sob um ciclo claro / escuro de 12/12 h. Antes de serem utilizadas em experimentos, as minhocas foram criadas por 30 dias em pequenas caixas de plástico ( $18,5 \times 18,5 \times 6,5$  cm) protegidas da luz e contendo solo esterilizado e esterco bovino (proporção 10: 1) com umidade de 80% -85%. O solo utilizado neste tratamento foi esterilizado em estufa a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 h para matar nematóides e outros vermes, parasitas e patógenos em potencial. Aproximadamente 500 g de solo úmido foram colocados em cada recipiente. Os experimentos foram conduzidos com minhocas adultas selecionadas com base na presença de clitelo bem desenvolvido. Os experimentos foram

realizados de forma independente em triplicata. Em muitos países, incluindo o Brasil, a aprovação prévia de um Comitê de Ética Animal para estudos envolvendo minhocas não é necessária. No entanto, todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal que visam evitar desconfortos e sofrimentos desnecessários.

### **2.12 Análise histológica**

Amostras de minhocas submetidas à amputação da cauda com e sem exposição tópica ao extrato conjugado com GA foram eutanasiadas com álcool frio -70% e, em seguida, fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS 0,1 M, pH 7,4 a 4 ° C, Paraplast (Bio-Optica Spa, Milan , Itália) as células incorporadas foram cortadas em seções de 7 µm de espessura. As observações histológicas foram realizadas usando a coloração com tricrômio de Masson Goldner. As seções foram examinadas usando um microscópio de luz e epifluorescência Leica DMRB, e as imagens foram adquiridas por microscopia óptica (ampliação de 100 × e 200 ×) usando um microscópio Leica DMI 4000 B (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha).

### **2.13 Protocolo de expressão gênica**

As minhocas foram enxaguadas com água destilada e os três a cinco últimos anéis foram excisados com bisturi e imediatamente colocados em TRIzol para extração do mRNA. O RNA foi extraído em Quick-Zol (TriZol, Ludwig Biotech Co, Alvorada, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, EUA). Além disso, as amostras de RNA foram tratadas com 0,2 µL de DNase 259 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) a 37 ° C por 5 min para digerir qualquer contaminação de DNA e a 65 ° C por 10 min. A expressão do gene foi avaliada por qPCR usando um termociclador (Axygen® 261 MaxyGene II Thermal Cycler, Corning 262 Life Sciences, Tewksbury, MA, EUA).

RT-qPCR foi realizado usando 19 µL de uma mistura contendo o iTaq Universal e SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories), os primers específicos para cada gene e 1 µL de amostra de cDNA. Os parâmetros usados foram uma etapa de desnaturação inicial de 3 min a 95 ° C, seguida por 40 ciclos de 95 ° C por 10 s, 60 ° C por 30 s e uma etapa de fusão para gerar uma curva de fusão de 65 ° C a 95 ° C com um aumento de 0,5 ° C ao longo de 5 s. Os iniciadores de PCR para avaliação da expressão dos genes na linhagem de fibroblastos foram:

FGF-2 Forward: 5'-AGTGTGTGCTAACCGTTACCT-3' and Reverse: 5'-ACTGCCCAGTTCGTTTCAGTG-3';  
 FGF-7-Forward: 5'-CTGTGCGAACACAGTGGTACCTG-3' and Reverse: 5'-

CCAAGTGGCCACTGTCCTGATTTTC-3'; Col 1- Forward: 5'-TCTTGGTCAGTCCTATGCGGATA-3' and Reverse: 5'-CATCGCAGAGAACGG AT CT-3'; MMP-1- Forward 5' -AGTGACTGGGAAACCAGATGCTGA-3' and Reverse 5'-TCAGTGAGGACAAACTGAGCCACA-3'; NLRP3- Forward 5' - ACTACTCTGTGAGGGACTCTTG-3' and Reverse 5'- GGAGGTCAG AAGTGT GGA AAG-3'

Em relação as análises em *Eisenia fetida* o gene SOX4 tinha a seguinte sequência: Forward: 5'-CAGGGAGTACCCGGACTACA-3' and Reverse 5'-CCACGAGTCACTTACCAGCA-3'. O nível de expressão da  $\beta$ -actina foi utilizado como controle interno tanto para células quanto para *Eisenia Fetida*. A expressão relativa foi calculada usando o método Ct comparativo e foi expressa como expressão de -fold em comparação com o controle.

#### 2.14 Análise estatística

As comparações entre os tratamentos foram realizadas usando o software GraphPad Prism (v.8.02, 2019). Os dados foram comparados entre os tratamentos por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Tukey ou da análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida do teste post hoc de Wilcoxon-Mann-Whitney. Os dados nos gráficos são apresentados como médias acrescidas de intervalos de confiança (IC) de 95%, que foram os parâmetros estatísticos mais representativos para a comparação dos tratamentos. As variáveis categóricas foram comparadas usando os testes qui-quadrado ou exato de Fisher e são apresentadas como frequências relativas (%). A área dos corpos marrons (BB; em  $\mu\text{m}$ ) foi comparada usando o pacote de software de análise de imagem Digimizer (v.5.4.1, MedCalc Software, Bélgica), que permitiu medições manuais, bem como detecção automática de objetos, para a medição do objeto características. Todos os testes foram considerados estatisticamente significativos para  $p \leq 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1 Identificação de compostos químicos em extratos conjugados com GA

Uma visão geral de todos os compostos identificados nos extratos conjugados com GA analisados por ESI-ToF-MS é mostrada na Tabela 1 (material suplementar). Além da cafeína, que é um alcalóide, foram identificados polifenóis presentes principalmente nos extratos de guaraná, como catequina, ácido gálico, quercetina, epigallocatequina-galato (EGGC). No entanto, outros polifenóis também foram observados, como a diosmetina, que é uma flavona

derivada da luteolina, o galato de metila e a toracrisona, que pertencem à classe dos naftalenos. Uma molécula de peptídeo macrocíclico (oscilaciclâmida A) também foi detectada no extrato. Três moléculas detectadas na análise não puderam ser identificadas. A presença de ácido cítrico era esperada, pois essa molécula foi utilizada para baixar o pH no processo de extração, que deu origem ao extrato conjugado com GA.

### **3.2 Indicadores de segurança e capacidade biológica de extratos conjugados com GA**

Os efeitos citotóxicos do extrato conjugado com GA em queratinócitos e fibroblastos foram analisados por meio de três ensaios complementares. Dados de ensaios de MTT e vermelho neutro mostraram que todas as concentrações de extrato aumentaram significativamente a viabilidade celular em comparação com os controles em cultura de células de 24 horas. No entanto, o ensaio de ATP mostrou um aumento na viabilidade de fibroblastos cultivados a 10 e 30  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (Figuras 1A, B). Em culturas de 72 h, os conjugados de GA desencadearam um ligeiro aumento da proliferação celular em ensaios de MTT e vermelho neutro para fibroblastos e queratinócitos. No entanto, uma ação antagônica foi observada nessas células, quando considerado o ensaio de ATP. Enquanto os fibroblastos apresentaram níveis de ATP mais elevados do que os controles (Figura 1C), os queratinócitos exibiram concentrações de ATP mais baixas do que os controles (Figura 1D). Os extratos conjugados com GA apresentaram alta capacidade antioxidante e genoprotetora nas análises realizadas para os ensaios DPPH e GEMO (Figuras 1E, D). No geral, os resultados indicaram que o extrato conjugado com GA na concentração de 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  pode resultar em atividade biológica no processo de cicatrização de feridas.

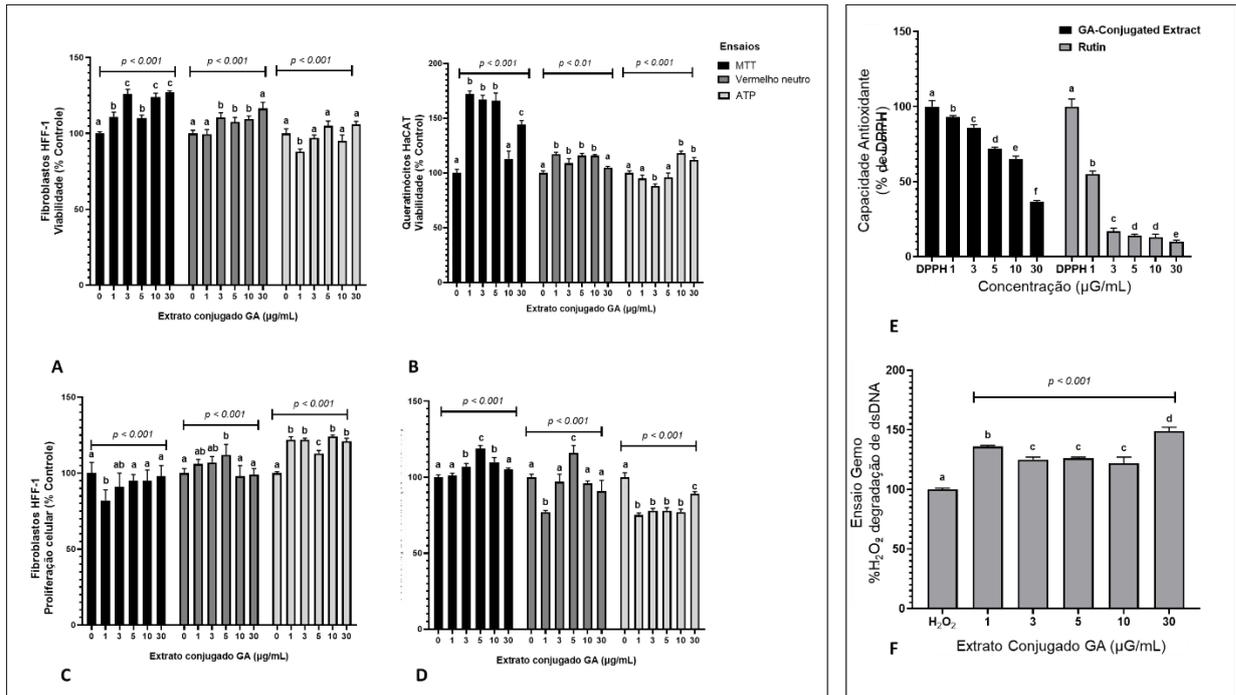


Figura 1- Os efeitos *in vitro* do extrato conjugado GA em diferentes concentrações em fibroblastos humanos HFF-1 e culturas de queratinócitos HaCAT (A, B) viabilidade celular em culturas de células de 24 h; (C, D) proliferação celular em culturas de células de 72 h. Os dados foram gerados a partir de três protocolos diferentes: ensaio de MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazólio), ensaio de vermelho neutro e ensaio de ATP. A capacidade antioxidante (E) e genoprotetora (F) do extrato conjugado GA em diferentes concentrações foram quantificadas pelos ensaios DPPH (E) e GEMO (F), respectivamente. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância One-Way seguida de teste *post hoc* de Tukey. Letras diferentes indicaram diferenças significativas em  $p < 0,05$ .

### 3.4 Ensaio de ferida *in vitro*

Os efeitos do extrato conjugado com GA em ensaios *in vitro* riscados foram empregados para avaliar a migração de fibroblastos dérmicos, que é um evento muito importante para a contração da ferida e posterior proliferação celular. A migração celular foi observada em 6, 12 e 24 h após a indução da ferida (Figura 2). As culturas de células suplementadas com 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de extrato conjugado com GA exibiram uma maior extensão de migração do que os controles (Figuras 2 A-D). Além disso, a proliferação celular observada em monocamadas confluentes após 72 h de cultura de células foi maior nas células expostas ao extrato de GA de fibroblastos do que nos controles (Figuras 2 E, F).

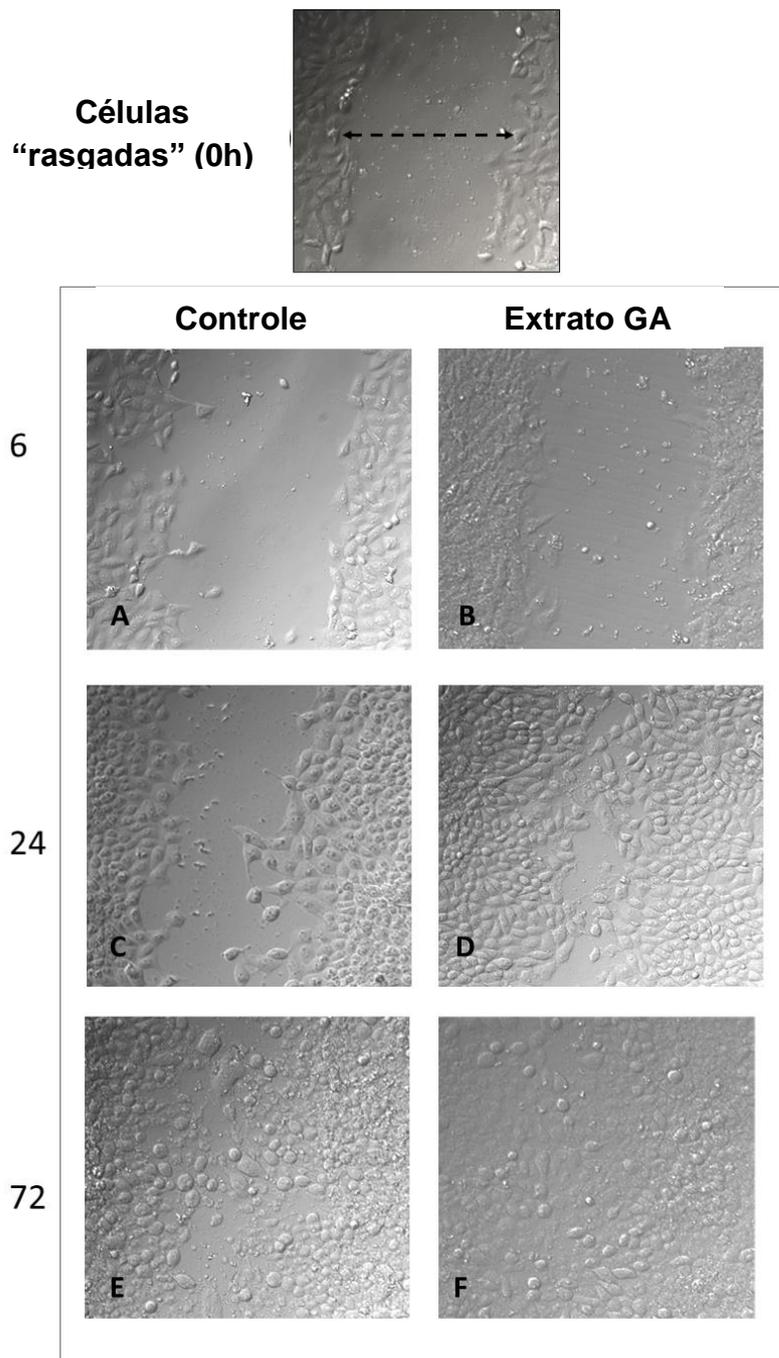


Figura 2- Avaliação do extrato conjugado GA na concentração de  $5 \mu\text{g} / \text{mL}$  em fibroblastos dérmicos humanos HFF-1 submetidos ao ensaio de “ferida” *in vitro*. A migração dos fibroblastos foi avaliada por microfotografias (aumento 200 x) 6, 24 e 72 h após as culturas de células serem rompidas com o auxílio de uma ponta de pipeta. Para determinar os números de células que migram durante o fechamento da “ferida”, o perímetro de cada “ferida” foi traçado e as células dentro da área de fechamento foram contadas usando o software *Digimizer*. Seis poços foram contados para cada condição, e três experimentos independentes foram realizados, e os dados são apresentados como média  $\pm$  DP de células que migraram dentro da “ferida” de um único experimento representativo. A migração de culturas suplementadas com extrato conjugado de GA em relação às culturas não suplementadas foi comparada pelo teste t de

*Student* e foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nos que receberam os extratos do que nos controles nos três momentos (6, 24 e 72 h) ao qual foram comparados

### 3.5 Modulação do metabolismo oxidativo em fibroblastos arranhados

O papel potencial da modulação do metabolismo oxidativo na migração e regeneração de monocamadas de fibroblastos arranhados foi analisado após 3, 6, 24 e 72 h de cultivo celular. Os níveis de superóxido e NO diminuíram significativamente em culturas de fibroblastos de 3 horas suplementadas com extrato de GA em comparação com os controles. No entanto, as concentrações dessas moléculas oxidantes foram semelhantes entre os grupos de tratamento (Figuras 3A, 3B). Em contraste, os níveis de ROS diminuíram de uma maneira dependente do tempo em fibroblastos expostos a GA em comparação com os controles (Figura 3C). Os níveis de lipoperoxidação medidos pela quantificação de TBARS também diminuíram significativamente em culturas de células de 6, 24 e 72 h quando comparadas aos controles.

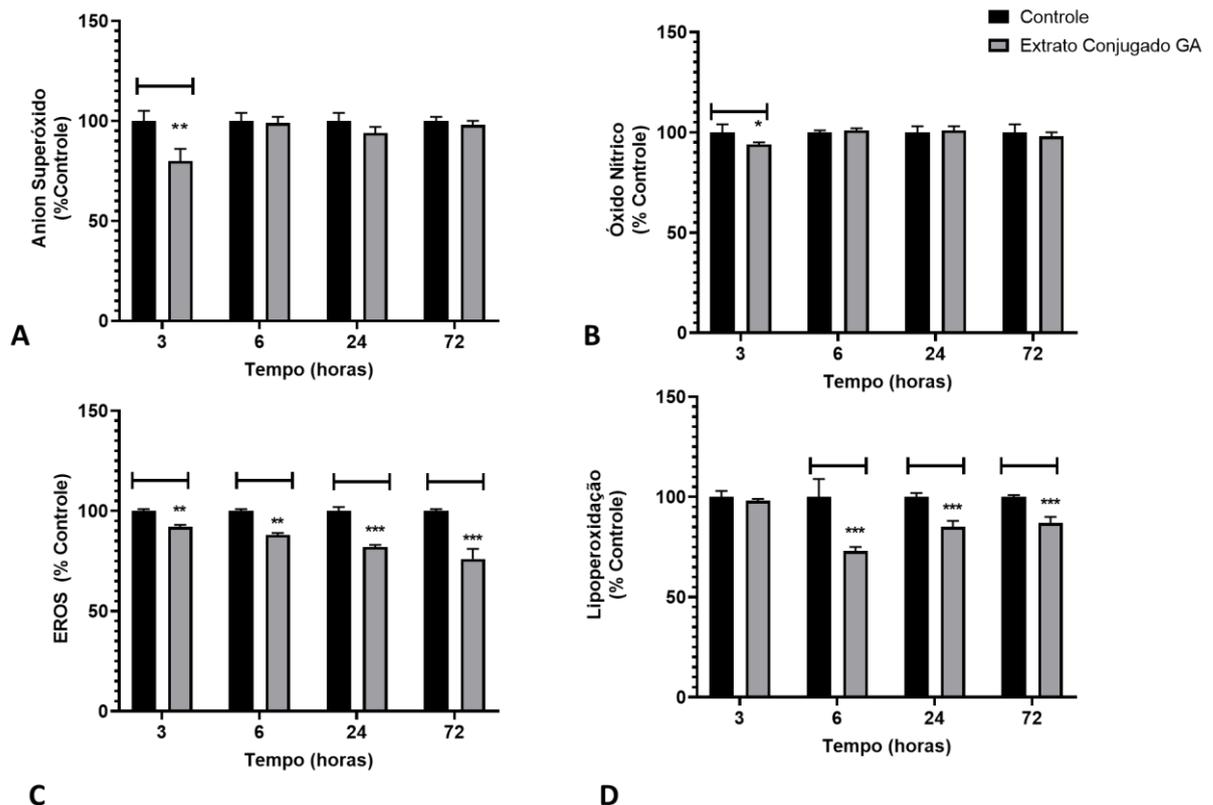


Figura 3- Os efeitos modulatórios *in vitro* em quatro marcadores do metabolismo oxidativo (superóxido, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio-ROS e lipoperoxidação) do extrato conjugado GA na concentração de 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  em culturas de 3, 6, 24 e 72 h de HFF -1 dérmico humano. Os dados são apresentados como porcentagem relativa de controle. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância *One-Way* seguida de teste *post hoc* de *Tukey*. Número de \* diferentes indicaram diferenças significativas em  $p < 0,05$ .

Para avaliar o impacto dos extratos de GA na sobrevivência e modulação da apoptose e necrose de células arranhadas, foi realizada análise de citometria de fluxo em culturas de 24 horas. Nesta análise, a frequência de células vivas foi significativamente menor nas culturas expostas ao extrato de GA do que nos controles. Situação inversa foi observada em relação à frequência de células em apoptose precoce e tardia, que foi maior no grupo controle do que nas células expostas ao extrato de GA. No entanto, a frequência de células necróticas foi semelhante entre os dois grupos (Figuras 4 A-C).

As células expostas ao extrato de GA apresentaram maior concentração de colágeno em culturas de 24 h, o que foi consistente com o padrão de fechamento riscado observado na Figura 2. No entanto, em culturas de 48 h e 72 h, os níveis de colágeno foram semelhantes entre as células expostas ou não expostas ao extrato de GA (Figura 4D). Considerando o padrão mais rápido de confluência celular em culturas expostas ao extrato de GA, também foi realizada a análise de seus efeitos na modulação de genes relacionados aos processos de cicatrização e função do fibroblasto dérmico. Os níveis transcricionais de FGF2 foram semelhantes entre os dois grupos. No entanto, os genes FGF7 e COL1 foram superexpressos em culturas expostas ao extrato de GA em comparação com os controles. Por outro lado, a regulação negativa foi observada para os genes MMP1 e NLRP3 no grupo exposto ao extrato de GA em comparação com os controles (Figura 4E).

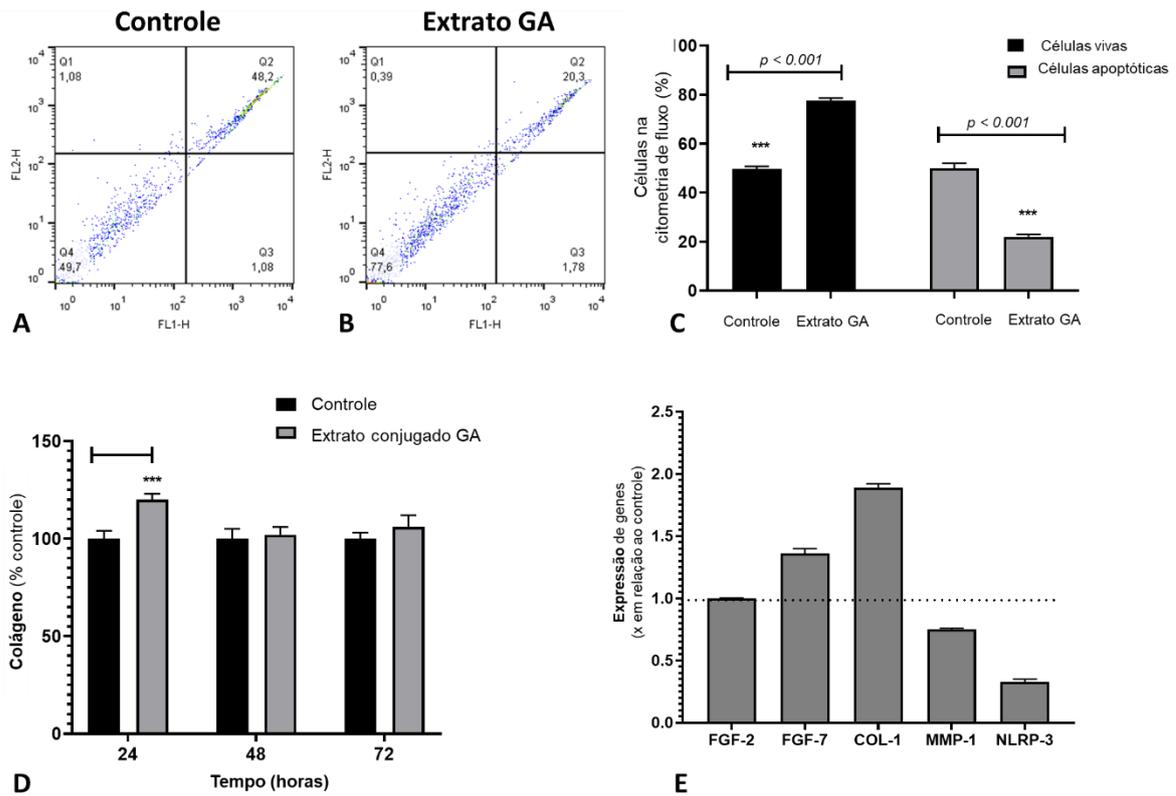


Figura 4- Os efeitos modulatórios *in vitro* do extrato conjugado GA na concentração de 5  $\mu\text{g}$  / mL em células da derme humana, HFF-1, por avaliação da taxa de apoptose, quantificação de colágeno e expressão de genes relacionados a processos de cicatrização de feridas. (A, B) citometria de fluxo representativa de culturas de células na análise de apoptose com e sem suplementação de extrato; (C) Comparação da frequência de células mortas e vivas entre o extrato de culturas suplementado e o controle pelo teste T de Student. Os dados são apresentados como porcentagem relativa de controle; (D) Concentração de colágeno em culturas de células de fibroblastos de 24, 48 e 72h comparada por análise de variância *One-way* seguida por teste *post hoc* de *Tukey*. Os dados são apresentados como porcentagem relativa de controle. Número de \* diferentes indicam diferenças significativas  $p < 0,05$  (E) Expressão gênica: os valores foram normalizados pelo gene Beta-actina 1 e representam seu valor expresso em relação ao controle com valor de referência 1 (linha tracejada no gráfico)

O segundo grupo de experimentos envolveu análises *in vivo* usando *Eisenia fetida* como modelo experimental em que os últimos três a cinco segmentos da cauda foram removidos cirurgicamente e tratados topicamente com extrato de GA. Analisamos concomitantemente os resultados das observações macroscópicas e microscópicas, conforme resumido nas Figuras 5 e 6.

Em comparações entre os processos de regeneração em controles e minhocas tratadas topicamente com extrato de GA, os seguintes eventos foram considerados. Macroscopicamente, logo após a amputação da cauda, foi possível visualizar os intestinos, que apresentavam coloração acastanhada (Figuras 5A, 5B). Em seguida, ocorreu grande produção de muco no

local da ferida (Figura 5E), seguida de retração da ferida e proliferação celular inicialmente no sentido longitudinal, formando uma estrutura mais alongada e recoberta por tecido esbranquiçado (Figura 5F). Em seguida, esse tecido escureceu e os três segmentos de corte puderam ser visualizados novamente (Figura 5M).

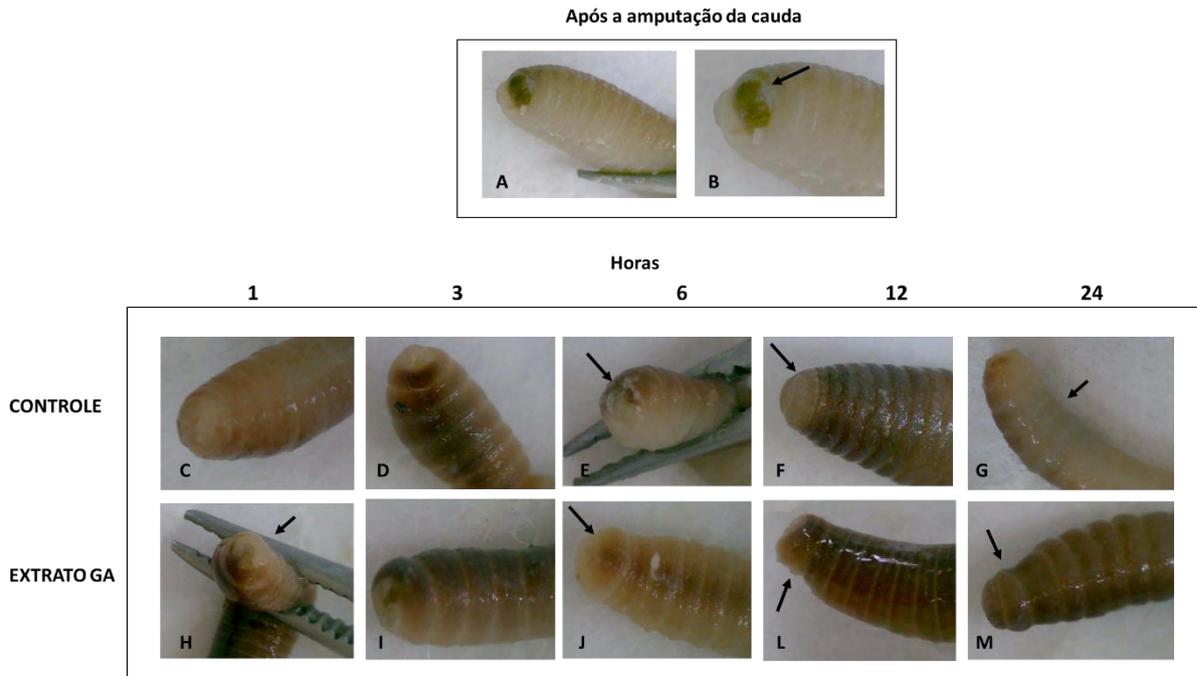


Figura 5- Fotografias representativas da incisão cirúrgica nos segmentos anteriores de *Eisenia fetida* tratadas topicamente com extrato conjugado GA na concentração de  $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ . Logo após a incisão, a ferida recebeu dose única tópica de  $2 \mu\text{l}$  de tampão fosfato (controle) ou solução de extrato. As minhocas foram então mantidas em placas de Petri e o processo de regeneração foi avaliado em diferentes períodos de tempo. (A, B) Logo após a incisão é possível observar o tubo intestinal da minhoca (na cor marrom-amarelada indicada pela seta); (C, H) Uma hora após o corte, toda a região estava coberta por muco e parece estar mais contraída nas minhocas que receberam o tratamento com o extrato do que nos controles; (D, I) Três horas após o corte a contração da ferida já está bem estabelecida e é possível ver novo tecido transparente começando a se formar, a ferida ainda está aberta. Seis horas após o corte, a ferida ainda apresenta partes abertas nas minhocas controle (E, seta) e está completamente fechada com novo tecido na minhoca tratada topicamente com o extrato (J, seta); 12 horas após a incisão, a ferida das minhocas controle está completamente regenerada com novo tecido esbranquiçado (F, seta). Nas minhocas tratadas com o extrato, a área regenerada já está se pigmentando e se diferenciando nos segmentos que foram cortados (L, seta). 24 horas após a incisão, toda a área foi regenerada. Porém, a pigmentação da região ventral, que é mais lenta que a dorsal, ainda não ocorreu nas minhocas controle (G, seta), enquanto nas tratadas topicamente com o extrato a pigmentação está praticamente completa tanto na região dorsal quanto em a região ventral do corpo do animal (M, seta).

Em termos histofisiológicos, é importante destacar que na região terminal posterior, a estrutura dos tecidos da parede do corpo da minhoca é muito semelhante à de outros locais. O

tecido da parede corporal é superficialmente composto por uma camada epitelial pseudoestratificada intercalada por células mucosas, que secretam uma camada de quitina contendo colágeno e uma lâmina basal que é mantida unida à camada muscular circular adjacente. Abaixo da camada muscular circular está uma camada espessa de células musculares longitudinais com um padrão cito-histológico semelhante ao do músculo liso de vertebrado (Figura 6A). Embora as minhocas tenham circulação completa, elas não têm glóbulos vermelhos e a hemoglobina é dissolvida diretamente na hemolinfa.

Imediatamente após o corte, a parte terminal do intestino foi exposta, seguida de rápida contração do tecido e produção de muco (Figuras 5B, 6C). Este processo foi visualizado 1 h após a amputação da cauda e foi mais rápido em minhocas tratadas com extrato de GA do que nos controles (Figuras 5C, 5H, Figura 6F, 6L). A minhoca não tem tecido conjuntivo bem estabelecido, mas as células musculares circulares secretam uma rede de colágeno que sustenta esse tecido (Figura 6A). Quando ocorre uma lesão, os hemoleucócitos presentes no celoma fluido e nas células musculares circulares migram rapidamente para o local da lesão. Portanto, essas últimas células operam como células semelhantes a fibroblastos, migrando para a incisão local (Figuras 6C, 6D). Nesse ponto, começa a reepitelização e a produção da rede de colágeno na camada muscular circular. Concomitantemente, a camada muscular longitudinal também proliferou (Figura 6E). O estágio final de regeneração foi observado quando os três segmentos estavam escurecidos nas regiões dorsal e ventral e puderam ser identificados visualmente. Como o corte da cauda envolve apenas três segmentos, grande parte desse processo regenerativo ocorre nas primeiras 24 horas após a incisão.

A comparação desse processo nos dois grupos de minhocas mostrou uma aceleração das diferenças relevantes entre os dois tratamentos. Nas minhocas controle, o processo de migração e fechamento da ferida com essas células ocorreu até 6 h após o corte (Figuras 6G, 6H). Porém, nas minhocas tratadas topicamente com extrato de GA, 3h após o corte, a ferida estava quase totalmente fechada, e às 6h já foi possível observar a formação de múltiplas camadas no local da incisão (Figuras 6M, 6N). Esse processo também pode ser observado visualmente, conforme mostrado nas Figuras 5E e 5J.

Vinte e quatro horas após a incisão da cauda em minhocas tratadas com extrato de GA, foi observada segmentação completa e escurecida nas regiões ventral e dorsal, enquanto nas minhocas controle, esse processo foi mais avançado apenas na região dorsal (Figuras 5G, 5M). A análise histológica também confirmou que a regeneração dos três segmentos estava em processo de conclusão em minhocas tratadas com extrato de GA (Figura 6J, 6P). Esses

resultados indicaram que, em média, a taxa de regeneração foi 6-12 h mais rápida em minhocas tratadas com extrato de GA do que em animais controle.

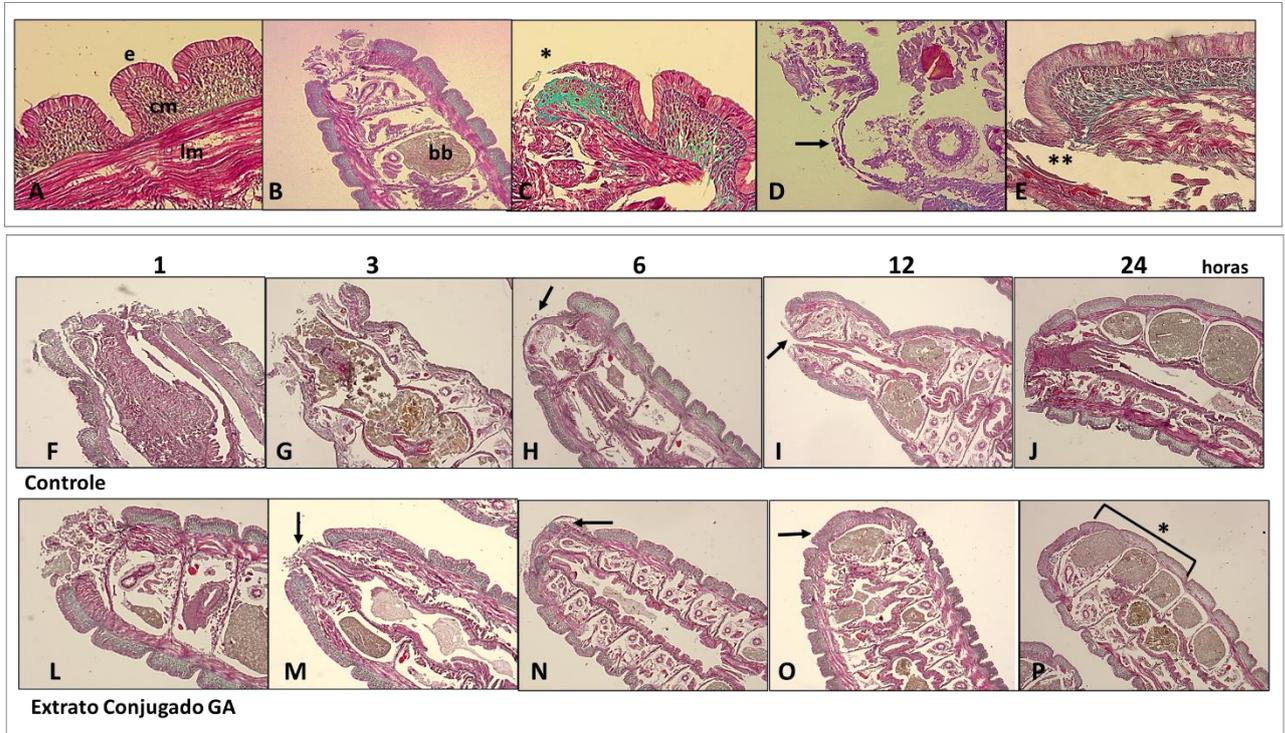


Figura 6- Análise histológica representativa de minhocas *Eisenia fetida* submetidas a incisão cirúrgica posterior dos três a cinco últimos segmentos com e sem tratamento tópico usando extrato conjugado GA na concentração de 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . As lâminas foram coradas com o kit *Masson-Goldner Trichrome* que é utilizado para visualização de músculos, fibras de colágeno, tecidos conjuntivos e queratina. (A) Histologia da parede corporal mostrando a (e) camada epidérmica que está conectada diretamente com a camada muscular circular (cm) imersa em uma matriz extracelular mais rica em colágeno. Em seguida, surge a camada muscular longitudinal (lm) que é recoberta pelo peritônio que delimita a cavidade celômica da minhoca; (B) segmentos posteriores (metâmeros) mostrando a região da incisão cirúrgica. Nesse local existem espaços repletos de corpos marrons (bb), que são estruturas que contêm células do sistema imunológico (celomócitos) que aprisionaram e destruíram patógenos ou se ligaram a impurezas e sofreram melanização. Quando essas cavidades estão completamente preenchidas, a minhoca realiza autotomia para liberá-las e então regenera a região posterior; Detalhe (C, D) do local da incisão mostrando a migração (\*) de células musculares circulares migrando para fechar inicialmente a ferida. Essas células se comportam de maneira semelhante aos fibroblastos humanos quando ocorre dano à pele; (E) somente após a migração e início da proliferação da camada de músculo liso ocorre a proliferação da epiderme; (F-J) sequência de processos de cura em minhocas de controle em 1,3, 6, 12 e 24 horas. Após esse período, a região encontra-se em fase final de regeneração dos segmentos incisos. (L-P) sequência de processos de cura em minhocas tratadas topicamente com extrato conjugado GA mostrando aceleração nos processos regenerativos em relação ao controle. Após 24 horas, os segmentos estão totalmente regenerados (P, \*).

#### 4. Discussão

Com base em evidências anteriores, foram testados os efeitos de um extrato conjugado com GA preparado a partir de sementes torradas de guaraná e sementes frescas de açaí em modelos de cicatrização de feridas. Os resultados mostraram que o extrato de GA não apresentou efeitos citotóxicos ou extensos proliferativos em queratinócitos e fibroblastos humanos em cultura, apresentando potencial antioxidante e genoprotetoras propriedades relevantes na cicatrização ou em substâncias regenerativas do tegumento. Tanto em fibroblastos quanto em minhocas, o extrato de GA aumentou a velocidade de cicatrização, sem alterações cito-histológicas observadas durante o processo. A análise dos possíveis mecanismos causais associados aos efeitos do extrato de GA nos fibroblastos humanos revelou atividades antioxidantes e genomodulatórias relacionadas ao processo de cicatrização.

Esses resultados serão discutidos em mais detalhes abaixo, começando com a matriz química do extrato conjugado de GA identificado por ESI-ToF-MS. O extrato conjugado com GA foi produzido pela mistura de sementes torradas de guaraná em pó com sementes frescas de açaí despulpadas. A presença de cafeína é esperada nos extratos de guaraná, visto que essa planta possui altas concentrações desse alcalóide (Schilimpl et al., 2013). A identificação de polifenóis como ácido gálico, catequina, EGCG e quercetina também pode ser antecipada, pois muitos estudos têm descrito a presença dessas moléculas em extratos de guaraná, bem como no açaí (Bittencourt et al., 2013; Machado et al., 2016; Roggia et al., 2020). Em um estudo conduzido por Xie et al. (2012), os autores descreveram a presença de quatro flavonas, luteolina e velutina, no açaí.

A diosmetina, cujo precursor foi detectado na matriz química do extrato conjugado com GA, também é uma flavona quimicamente próxima à luteolina. Portanto, é possível que essa molécula seja derivada da extração de sementes *in natura* de açaí. Todas essas moléculas conhecidas possuem atividades antioxidantes e antiinflamatórias, conforme descrito na literatura (Bai et al., 2021; Bernatoniene e Kopustinskiene, 2018; De Araujo, de Paulo Farias, Neri-Numa e Pastore, 2021; Herman e Herman, 2013; Zahrani, El-Shishtawy e Asiri, 2020). Algumas dessas moléculas parecem ter propriedades curativas, incluindo EGCG (Lin et al., 2016) e ácido gálico (Khan et al., 2018). Além disso, ácido gálico, EGCG e cafeína parecem agir contra complicações relacionadas aos processos de cura, como a formação de quelóide (Alishahedan et al., 2021; Syed, Bagabir, Paus e Bayat, 2013; Wang, Liu, Ruan, Yang e Gao, 2018).

Três outros polifenóis menos investigados também foram detectados no extrato: a flavona diomestina, encontrada em leguminosas como *Acacia farnesiana*, e nas folhas de *Olea europaea* (Spanakis, Kamas e Niopas, 2009), Toracrisona, uma molécula pertencente à grupo de naftaquinonas, moléculas amplamente distribuídas em plantas e citosídeo F. Estudos anteriores descreveram as propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e antimicrobianas desses polifenóis (Aminin e Polonik, 2020; Chan et al., 2013; Chandler et al., 2010; Liao et al., 2014; Tasneem, Liu, Li, Choudhary e Wang, 2019). Além desses polifenóis, foi identificado um peptídeo macrocíclico, a oscilaciclamida A, para o qual praticamente não existem estudos sobre suas propriedades biológicas. Mesmo assim, conforme destacado por Alexandru-Crivac et al. (2017), esses peptídeos mostram uma grande promessa como terapêutica porque têm maior afinidade e seletividade de ligação ao alvo, são mais estáveis contra enzimas proteolíticas e muitas vezes têm maior permeabilidade de membrana do que suas contrapartes lineares. Portanto, essas informações indicam que a matriz química do extrato conjugado de GA contém elementos bioativos que contribuem para suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias e para a modulação da expressão de genes relevantes nos processos de cicatrização.

Extratos de plantas frequentemente têm propriedades terapêuticas relevantes, mas seu uso é restrito devido à toxicidade associada a eles. Por esse motivo, avaliamos inicialmente os potenciais efeitos citotóxicos e proliferativos celulares do extrato conjugado com GA usando queratinócitos e fibroblastos que estão em contato direto quando aplicados topicamente. Embora haja algum nível de variação entre os resultados obtidos nos três diferentes ensaios empregados aqui (MTT, vermelho neutro e ATP), o conjunto de resultados não revelou quaisquer efeitos tóxicos relevantes. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que não indicaram toxicidade associada à suplementação de culturas de células com extratos de guaraná ou açai (Bittencourt et al., 2013; Maldaner et al., 2020).

Dois testes foram realizados para determinar a capacidade biológica dos extratos. A primeira avaliação do poder de eliminação do radical DPHH pelo extrato conjugado com GA mostrou que ele possui uma capacidade antioxidante relevante. O segundo ensaio avaliou até que ponto o extrato foi capaz de diminuir a taxa de degradação das moléculas de dsDNA expostas a alta concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Assim, os resultados sugeriram que o extrato conjugado com GA exerceu uma capacidade genoprotetora. presença do extrato de GA diminuiu as taxas de quebra do DNA, indicando sua atividade genoprotetora. Esses resultados permitiram a escolha da concentração do extrato de GA em 5 µg / mL, que foi posteriormente utilizado em testes complementares *in vitro* com fibroblastos e *in vivo* com minhocas.

Os resultados mostraram que, tanto em fibroblastos quanto em minhocas, o extrato de GA induziu maior velocidade no processo de cicatrização de feridas. As análises macroscópicas e histológicas das incisões cirúrgicas da cauda das minhocas revelaram processos de cicatrização acelerados, corroborando os resultados observados em fibroblastos humanos. Destacamos aqui que o uso de minhocas como modelo experimental para estudos de regeneração vem ganhando popularidade por uma série de razões. Primeiro, as minhocas têm sido usadas há muito tempo em estudos de ecotoxicidade para avaliar a qualidade do solo em relação aos poluentes ambientais. Este organismo mais primitivo também possui grande capacidade regenerativa, embora possua alguns elementos citofuncionais que apresentam certas semelhanças com o sistema imunológico humano (Alves et al., 2019). Além disso, a criação de minhocas envolve baixo custo de manutenção e incorre em menores problemas éticos do que o uso de vertebrados em experimentos envolvendo incisão cirúrgica. Embora os dados usando minhocas forneçam evidências do papel do extrato de GA na cicatrização de feridas em *Eisenia fetida*, as análises de potenciais mecanismos causais foram realizadas apenas em fibroblastos. Isso porque *Eisenia fetida* ainda é um modelo relativamente novo em estudos de regeneração envolvendo variáveis ambientais, como extratos vegetais. Consequentemente, será necessário estabelecer futuras análises de marcadores bioquímicos e moleculares relacionados ao papel da inflamação na cicatrização e em outras vias metabólicas.

Portanto, o efeito potencial dos extratos de GA no metabolismo oxidativo foi investigado em fibroblastos. Os resultados mostraram um efeito antioxidante generalizado quando os níveis de ROS totais foram avaliados. Esses valores permaneceram mais baixos do que nas células de controle em todos os momentos analisados. A taxa de lipoperoxidação também foi menor em culturas de fibroblastos de 6 h submetidas ao ensaio “ferida” *in vitro*. Dois outros marcadores oxidativos que estão diretamente associados às respostas inflamatórias (superóxido e NO) também foram analisados. Os resultados mostraram uma diminuição nos níveis dessas duas moléculas oxidativas em culturas de 3 hs. Posteriormente, os níveis de superóxido e NO permaneceram semelhantes aos das células de controle. Além disso, as culturas riscadas suplementadas com extrato de GA exibiram taxas de apoptose mais baixas do que os controles.

Investigações anteriores, como o estudo realizado por Dai, Chen e Chai (2019), mostraram que, na presença de moléculas pró-senescência, como produtos finais de glicação avançada (AGEs), os fibroblastos dérmicos são induzidos a sofrer apoptose, apresentando um aumento em ROS e superexpressão do gene NRLP3, que está diretamente associado à formação de inflamassoma. Embora este estudo não tenha exposto fibroblastos dérmicos a moléculas

como AGEs, a suplementação de culturas com extrato de GA mostrou o efeito oposto. Ou seja, culturas de 24 horas expostas ao extrato de GA apresentaram níveis mais baixos de ROS e regulação negativa do gene pró-inflamatório NLRP3. É possível que o pico de estresse oxidativo e as respostas pró-inflamatórias causadas pela “ferida” *in vitro* diminuíssem em culturas tratadas com extrato de GA. Isso porque há evidências de que o desencadeamento de processos oxiiinflamatórios iniciais é relevante para que ocorra a cicatrização de feridas (Ito et al., 2017).

Outros resultados relevantes dizem respeito à indução de maior formação de colágeno, superexpressão do gene Col-1 e fechamento mais rápido da “ferida” *in vitro* em culturas de fibroblastos, suplementadas com extrato de GA. Além disso, a modulação diferencial de outros genes relacionados à regeneração tecidual e função dérmica foi observada em culturas de fibroblastos suplementadas com extratos de GA. É o caso da superexpressão de FGF-7 em suplementos de extrato de fibroblasto GA, que é considerado um gene relevante para organogênese e mediação da cicatrização de feridas em mamíferos (Zinkle e Mohammadi, 2019). Além da expressão de NRPL3 reduzida, esse resultado também foi observado para MMP1. As collagenases, como a MMP-1, desempenham um papel importante no processo de cicatrização. Quando ocorre uma lesão física, gerando uma ferida, a MMP-1 é ativada auxiliando no processo de cicatrização por eliminação de proteínas danificadas, destruindo a matriz extracelular provisória, facilitando a migração de fibroblastos e remodelação do tecido de granulação (Keskin, Keskin, Öztürk e Çakan, 2021). Novamente, é possível que a baixa expressão de MMP1 observada em culturas de células de 24h possa estar relacionada ao fato de o extrato de GA ter acelerado o processo de cicatrização de feridas em relação às culturas controle.

### **Conclusões**

Uma vez que os ensaios *in vitro* têm algumas limitações na avaliação das propriedades de certos extratos ou drogas, os resultados aqui descritos de cultura de células de fibroblastos foram corroborados por ensaios *in vivo* envolvendo *Eisenia fetida*. Em resumo, apesar das limitações relacionadas aos estudos *in vitro* e *in vivo*, os resultados obtidos nesta investigação translacional sugerem que o extrato de GA tem um potencial efeito terapêutico na cicatrização de feridas agudas, como aquelas que ocorrem durante intervenções cirúrgicas.

### Declaração de Conflito de Interesses

Os autores declaram que não conhecem interesses financeiros concorrentes ou relações pessoais que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

### Reconhecimentos

Este trabalho teve o apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), pelo protocolo de projeto número 38133.UNI699.56949.07052018; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradecemos as contribuições dos técnicos de laboratório Marina de Souza Vencato e Bruno Tomazele Rovani.

### Referências

- Arthur, T. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Bosilevac, J. M., Nou, X., & Koohmaraie, M. (2005). Effects of Low-dose, low-penetration electron beam irradiation of chilled beef carcass surface cuts on *Escherichia coli* O157:H7 and Meat Quality. *Journal of Food Protection*, 68(4), 666–672. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.4.666>
- Al Zahrani, N. A., El-Shishtawy, R. M., and Asiri, A. M. (2020). Recent developments of Gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 204, 112609. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112609>
- Alexandru-Crivac, C. N., Umeobika, C., Leikoski, N., Jokela, J., Rickaby, K. A., Grilo, A. M., ... Houssen, W. E. (2017). Cyclic peptide production using a macrocyclase with enhanced substrate promiscuity and relaxed recognition determinants. *Chemical Communications*, 53(77), 10656–10659. <https://doi.org/10.1039/c7cc05913b>
- Algarve, T. D., Assmann, C. E., Cadoná, F. C., Machado, A. K., Manica-Cattani, M. F., ... da Cruz, I. B. M. (2019). Guarana improves behavior and inflammatory alterations triggered by methylmercury exposure: An in vivo fruit fly and in vitro neural cells study. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(15), 15069–15083. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04881-0>
- Alminderej, F., Bakari, S., Almundarij, T. I., Snoussi, M., Aouadi, K., and Kadri, A. (2021). Antimicrobial and Wound Healing Potential of a New Chemotype from *Piper cubeba* L. Essential Oil and in silico Study on *S. aureus* tyrosyl-tRNA Synthetase Protein. *Plants*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/plants10020205205>
- Alves, A. O., Weis, G. C. C., Unfer, T. C., Assmann, C. E., Barbisan, F., Azzolin, V. F. (2019). Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells. *Food and Chemical Toxicology*, 134, 110809. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110809>

Aminin, D., and Polonik, S. (2020). 1,4-Naphthoquinones: Some biological properties and application. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 68(1), 46–57.

<https://doi.org/10.1248/cpb.c19-00911>

Bai, J., Zhang, Y., Tang, C., Hou, Y., Ai, X., Chen, X., . . . Meng, X. (2021). Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 133, 110985.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110985>

Barchitta, M., Maugeri, A., Favara, G., Magnano San Lio, R., Evola, G., Agodi, A., and Basile, G. (2019). Nutrition and wound healing: An overview focusing on the beneficial effects of curcumin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1119.

<https://doi.org/10.3390/ijms20051119>

Benatrehina, P. A., Pan, L., Naman, C. B., Li, J., and Kinghorn, A. D. (2018). Usage, biological activity, and safety of selected botanical dietary supplements consumed in the United States. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(2), 267–277.

<https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2018.01.006>

Bernatoniene, J., and Kopustinskiene, D. M. (2018). The Role of Catechins in cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules*, 23(4), 965.

<https://doi.org/10.3390/molecules23040965>

Bittencourt, L. S., Machado, D. C., Machado, M. M., Dos Santos, G. F., Algarve, T. D., Marinowic, D. R., . . . Cruz, I. B. (2013). The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.041>

Borges, G. Á., Elias, S. T., da Silva, S. M., Magalhães, P. O., Macedo, S. B., Ribeiro, A. P., and Guerra, E. N. (2017). *In vitro* evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 45(3), 364–370.

<https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.01.005>

Cadoná, F. C., Cattanni, M. F. M. R., Machado, A. K., Oliveira, R. M., Flores, E. R. S., Assmann, C. E., . . . Cruz, I. B. M. (2014). Genomodifier capacity assay: A non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. *Analytical methods (print)*, v, 20, p. 1/c4ay01709a-11.

<https://doi.org/10.1039/C4AY01709A>

Chan, B. C., Ip, M., Gong, H., Lui, S. L., See, R. H., Jolival, C., . . . Lau, C. B. (2013). Synergistic effects of diosmetin with erythromycin against ABC transporter over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) RN4220/pUL5054 and inhibition of MRSA pyruvate kinase'. *Phytomedicine*, 20(7), 611–614.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.007>

Chandler, D., Woldu, A., Rahmadi, A., Shanmugam, K., Steiner, N., Wright, E., . . . Münch, G. (2010). Effects of plant-derived polyphenols on TNF-alpha and nitric oxide production induced by advanced glycation endproducts. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(Suppl. 2), S141–S150. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900504>

- Chang, S. K., Alasalvar, C., and Shahidi, F. (2019). Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects - A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(10), 1580–1604. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1422111>
- Choi, W. S., Shin, P. G., Lee, J. H., and Kim, G. D. (2012). The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophage cells *Cellular Immunology*, 280(2), 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.007>
- Dai, J., Chen, H., and Chai, Y. (2019). Advanced glycation End Products (AGEs) Induce Apoptosis of Fibroblasts by Activation of NLRP3 inflammasome via reactive oxygen species (ROS) Signaling Pathway. *Medical Science Monitor*, 25, 7499–7508. <https://doi.org/10.12659/MSM.915806>
- de Almeida Magalhães, T. S. S., de Oliveira Macedo, P. C., Converti, A., and Neves de Lima, Á. A. (2020). The Use of *Euterpe oleracea* Mart. As a New Perspective for Disease Treatment and Prevention. *Biomolecules*, 10(6), 813. <https://doi.org/10.3390/biom10060813>
- de Araújo, F. F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., and Pastore, G. M. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338, 127535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535>
- de Souza, D. V., Pappis, L., Bandeira, T. T., Sangoi, G. G., Fontana, T., Rissi, V. B., . . . Machado, A. K. (2020 November 10). Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) presents anti-neuroinflammatory capacity in LPS-activated microglia cells. *Nutritional Neuroscience*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1842044>
- Halliwell, B., and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Harris, C. L., Kuhnke, J., Haley, J., Cross, K., Somayaji, R., Dubois, J. et al. (2017). Best practice recommendations for the prevention and management of surgical wound complications. In *Foundations of best practice for skin and wound management*. A supplement of Wound Care Canada. <https://www.woundscanada.ca/docman/public/health-care-professional/bpr-workshop/555-bpr-prevention-and-management-of-surgical-wound-complications-v2/file>.
- Herman, A., and Herman, A. P. (2013). Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. *Skin Pharmacology and Physiology*, 26(1), 8–14. <https://doi.org/10.1159/000343174>
- Ito, H., Kanbe, A., Sakai, H., and Seishima, M. (2018) Activation of NLRP3 signalling accelerates skin wound healing. *Experimental Dermatology*, 27(1), 80–86. <https://doi.org/10.1111/exd.13441>
- Jentzsch, A. M., Bachmann, H., Fürst, P., and Biesalski, H. K. (1996). Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(2), 251–256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8)

- Keskin, E. S., Keskin, E. R., Öztürk, M. B., and Çakan, D. (2021). The effect of MMP-1 on wound healing and scar formation. *Aesthetic Plastic Surgery*. <https://doi.org/10.1007/s00266-021-02369-2>
- Khan, B. A., Mahmood, T., Mena, F., Shahzad, Y., Yousaf, A. M., Hussain, T., and Ray, S. D. (2018). New Perspectives on the Efficacy of Gallic Acid in Cosmetics and Nanocosmeceuticals. *Current Pharmaceutical Design*, 24(43), 5181–5187. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190118150614>
- Khedir, S. B., Bardaa, S., Chabchoub, N., Moalla, D., Sahnoun, Z., and Rebai, T. (2017). He healing effect of Pistacia lentiscus fruit oil on laser burn. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1407–1414. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1233569>
- Liao, W., Ning, Z., Chen, L., Wei, Q., Yuan, E., Yang, J., and Ren, J. (2014). Intracellular antioxidant detoxifying effects of diosmetin on 2, 2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress through inhibition of reactive oxygen species generation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(34), 8648–8654. <https://doi.org/10.1021/jf502359x>
- Lin, Y. H., Lin, J. H., Li, T. S., Wang, S. H., Yao, C. H., Chung, W. Y., and Ko, T. H. (2016). Dressing with epigallocatechin gallate nanoparticles for wound regeneration. *Wound Repair and Regeneration*, 24(2), 287–301. <https://doi.org/10.1111/wrr.12372>
- Lourenço, A. R., and Coffey, P. J. (2017). SOX4: Joining the Master Regulators of Epithelial-to-Mesenchymal Transition? *Trends in Cancer*, 3(8), 571–582. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.06.002>
- Machado, A. K., Andrezza, A. C., da Silva, T. M., Boligon, A. A., do Nascimento, V., Scola, G., . . . da Cruz, I. B. (2016). Neuroprotective Effects of Acai (Euterpe oleracea Mart.) against rotenone in vitro Exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 8940850. <https://doi.org/10.1155/2016/8940850>
- Machado, A. K., Cadoná, F. C., Azzolin, V. F., Dornelles, E. B., Barbisan, F., . . . da Cruz, I. B. M. (2015). Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. *Food Research International*, 67, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.056>
- de Oliveira, D.M., Barreto, G., Galeano, P., Romero, J.I., Holubiec, M.I., Badorrey, M.S., Capani, F., Alvarez, L.D.G. (2011). *Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis* protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against rotenone-induced cytotoxicity. *Human & Experimental Toxicology*, 30(9):1382-91. <https://doi.org/10.1177/0960327110389837>
- Maldaner, D. R., Pellenz, N. L., Barbisan, F., Azzolin, V. F., Mastella, M. H., Teixeira, C. F. Da Cruz IBM, Duarte MMMF. Interaction between low-level laser therapy and Guarana (*Paullinia cupana*) extract induces antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects and promotes proliferation in dermal fibroblasts. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(3), 629–637. <https://doi.org/10.1111/jocd.13055>

- Montrief, T., Bornstein, K., Ramzy, M., Koyfman, A., and Long, B. J. (2020). Plastic surgery complications: A review for emergency clinicians. *Western Journal of Emergency Medicine*, 21(6), 179–189. <https://doi.org/10.5811/westjem.2020.6.46415>
- Morabito, G., Trombetta, D., Singh Brajendra, K., Prasad Ashok, K., Parmar Virinder, S., Naccari, C., . . . Saso, L. (2010). Antioxidant properties of 4-methylcoumarins in in vitro cell-free systems. *Biochimie*, 92(9), 1101–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.04.017>
- Ojeh, N., Stojadinovic, O., Pastar, I., Sawaya, A., Yin, N., and Tomic-Canic, M. (2016). The effects of caffeine on wound healing. *International Wound Journal*, 13(5), 605–613. <https://doi.org/10.1111/iwj.12327>
- Orlowski, P., Zmigrodzka, M., Tomaszewska, E., Ranoszek-Soliwoda, K., Pajak, B., Slonska, A., . . . Krzyzowska, M. (2020). Polyphenol-conjugated bimetallic Au@AgNPs for improved Wound healing. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 4969–4990. <https://doi.org/10.2147/IJN.S252027>
- Repetto, G., del Peso, A., and Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Roggia, I., Dalcin, A. J. F., de Souza, D., Machado, A. K., de Souza, D. V., . . . Gomes, P. (2020). Guarana: Stability-Indicating RP-HPLC method and safety profile using microglial cells. *Journal of Food Composition and Analysis*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103629>
- Santos, I. B., de Bem, G. F., da Costa, C. A., de Carvalho, L. C. R. M., de Medeiros, A. F., Silva, D. L. B., . . . Resende, A. C. (2020). Acai seed extract prevents the renin-angiotensin system activation, oxidative stress and inflammation in white adipose tissue of high-fat diet-fed mice. *Nutrition Research*, 79, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.05.006>
- Schimpl, F. C., da Silva, J. F., Gonçalves, J. F., and Mazzafera, P. (2013 October 28). Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(1), 14–31. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.023>
- Souza-Monteiro, J. R., Arrifano, G. P. F., Queiroz, A. I. D. G., Mello, B. S. F., Custódio, C. S., Macêdo, D. S., . . . Crespo-López, M. E. (2019). Antidepressant and Antiaging Effects of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 3614960. <https://doi.org/10.1155/2019/3614960>
- Spanakis, M., Kamas, S., and Niopas, I. (2009). Simultaneous determination of the flavonoid aglycones diosmetin and hesperetin in human plasma and urine by a validated GC/MS method: In vivo metabolic reduction of diosmetin to hesperetin. *Biomedical Chromatography*, 23(2), 124–131. <https://doi.org/10.1002/bmc.1092>
- Syed, F., Bagabir, R. A., Paus, R., and Bayat, A. (2013 August). Ex vivo evaluation of antifibrotic compounds in skin scarring: EGCG and silencing of PAI-1 independently inhibit growth and induce keloid shrinkage. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 93(8), 946–960. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.82>

- Tasneem, S., Liu, B., Li, B., Choudhary, M. I., and Wang, W. (2019). Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. *Pharmacological Research*, 139, 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.001>
- Ud-Din, S., Foden, P., Mazhari, M., Al-Habba, S., Baguneid, M., Bulfone-Paus, S., . . . Bayat, A. (2019 August). A Double-Blind, Randomized Trial Shows the Role of Zonal Priming and Direct Topical Application of Epigallocatechin-3-Gallate in the Modulation of Cutaneous Scarring in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(8), 1680–1690.e16. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.01.030>
- Wang, X., Liu, K., Ruan, M., Yang, J., and Gao, Z. (2018 November 1). Gallic acid inhibits fibroblast growth and migration in keloids through the AKT/ERK signaling pathway. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(11), 1114–1120. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmy115>
- Xie, C., Kang, J., Li, Z., Schauss, A. G., Badger, T. M., Nagarajan, S., . . . Wu, X. (2012 September). The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: Blockade of LPS-mediated TNF- $\alpha$  and IL-6 production through inhibiting NF- $\kappa$ B activation and MAPK pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(9), 1184–1191. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.06.013>
- Zinkle, A., and Mohammadi, M. (2019 February 12). Structural Biology of the FGF7 Subfamily. *Frontiers in Genetics*, 10, 102. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00102>

## 5 ARTIGO EM INGLÊS

A versão apresentada abaixo foi submetida a FOOD RESEARCH INTERNATIONAL JOURNAL. O comprovante de submissão encontra-se no Anexo J.

### **Amazonian guarana- and açai-conjugated extracts improve scratched-fibroblast healing and *Eisenia fetida* surgical tail amputation by modulating oxidative metabolism.**

Fellipe Danezi Felin<sup>1#</sup>, Ednea Aguiar Maia-Ribeiro<sup>2#</sup>, Carollina Danezi Felin, Nathália de Affonso Bonotto<sup>4</sup>, Bárbara Osmarin Turra<sup>5</sup>, Isabel Roggia<sup>4</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>2,4</sup>, Cibele Ferreira Teixeira<sup>5</sup>, Moisés Henrique Mastella<sup>5</sup>, Daniel Santos<sup>6</sup>, Érico M.M. Flores<sup>6</sup>, Fernanda Barbisan<sup>4,5,7</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>4,5\*</sup>, Tiango Aguiar Ribeiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Mestrado Profissional em Ciências da Saúde- Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS-Brasil.

<sup>2</sup> Fundação Universidade Aberta da Terceira Idade (FUNATI)- Manaus- AM-Brasil.

<sup>3</sup> Acadêmica de Medicina Universidade Franciscana- (UFN)- Santa Maria-RS-Brasil.

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Gerontologia- Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS-Brasil.

<sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia- Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS-Brasil.

<sup>6</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS-Brasil.

<sup>7</sup> Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS-Brasil.

# Fellipe Danezi Felin and Ednea Aguiar Maia-Ribeiro have contributed equally to produce the present study

\*Corresponding author: Avenida Roraima, 1000, prédio 19, sala 3102, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS Zip Code: 97105-900 *E-mail*: [ivana.ufsm@gmail.com](mailto:ivana.ufsm@gmail.com) (Ivana Beatrice Mânica da Cruz).

### **ABSTRACT**

Previous studies have suggested that guarana (*Paullinia cupana*) and açai (*Euterpe oleracea*) have antioxidant, anti-inflammatory, and proliferative properties, indicating their potential therapeutic action in wound healing. In order to test this hypothesis, we produced a conjugated

guarana-açaí (GA) extract and we tested its healing action in an *in vitro* wound model using a commercial HFF-1 fibroblast strain and tested its healing action on earthworms (*Eisenia fetida*) subjected to tail amputation by surgical incision. Methods: A hot-water extract obtained from roasted guarana seeds and fresh açai seed berries was chemically characterized by high-resolution mass spectrometry (ESI-ToF-MS). The antioxidant and genoprotective capacity of GA-extract was tested. The last three - five posterior segments of the clitellate earthworm tail reared under standardized conditions were surgically amputated using a scalpel. Next, topical phosphate-buffered saline (PBS) or GA-extract (2  $\mu$ L) was applied to the surgical wound. The rate of cell migration and tissue regeneration at the local wound site was histologically evaluated at 1, 3, 6, 12, and 24 h after the procedure using Masson-Goldner staining. Expression of the *SOX4* gene that acts in epithelial-to-mesenchymal transition was determined by RT-qPCR. Results: Sixteen bioactive molecules, including some previously described substances, were identified. All tested concentrations exhibited antioxidant and genoprotective effects. The GA extract accelerated the healing processes as observed in fibroblasts and through macroscopic and histological analyses in *Eisenia fetida*, including increased expression of *SOX4*. The results indicated that GA extract has a potential role in the healing induced wounds both *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Amazonian fruits; Wound healing; Californian earthworm; cell culture

## 1. Introduction

There is a clear correlation involving demographic population aging and an increase in the frequency of plastic surgery, since people are living longer and are more concerned with maintaining a more youthful appearance, personal autonomy, and health. Although aesthetic surgical procedures are typically elective and usually performed on healthy patients, some undesirable post-surgical complications can occur including infections, local anaesthetic systemic toxicity, electrolyte and hematologic alterations, intravascular fluid shifts, and wound healing abnormalities (Montrief, Bornstein, Ramzy, Koyfman, and Long, 2020). Therefore, optimal management of postoperative wounds is important to prevent potential complications such as the appearance of thick, deformed scars and keloids and development of nodules under the skin, which is caused by the formation of hard tissue (Harris et al., 2017).

One factor that seems to mitigate the occurrence of complications in surgical healing is patient nutritional status. Evidence has shown that malnutrition or deficiency in certain nutrients and bioactive molecules present in some foods can cause impairment of the complex biological and molecular events of the wound healing process. For example, deficiency can alter post-surgical events such as coagulation, inflammation, migration, proliferation, and skin remodeling (Barchitta et al., 2019). In addition to oral ingestion, current studies have suggested that the topical application of certain extracts or drugs based on bioactive molecules from fruits and other herbal plants could have beneficial effects on wound healing processes (Alminderej et al., 2021; Khedir et al., 2017; Ojeh et al., 2016; Orłowski et al., 2020; Ud-Din et al., 2019).

Populations living in the Amazon rainforest use herbal plants and products obtained from certain fruits to relieve various clinical symptoms such as inflammation, pain, fever, and for wound healing. This is the case for guarana (*Paullinia cupana*) seed powder and açai (*Euterpe oleracea*), which have important antioxidant and anti-inflammatory properties

(Algarve et al., 2019; Alves et al., 2019; Benatrehina, Pan, Naman, Li, and Kinghorn, 2018; Chang, Alasalvar, and Superfruits 2019; de Almeida et al., 2020; de Souza et al., 2020; Schimpl, da Silva, Gonçalves, and Mazzafera, 2013). Studies have shown that these fruits have an effect on the reversal of mitochondrial dysfunctional states and anti-aging properties (de Oliveira et al., 2011; Machado et al., 2015, 2016; Souza-Monteiro et al., 2019). An investigation performed by Maldaner et al. (2020) also reported that interactions between low-level laser therapy and guaraná extract present antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects and promote fibroblasts proliferation.

These previous results support the hypothesis that a conjugated extract based on roasted guarana seeds and fresh açai berry seeds (GA) could have an effect on the healing processes resulting after acute trauma, such as surgical procedures. To test this hypothesis, we produced an aqueous GA-conjugated extract in which the main bioactive molecules were identified. After safety tests using keratinocyte and fibroblast cell lines, *in vitro* and *in vivo* assays were conducted using human fibroblasts and surgical amputation of the tails of the Californian red earthworm *Eisenia fetida*. The role of oxidative metabolism modulation in healing processes in these experimental models was also determined.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Chemicals and equipments**

All chemicals used in this study were purchased from the following companies: Gibco® Life Technologies Inc. (Grand Island, NY, USA), Vitrocell-Embriolife (Campinas, São Paulo, Brazil), Qiagen (Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany), Ludwig Biotechnology (Alvorada, Rio Grande do Sul, Brazil), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA), and Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA). . . Molecular biology reagents were as follows: TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Grand

Island, NY, USA), iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories), DNase (Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA, USA), QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen), and Equipments NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), thermal cycler, MaxyGene II, Axygen®, Corning Incorporated, Nova York, USA), Rotor-Gene Q 5plex HRM System (Qiagen). The HFF-1 and HaCAT cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, USA). Protocols involving spectrophotometric and fluorimetric analyses were performed using a 96-well microplate reader (SpectraMax M2/M2e Multimode Plate Reader; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Leica DMI 4000 B microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), and FACSCanto Flow Cytometer™ II (BD Biosciences, San Jose, California, USA). use Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, San Jose, California, USA). The analysis of *Eisenia fetida* images was performed by Digimizer Image Analysis Software (Acacelaan, Ostend, Belgium).

## 2.2 Plant Materials

Toasted guarana seed and fresh açai berries were obtained from agricultural producers in Maués city, Amazonas, and transferred to the laboratory where the extract was produced. The açai berries were pulped, and only the seeds were used to produce the GA-conjugate extract. The use of açai seed is justified because the industrialization of açai pulp generates a large amount of residues that are considered environmental pollutants and which may still have biological properties of interest to human health (Santos et al., 2020). The extract was produced only with hot water at a low pH via the addition of citric acid. The details of the process to obtain GA-conjugated extract are confidential, since patent registration was requested from the National Institute of Intellectual Property (INPI) of Brazil (registration number: BR 10.2020.000439-5). The GA-conjugated extract was rotaevaporated and lyophilized for further analysis of its chemical composition using high-resolution electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (ESI-ToF-MS), as well as *in vitro*, non-cellular, and *in vivo* assays.

### 2.3 General Experimental Design

The following experimental protocols were conducted: (1) safety indicators of the GA-conjugated extract at concentrations of 0, 1, 3, 5, 10, and 30  $\mu\text{g/mL}$  to evaluate the effect on the viability and proliferation rate of two human commercial cell lines: keratinocytes (HaCaT) and fibroblasts (HFF-1). The antioxidant and genoprotective capacities of the extracts were determined by 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl (DPPH) and GEMO non-cellular tests. Overall, these results allowed us to choose the minimal concentration of GA-conjugated extract with adequate safety and efficacy properties. The following protocols were performed with the chosen GA conjugate extract concentration; (2) the GA-conjugated extract was evaluated *in vitro* on fibroblast cultures through scratched wound healing assays analyzing cultures 3, 6, 24, and 72 h after monolayer physical injury (Borges et al., 2017). The modulatory effect of GA extract on oxidative markers, apoptosis, cell cycle, and gene expression associated with fibroblast function were analyzed in 24 h and 72 h cell cultures; (3) *in vivo* assays were performed using *Eisenia fetida* as an experimental model in which the terminal 3- 5 posterior segments of the tail were surgically removed using a scalpel. The earthworm tail wound was then exposed to 2  $\mu\text{L}$  of buffer solution (control) or GA-conjugated extract. Cellular migration and scarring events were histologically evaluated 1, 3, 6, 12, and 24 h after the procedure. As SOX-4 transcription factor gene is considered an important gene in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (Lourenço and Coffey, 2017), its modulation was compared in injured tissues of earthworms with and without exposure to GA-conjugated-extract 3 and 24 h after the surgical tail incision.

### 2.4 Cell culture and treatments in whole cells

*In vitro* investigations used two commercial cell lines, keratinocytes (HaCaT) and a fibroblast cell line (HFF-1), were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), supplemented with 1% penicillin/streptomycin and amphotericin B.

Cells were maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidified atmosphere and were expanded by obtaining the optimal amount for experiments. After cell seeded in 6 or 96-well plates as needed for the test, both cell lines were treated with GA-conjugated extract at concentrations of 1, 3, 5, 10, and 30 µg/mL. After determining the concentration of GA-conjugated extracts, a time curve was plotted over 1, 3, 6, and 24 h to evaluate reactive oxygen species (ROS) production and superoxide anion levels, nitric oxide, and lipoperoxidation. Other parameters were evaluated after 24 and 72 h of incubation.

Once the concentration-response in whole cells was determined, the next step was to perform the scratch assay.

### **2.5 Scratch assay *in vitro***

At 80% confluence, the fibroblast monolayer cell was streaked in a straight line using a 200 µL sterile pipette, thus simulating an *in vitro* wound. We then used sterile PBS to wash the cells to remove cellular debris. Then, we added the appropriate culture medium and treatment with the conjugated GA extract. Wound photographs were taken at 0, 6, 24, and 72 h to investigate and analyze the scratched wound. The scratched area was measured using Digimizer Image Analysis Software. Digital photographs were obtained using a Leica DMI 4000 B microscope.

### **2.5 Cell viability assays**

Three complementary protocols were used for viability analysis after 24 h of exposure to GA-conjugated-extracts: (1) MTT, (2) neutral red, and (3) ATP assays.

#### ***MTT***

MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assays were performed according to the instructions provided by Azzolin et al. (2016). Briefly, the

supernatants of the treatments were removed, and the cells were resuspended in PBS (0.01 M; pH 7.4). MTT was dissolved to 5 mg/mL in PBS and 10  $\mu$ L was added to a 96-well plate containing sample treatments and was subsequently incubated for 1 h at 37°C. The supernatant was removed from the wells and the cells were resuspended in 200  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide (DMSO). Optical absorbance was measured at 560 nm.

#### *Neutral Red*

The neutral red uptake assay provides a quantitative estimate of the number of viable cells in a culture, based on the ability of viable cells to bind and incorporate neutral red dye in lysosomes. Briefly, 100  $\mu$ L (50  $\mu$ g/mL) of neutral red dye was added to 96-well cell culture plates. The plates were then incubated for 3 h at 37°C in the dark. The cells were then washed with PBS pH 7.4 and 100  $\mu$ L of the desorption solution (50% EtOH, 49% H<sub>2</sub>O, 1% glacial acetic acid solution) was added. Optical absorbance was measured at a wavelength of 540 nm (Repeto et al., 2008).

#### *ATP Assay*

According to the manufacturer, Promega Corporation, the CellTiter-Glo® cell viability assay detects live cells by quantifying the amount of ATP present in living cells. The reagent quickly lyses the cells, stabilizes the ATP present, and generates a luminescent signal proportional to the amount of ATP present. The signal is directly proportional to the number of living cells in the sample. The test was performed according to the manufacturer's instructions and those contained in the package insert of the kit.

## **2.6 Non-cellular antioxidant and genoprotective assays**

#### *DPPH Assay*

The antioxidant capacity of the GA-conjugated extract was evaluated using 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) assays to compare samples with rutin, a pure antioxidant molecule. All tests were performed in triplicate. The antioxidant capacities were described in terms of IC50 (concentration of sample required to scavenge 50% of DPPH free radicals).

#### *Genoprotective – GEMO assay*

Double-stranded DNA (dsDNA) from calf thymus, a reference pro-oxidant, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and a dye specific for dsDNA, PicoGreen, which is part of the Quant-IT™ kit (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA), was used to verify the genoprotective potential of the extracts. PicoGreen DNA. The test assumes that if the investigated compound has a protective capacity, DNA fragmentation will be attenuated and fluorescence of a test group will decrease compared to a positive control group (obtained by exposing calf DNA to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The 96-well plate was filled with 10 µL of calf thymus DNA (1 µg/mL plus 70 µL of TE buffer) containing varying concentrations of the GA-conjugated-extract and 70 µL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 µM). The reaction mixture was then incubated for 30 min. After 30 min, PicoGreen® DNA dye was added, and the fluorescence was read (excitation at 480 nm/emission at 520 nm). The genoprotective effect was considered to be present when the absorbance was lower than that of the positive control group (Cadoná et al., 2014).

#### **2.7 Apoptosis detection by flow cytometry**

Complementary analysis via flow cytometry confirmed that treatment with the GA-conjugated extract was safe. Cytotoxicity was assessed using the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, allowing the assessment of early apoptotic cells (annexin V positive, Propidium Iodide (PI) negative), necrotic cells (annexin V positive, PI positive), and viable cells (annexin V negative, PI negative). The protocol was performed according to BD Bioscience® (San Jose, California, USA) instructions. Briefly, cells were seeded in 6-well plates at density  $1 \times 10^6$

cells/mL, after 24 hours wound “scratching” was carried out. Plates were immediately treated with GA-conjugated-extract (5 µg/mL) and incubated for 24 hours. After incubation, cells were trypsinized, washed twice with PBS pH 7.0, and resuspended in 1× binding buffer. The resuspended cells were gently vortexed and stained with 5 µL of Annexin-V-FITC and 5 µL of PI. After 15 min incubation in the dark at 22-25°C, 400 µL of 1 × binding buffer was added to each tube, and the fluorescence of each cell was analyzed by flow cytometry according to the manufacturer's specifications.

## **2.8 Oxidative marker assays**

Modulation of oxidative stress was evaluated in cultured cells of the HFF-1 lineage 3, 6, 24, and 72 h after scratching and treatment with GA-conjugated-extract (5 µg/mL) by analyzing the levels of superoxide, ROS, nitric oxide, and lipoperoxidation.

### *Superoxide*

Superoxide levels were quantified using a colorimetric assay that produces a formazan salt via reaction with nitroblue tetrazolium chloride (NBT), according to a protocol established by Morabito et al. (2010).

### *ROS by 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate*

DCFH-DA is a non-fluorescent chemical that is deacetylated by mitochondrial esterase enzymes to DCFH, which reacts with ROS to form DCF, a fluorescent molecule. The assay was performed as described by Halliwell and Whiteman (2004).

### *Nitric Oxide*

Nitric oxide levels were indirectly quantified by analyzing nitrate abundance using the Griess reagent, as described by Choi, Shin, Lee, and Kim (2012).

### *Lipoperoxidation*

Lipid peroxidation was spectrophotometrically estimated through the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), as previously described by Jentzsch, Bachmann, Fürst, and Biesalski (1996).

### **2.10 Quantification of total collagen synthesized via Sirius Red acid dye**

After 24, 48 or 72 h of scratch assay in 96-well plates, the medium was removed and the wells washed with 0.1M PBS. Then, 100 $\mu$ L of Bouin's Fluid (picric acid, formaldehyde and glacial acetic acid) was added for fixation for 1 hour. Again, the samples were washed with PBS, and then Sirius Red dye was added, remaining incubated with the cells for 1 hour. Afterwards, the maximum amount of dye was removed and washed with 150 $\mu$ L of 0.01M hydrochloric acid solution for 30 seconds to remove the dye that did not bind to collagen. The next step, the dye was removed from the cell layers with the addition of 0.1M NaOH solution, which remained incubated for 30 minutes. 100 $\mu$ L aliquots of the solutions contained in the wells were transferred to a new plate and the absorbance was measured in a reader at 660nm.

### **2.9 Earthworm rearing conditions and ethical issues**

Earthworms were commercially obtained and acclimated in the Laboratory of 144 Biogenomics, Federal University of Santa Maria, Brazil, for 7 days at 21°C  $\pm$  1°C in a Bio-Oxygen Demand (BOD) (Thoth, São Paulo, Brazil) incubator under a 12/12 h dark/light cycle. Before being used in experiments, the earthworms were reared for 30 days in small plastic boxes (18.5  $\times$  18.5  $\times$  6.5 cm) protected from light and containing sterilized soil and cattle manure (10:1 proportion) at 80%–85% humidity. The soil used in this treatment was sterilized in an oven at 200°C for 2 h to kill nematodes and other potential worms, parasites, and pathogens. Approximately 500 g of wet soil was placed in each container. The experiments were conducted adults selected on the basis of the presence of well-developed clitellum. The experiments were performed independently in triplicate. In many countries, including Brazil,

prior approval by an Animal Ethics Committee for studies involving earthworms is not required. However, all experiments were performed in accordance with the ethical principles of animal experimentation that aim to avoid discomfort and unnecessary suffering.

### **2.10 Histological analysis**

Earthworm samples subjected to tail amputation with and without GA-conjugated extract topical exposure were euthanized with -70% cold alcohol and then fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.4 at 4°C, Paraplast (Bio-Optica Spa, Milan, Italy)-embedded cells were cut into 7- $\mu$ m thick sections. Histological observations were performed using Masson Goldner's trichrome stain. Sections were examined using a Leica DMRB light and epifluorescence microscope, and images were acquired by optical microscopy (100  $\times$  and 200  $\times$  magnification) using a Leica DMI 4000 B microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

### **2.10 Gene expression protocol**

Earthworms were rinsed with distilled water, and the last three- five rings were excized with a scalpel and immediately placed in TRIzol for mRNA extraction. RNA was extracted using Quick-Zol (TriZol, Ludwig Biotech Co, Alvorada, Brazil), according to the manufacturer's instructions, and was quantified using a NanoDrop™ 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, , Grand Island, NY, USA). Further, RNA samples were treated with 0.2  $\mu$ L of DNase 259 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37°C for 5 min to digest any DNA contamination, and at 65°C for 10 min. Gene expression was evaluated by qPCR using a thermocycler (Axygen® 261 MaxyGene II Thermal Cycler, Corning 262 Life Sciences, Tewksbury, MA, USA).

RT-PCR was performed using 19  $\mu$ L of a mix containing the iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories), the specific primers for each gene and 1  $\mu$ L cDNA sample.

The parameters used were an initial denaturation step of 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s, and a melting step to generate a melting curve from 65°C to 95°C with an increase of 0.5°C over 5 s.

The PCR primers for evaluating gene expression in the fibroblast lineage were: FGF-2 Forward: 5'-AGTGTGTGCTAACCGTTACCT-3' and Reverse: 5'-ACTGCCAGTTCGTTTCAGTG-3'; FGF-7-Forward: 5'-CTGTGCGAACACAGTGGTACCTG-3' and Reverse 5'-CCAACTGCCACTGTCCTGATTTC-3'; Col 1- Forward: 5'-TCTTGGTCAGTCCTATGCGGATA-3' and Reverse: 5'-CATCGCAGAGAACGG AT CT-3'; MMP-1- Forward 5' -AGTGACTGGGAAACCAGATGCTGA-3' and Reverse 5'-TCAGTGAGGACAAACTGAGCCACA-3'; NLRP3- Forward 5' - ACTACTCTGTGAGGGACTCTTG-3' and Reverse 5'- GGAGGTCAG AAGTGT GGA AAG-3'.

Regarding the analyzes in *Eisenia fetida*, the SOX4 gene had the following sequence: Forward: 5'-CAGGGAGTACCCGGACTACA-3' and reverse 5'-CCACGAGTCACTTACCAGCA-3'.

The expression level of  $\beta$ -actin was used as an internal control for both cells and *Eisenia fetida*. Relative expression was calculated using the comparative Ct method and was expressed as -fold expression compared to the control.

## 2.11 Statistical analysis

Comparisons among treatments were performed using GraphPad Prism software (v.8.02, 2019). Data were compared among treatments using analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-hoc test or by Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance, followed by the Wilcoxon-Mann-Whitney post hoc test. Data in the graphs are presented as means plus 95% confidence intervals (CIs), which were the most representative statistical parameters for the comparison of treatments. Categorical variables were compared using Chi-squared or Fisher's exact tests and are presented as relative frequencies (%). The area of brown bodies (BB; in  $\mu\text{m}$ )

was compared using the Digimizer image analysis software package (v.5.4.1, MedCalc Software, Belgium), which allowed manual measurements, as well as automatic object detection, for the measurement of object characteristics. All tests were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

### **3. Results**

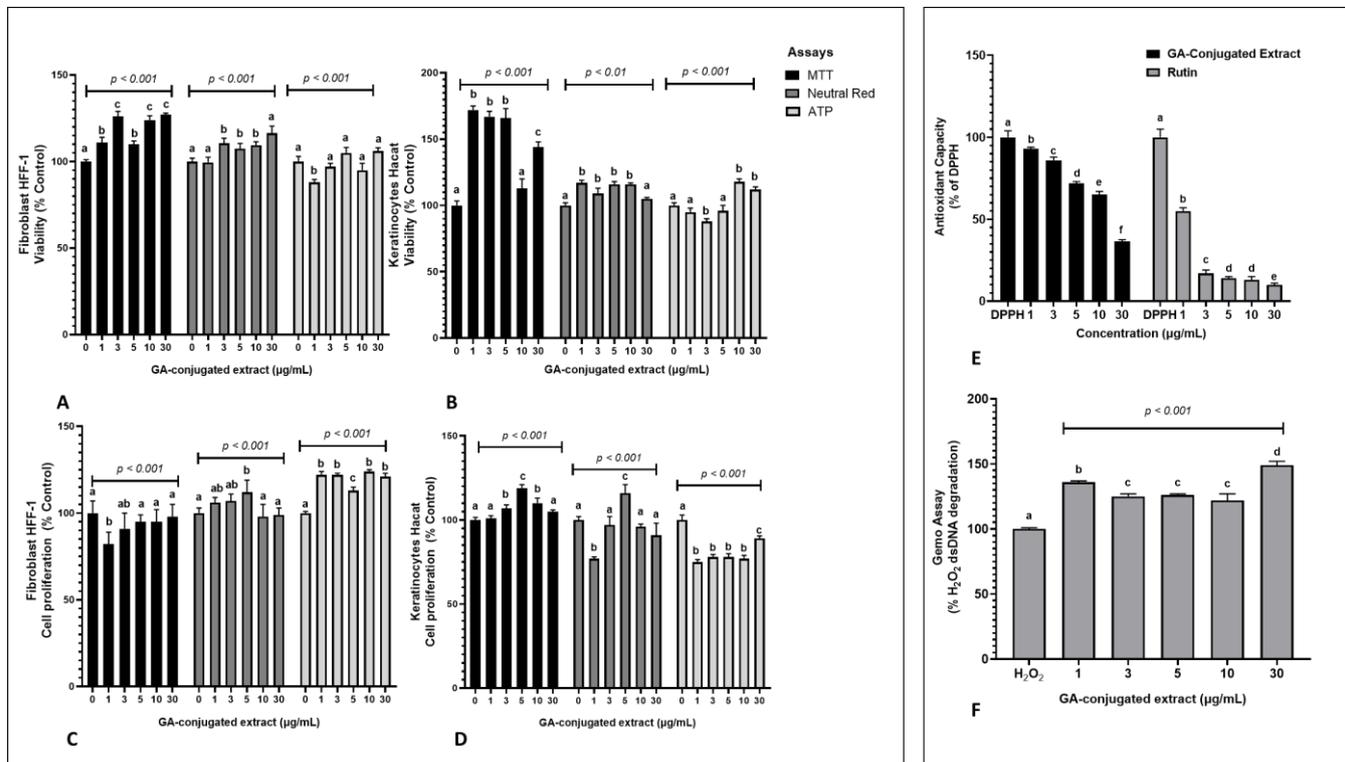
#### **3.1 Identification of chemical compounds in GA-conjugated extracts**

An overview of all compounds identified in the GA-conjugated extracts analyzed by ESI-ToF-MS is shown in Table 1 (supplementary material). In addition to caffeine, which is an alkaloid, polyphenols present mainly in guarana extracts were identified, such as catechin, gallic acid, quercetin, and epigallocatechin gallate (EGGC). However, other polyphenols were also observed, such as diosmetin, which is a flavone derived from luteolin, methyl gallate, and torachryson, which belong to the class of naphthalenes. A macrocyclic peptide molecule (oscillacyclamide A) was also detected in the extract. Three molecules detected in the analysis could not be identified. The presence of citric acid was expected because this molecule was used to lower the pH in the extraction process, which gave rise to the GA-conjugated extract.

#### **3.2 Indicators of safety and biological capacity of GA-conjugated extracts**

The cytotoxic effects of GA-conjugated extract on keratinocytes and fibroblasts was analyzed using three complementary assays. Data from MTT and neutral red assays showed that all extract concentrations significantly increased cell viability compared to controls in 24 h cell culture. However, the ATP assay showed an increase in the viability of fibroblasts cultured at 10 and 30  $\mu\text{g/mL}$  (Figures 1A, B). In 72 h cultures, GA conjugates triggered slightly

increased cellular proliferation in MTT and neutral red assays for both fibroblasts and keratinocytes. However, an antagonistic action was observed in these cells, when considering the ATP assay. Whereas fibroblasts presented higher ATP levels than controls (Figure 1C), keratinocytes exhibited lower ATP concentrations than controls (Figure 1D). The GA-conjugated extracts showed high antioxidant capacity and genoprotective capacity in the analysis performed for DPPH and GEMO assays (Figures 1E, D). Overall, the results indicated that GA-conjugated extract at 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration could result in biological activity in the wound healing process.



**Figure 1-** The *in vitro* effects of GA-conjugated extract at different concentrations on HFF-1 human fibroblasts and Hacat keratinocytes cultures (A, B) cellular viability in 24 h cell cultures; (C,D) cellular proliferation in 72 h cell cultures. Data were generated from three different protocols: MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide), Neutral Red Assay and ATP assay. The antioxidant (E) and genoprotective capacity (F) of GA-conjugated extract at different concentrations were quantified by DPPH (E) and GEMO (F) assays, respectively. Statistical comparisons were performed by One-Way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test. Different letters indicated significant differences at  $p \leq 0.05$ .

### 3.4 *In vitro* wound scratch assay

The GA-conjugated extract effects in *in vitro* scratched assays were employed to evaluate dermal fibroblast migration, which is a very important event for wound contraction and further cellular proliferation. Cell migration was observed at 6, 12, and 24 h after scratching (Figure 2). Cell cultures supplemented with 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GA-conjugated extract exhibited a greater extent of migration than controls (Figures 2 A-D). Moreover, cellular proliferation observed in confluent monolayers after 72 h of cell culture was higher in fibroblasts GA-extract-exposed cells than in controls (Figures 2 E, F).

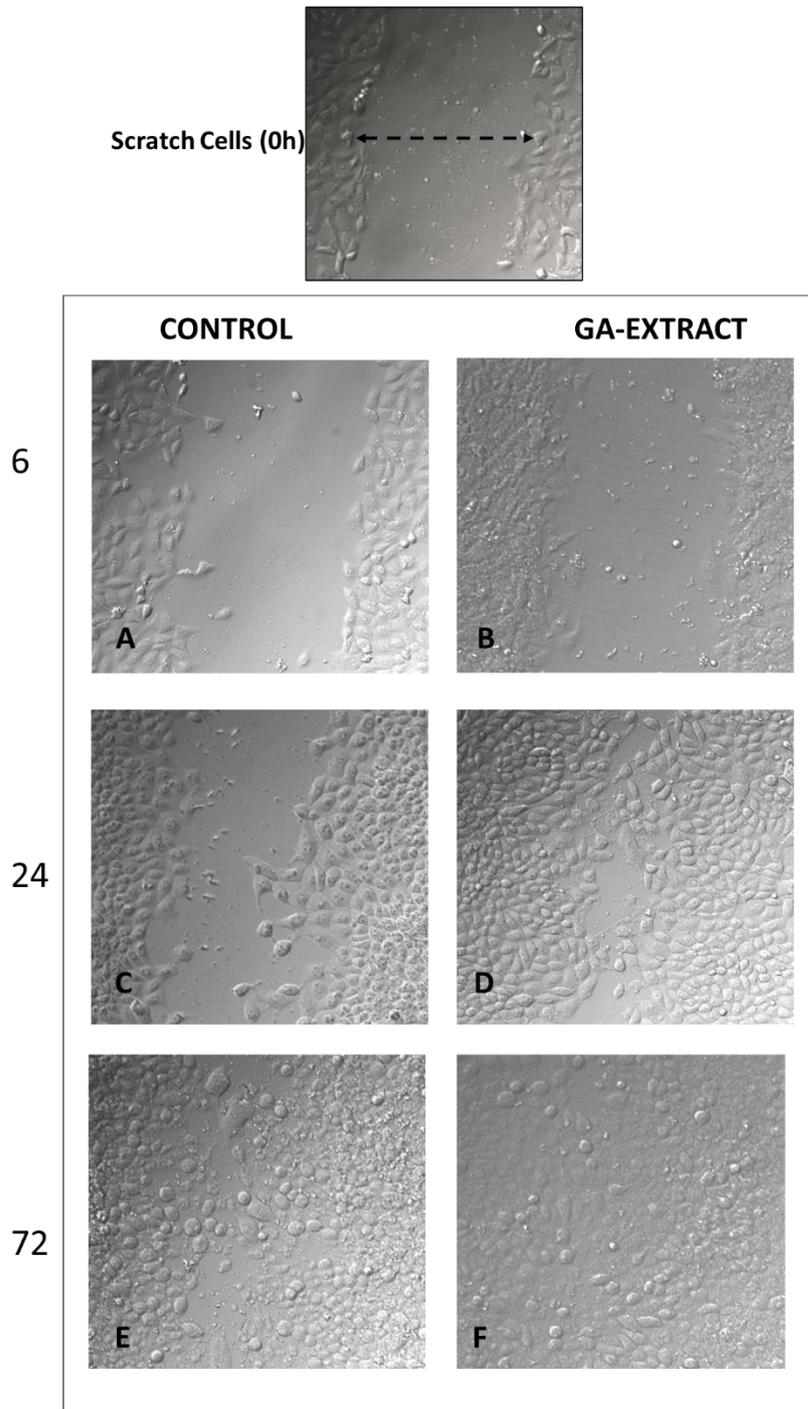


Figure 2- Evaluation of GA-conjugated extract at 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  concentration on HFF-1 human dermal fibroblasts submitted to scratch assay experiment. Fibroblast migration was evaluated by microphotographs (200 x magnification) 6, 24 and 72 h after the cell cultures are torn with the aid of a pipette tip. To determine the cell numbers migrating during scratch closure, the perimeter of each scratch was traced and the cells inside the area of closure were counted using Digimizer software. Six wells were counted for each condition, and three independent experiments were performed, and data are presented as mean  $\pm$  SD of cells that migrated inside the scratch of a single representative experiment. The migration of cultures supplemented with GA-conjugated extract in relation to non-supplemented cultures was compared by Student-t test and was significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) in those receiving the extracts than in controls at the three time points (6, 24 and 72 h) in which they were evaluated.

### 3.5 Oxidative metabolism modulation in scratched fibroblasts

The potential role of oxidative metabolism modulation in the migration and regeneration of scratched fibroblast monolayers was analyzed after 3, 6, 24, and 72 h of cell culture. Superoxide and NO levels decreased significantly in 3 h fibroblasts cultures supplemented with GA extract compared to controls. However, the concentrations of these oxidant molecules were similar between the treatment groups (Figures 3A, 3B). In contrast, ROS levels decreased in a time-dependent manner in fibroblasts exposed to GA compared to those in controls (Figure 3C). The levels of lipoperoxidation measured by TBARS quantification also decreased significantly in 6, 24 and 72 h cell cultures when compared to controls.

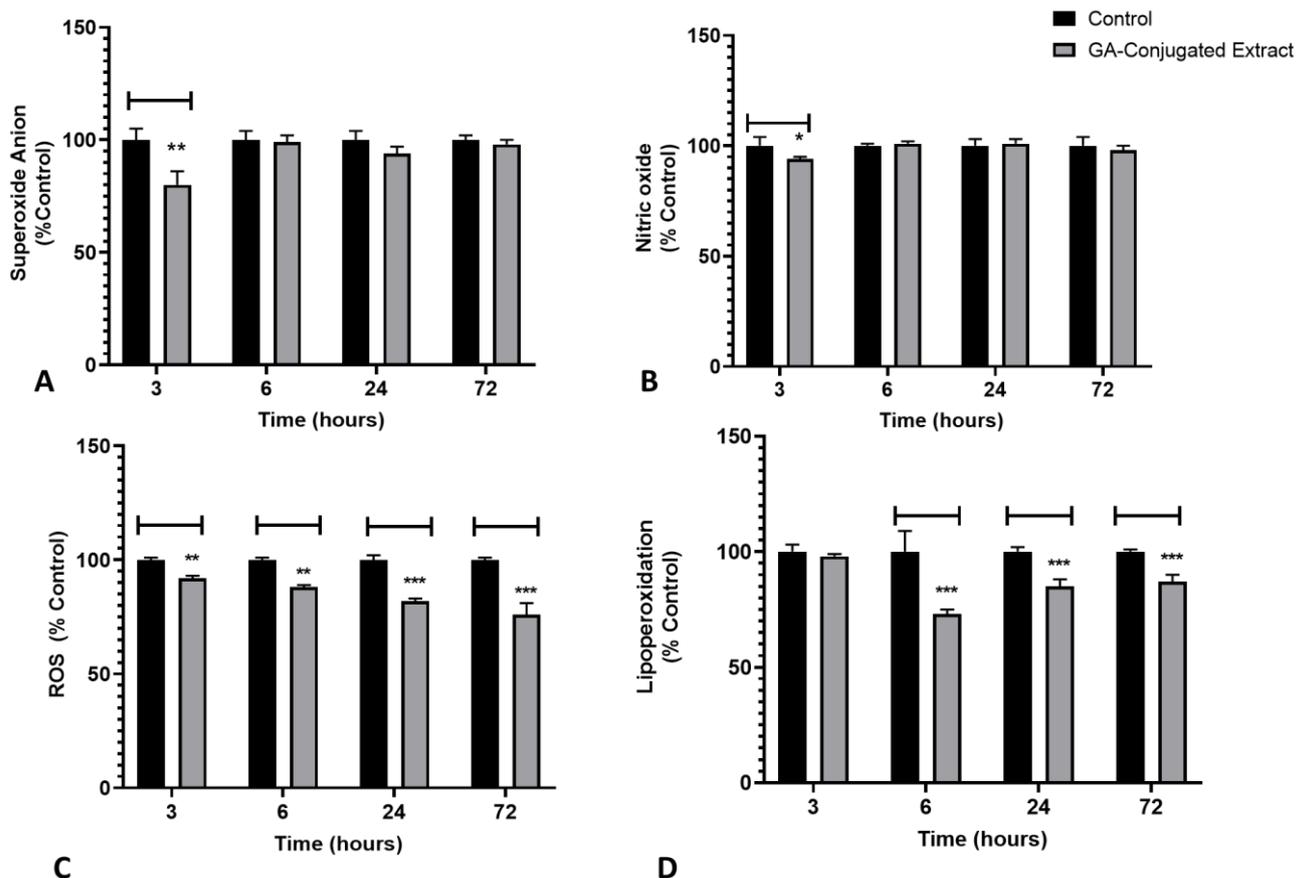


Figure 3- The *in vitro* modulatory effects in four oxidative metabolism markers (superoxide, nitric oxide, reactive oxygen species-ROS and lipoperoxidation) of GA-conjugated extract at 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration on 3, 6, 24 and 72 h cultures of HFF-1 human dermal Data are presented

as relative percentage of control. Statistical comparisons were performed by One-Way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test. Different letters indicated significant differences at  $p \leq 0.05$ .

To assess the impact of GA-extracts on the survival and modulation of apoptosis and necrosis of scratched cells, flow cytometric analysis in 24 h cultures was conducted. In this analysis, the frequency of live cells was significantly lower in cultures exposed to GA extract than in controls. An inverse situation was observed in relation to the frequency of cells in early and late apoptosis, which was higher in the control group than in cells exposed to GA extract. However, the frequency of necrotic cells was similar between the two groups (Figures 4 A-C).

Cells exposed to GA extract showed higher collagen concentration in 24 h cultures, which was consistent with the scratched closure pattern observed in Figure 2. However, in 48 h and 72 h cultures, collagen levels were similar between cells exposed or not exposed to GA extract (Figure 4D). Considering the more rapid pattern of cell confluence in cultures exposed to GA extract, analysis of its effects on the modulation of genes related to healing processes and dermal fibroblast function was also conducted. The transcriptional levels of *FGF2* were similar between the two groups. However, *FGF7* and *COL1* genes were overexpressed in cultures exposed to GA extract compared to the controls. On the other hand, downregulation was observed for the *MMP1* and *NLRP3* genes in the group exposed to the GA extract compared to the controls (Figure 4E).

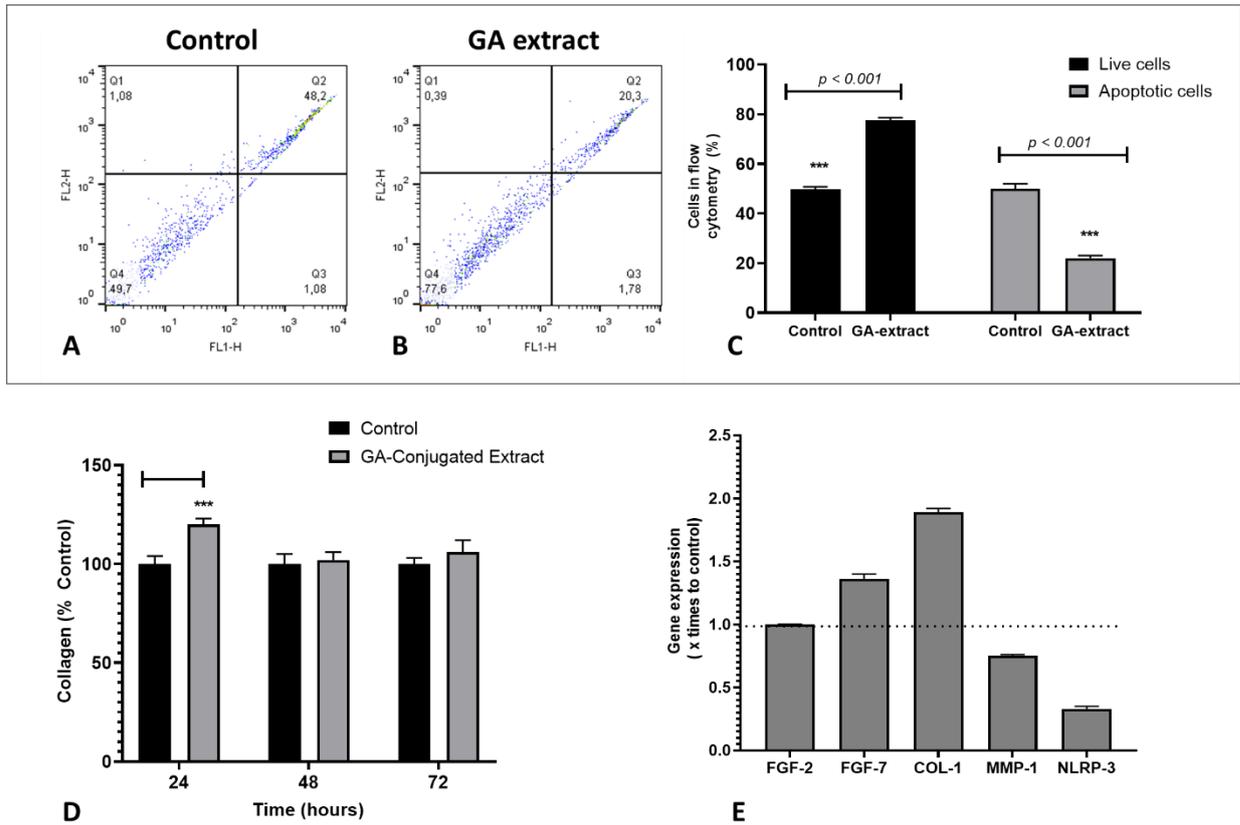


Figure 4- The *in vitro* modulatory effects of GA-conjugated extract at 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  concentration on HFF-1 human dermal by evaluation of apoptosis rate, collagen quantification (D) and expression of genes related to wound healing processes. (A,B) representative flow cytometry of cell cultures in the apoptosis analysis with and without extract supplementation; (C) Comparison of dead and lived cells frequency between cultures extract supplemented and control by Student T test. Data are presented as relative percentage of control; (D) Collagen concentration in fibroblasts 24, 48 and 72h cell cultures compared by One-way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test. Data are presented as relative percentage of control. Different letters indicated significant differences at  $p \leq 0.05$  (E) Gene expression: values are normalized by Beta-actin 1 gene and represent their value expressed in relation to the control with reference value 1 (dashed line in the graph).

The second group of experiments involved *in vivo* analyses using *E. fetida* as an experimental model in which the last three segments of the tail were surgically removed and treated topically with GA extract. We concomitantly analyzed the results of macroscopic and microscopic observations, as summarized in Figures 5 and 6.

In comparisons between the regeneration processes in controls and earthworms topically treated with GA extract, the following events were considered. Macroscopically, immediately after tail amputation, it was possible to visualize the intestines, which had a brownish color

(Figures 5A, 5B). Soon after, there was a large production of mucus at the wound site (Figure 5E), followed by wound retraction and cell proliferation initially in a longitudinal direction, forming a more elongated structure covered by whitish tissue (Figure 5F). Afterwards, this tissue darkened, and the three cut segments could be visualized again (Figure 5M).

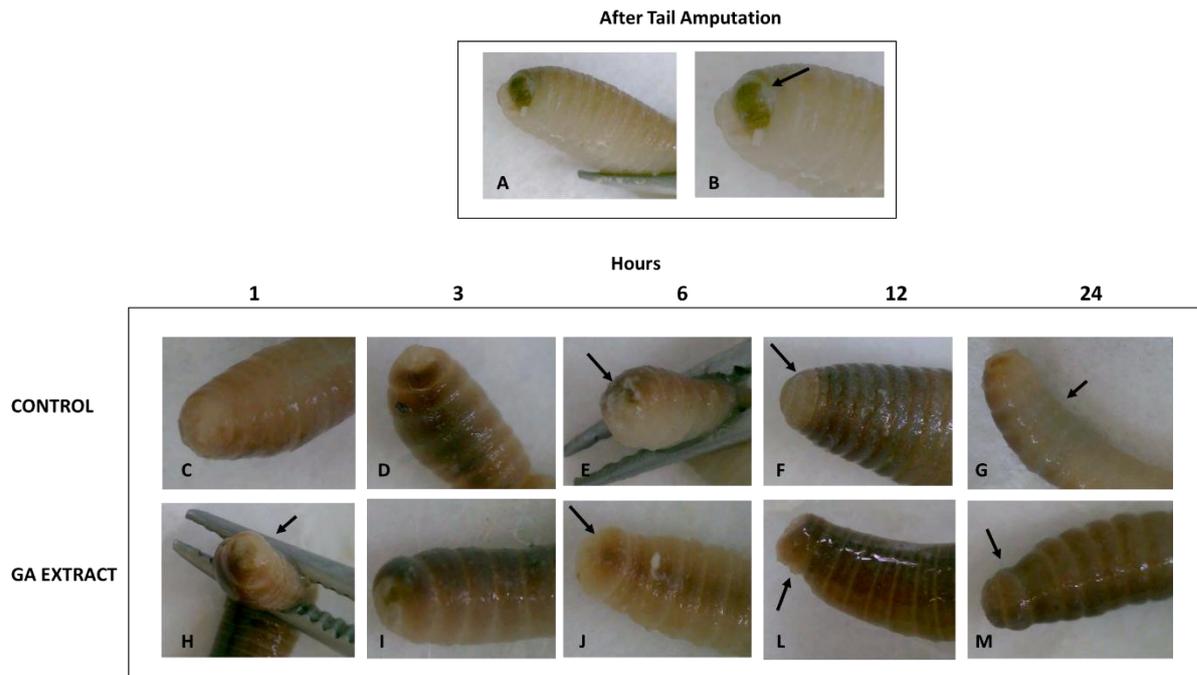


Figure 5- Representative photographs of the surgical incision in the anterior segments of *Eisenia fetida* earthworms topically treated with GA-conjugated extract at  $5 \mu\text{g} / \text{mL}$  concentration. Soon after the incision, the wound received a single topical dose of 2 ul of phosphate buffer (control) or extract solution. The earthworms were then kept in Petri dishes and the regeneration process was evaluated in different periods of time. (A,B) Right after the incision it is possible to observe the worm's intestinal tube (in yellowish-brown color indicated by the arrow); (C,H) One hour after cutting, the entire region was covered with mucus and seems to be more contracted in earthworms that received the extract treatment than in controls; (D,I) Three hours after cutting the contraction of the wound is already well established and it is possible to see new transparent tissue starting to form. At some point the wound is still open. Six hours after cutting the wound still has open parts in the control worms (E, arrow) and is completely closed with new tissue in the worm topically treated with the extract (J, arrow); 12 hours after the incision, the wound of the control worms is completely regenerated with new whitish tissue (F, arrow). In earthworms treated with the extract, the regenerated area is already pigmenting and differentiating into the segments that have been cut (L, arrow). 24 h after the incision, the entire area was regenerated. However, pigmentation in the ventral region, which is slower than the dorsal region, has not yet occurred in the control earthworms (G, arrow), while in those treated topically with the extract, pigmentation is practically complete both in the dorsal region and in the ventral region of the animal's body (M, arrow).

In histophysiological terms, it is important to highlight that in the posterior terminal region, the structure of the tissues of the earthworm body wall is very similar to that of other sites. The body wall tissue is superficially composed of a pseudostratified epithelial layer interspersed with mucous cells, which secrete a layer of chitin containing collagen and a basal lamina that is held together with the adjacent circular muscular layer. Below the circular muscle layer is a thick layer of longitudinal muscle cells with a cytohistological pattern resembling that of vertebrate smooth muscle (Figure 6A). Although earthworms have complete circulation, they do not have red cells, and hemoglobin is directly dissolved in the hemolymph.

Immediately after cutting, the terminal part of the intestines was exposed, followed by rapid tissue contraction and mucus production (Figures 5B, 6C). This process was visualized 1 h after tail amputation and was more rapid in GA extract-treated earthworms than in controls (Figures 5C, 5H, Figure 6F,6L). The earthworm does not have well-established connective tissue, but circular muscle cells secrete a network of collagen that supports this tissue (Figure 6A). When an injury occurs, hemoleucocytes present in the fluid coelom and circular muscle cells migrate rapidly to the injury site. Therefore, these latter cells operate as fibroblast-like cells, migrating to the local incision (Figures 6C, 6D). At this point, re-epithelialization and production of the collagen network in the circular muscle layer begins. Concomitantly, the longitudinal muscle layer also proliferated (Figure 6E). The final stage of regeneration was observed when the three segments were darkened in both the dorsal and ventral regions and could be visually identified. As tail clipping involves only three segments, a large part of this regenerative process takes place within the first 24 h after incision.

Comparison of this process in the two groups of earthworms showed an acceleration of the relevant differences between the two treatments. In control earthworms, the process of migration and wound closure with these cells occurred up to 6 h after cutting (Figures 6G, 6H). However, in earthworms topically treated with GA extract, 3 h after the cut, the wound was

almost completely closed, and at 6 h, it was already possible to observe the formation of multiple layers at the incision site (Figures 6M, 6N). This process can also be visually observed, as shown in Figures 5E and 5J.

Twenty-four h after the tail incision in earthworms treated with GA-extract, complete and darkened segmentation was observed in the ventral and dorsal regions, whereas in control earthworms, this process was more advanced only in the dorsal region (Figures 5G, 5M). Histological analysis also confirmed that regeneration of the three segments was in the process of completion in earthworms treated with GA extract (Figure 6J, 6P). These results indicated that, on average, the regeneration rate was 6-12 h faster in earthworms treated with GA extract than in control animals.

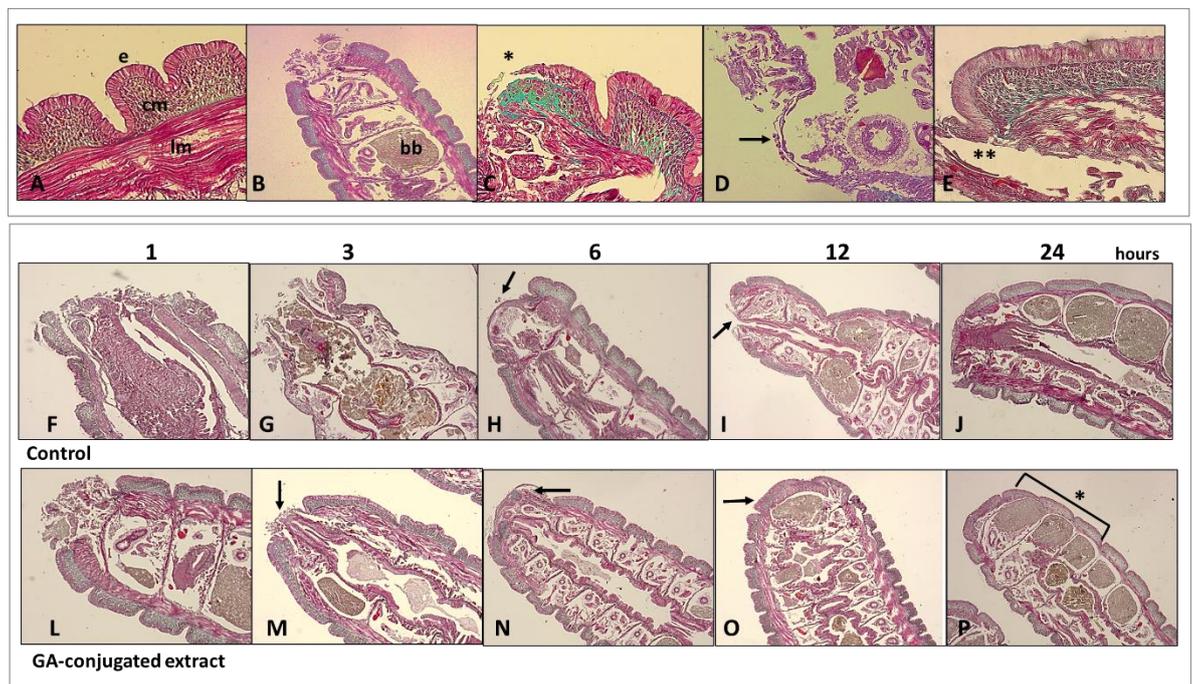


Figure 6- Representative histological analysis of *Eisenia fetida* earthworms submitted to posterior surgical incision of three last segments with and without topic treatment using GA-conjugated extract at 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  concentration. The slides were stained with Masson-Goldner Trichrome kit that is used for visualization of muscles, collagen fibers, connective tissues and keratin. (A) Body wall histology showing the (e) epidermic layer that is directly connected with circular muscle layer (cm) immersed in a extracellular matrix richest in collagen. Immediately afterwards, there is the longitudinal muscular layer (lm) that is covered with the peritoneum that delimits the earthworm's coelomic cavity; (B) posterior segments (metameres) showing the region of the surgical incision. In this place there are spaces full of brown bodies (bb), which

are structures that contain immune cells (cellomyocytes) that trapped and destroyed pathogens or linked to impurities and underwent melanization. When these cavities are completely filled, the worm performs autotomy to free them and then regenerates the posterior region; (C,D) detail of the incision site showing migration (\*) of circular muscle cells migrating to initially close the wound. These cells behave similarly to human fibroblasts when skin damage occurs; (E) only after migration and onset of proliferation of the smooth muscle layer does epidermis proliferation occur; (F-J) sequence of healing processes in control earthworms at 1.3, 6, 12 and 24 hours. After this period, the region is in the final stage of regeneration of the incised segments. (L-P) sequence of healing processes in earthworms topically treated with GA-conjugated extract showing acceleration in regenerative processes in relation to control. After 24 hours the segments are fully regenerated (P,\*).

#### 4. Discussion

Based on previous evidence, the effects of a GA-conjugated extract prepared from roasted guarana seed and fresh seeds of açai berries on wound healing models were tested. The results showed that GA extract did not present cytotoxic or extensive proliferative effects on human keratinocytes and fibroblast cells in culture, showing potential antioxidant and genoprotective capacities that are relevant properties in healing or in regenerative substances of the integument. In both fibroblasts and earthworms, GA extract increased healing speed, with no cytohistological abnormalities observed during the process. Analysis of possible causal mechanisms associated with the effects of GA extract on human fibroblasts revealed antioxidant and geno-modulatory activities related to the healing process.

These results will be discussed in greater detail below, starting with the chemical matrix of the GA conjugate extract identified by ESI-ToF-MS. The GA-conjugated extract was produced by mixing roasted guarana powder seeds with fresh pulped açai seeds. The presence of caffeine is expected in guarana extracts, as this plant has high concentrations of this alkaloid (Schilimpl et al., 2013). The identification of polyphenols such as gallic acid, catechin, EGCG, and quercetin could also be anticipated, as many studies have described the presence of these molecules in guarana extracts, as well as in açai (Bittencourt et al., 2013; Machado et al., 2016;

Roggia et al., 2020). In a study conducted by Xie et al. (2012), the authors described the presence of four flavones, luteolin and velutin, in açai.

Diosmetin, whose precursor was detected in the chemical matrix of the GA-conjugated extract, is also a flavone chemically close to luteolin. Therefore, it is possible that this molecule derives from the extraction of fresh açai seeds. All of these known molecules have antioxidant and anti-inflammatory activities, as described in the literature (Bai et al., 2021; Bernatoniene and Kopustinskiene, 2018; De Araujo, de Paulo Farias, Neri-Numa, and Pastore, 2021; Herman and Herman, 2013; Zahrani, El-Shishtawy, and Asiri, 2020). Some of these molecules appear to have healing properties, including EGCG (Lin et al., 2016) and gallic acid (Khan et al., 2018). In addition, gallic acid, EGCG, and caffeine seem to act against complications related to healing processes, such as keloid formation (Alishahedan et al., 2021; Syed, Bagabir, Paus, and Bayat, 2013; Wang, Liu, Ruan, Yang, and Gao, 2018).

Three other less-investigated polyphenols were also detected in the extract: the flavone diomestine, found in legumes such as *Acacia farnesiana*, and in the leaves of *Olea europaea* (Spanakis, Kamas, and Niopas, 2009), Torachryson, a molecule belonging to the group of naphthaquinones, molecules widely distributed in plants. Previous studies have described the antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties of these polyphenols (Aminin and Polonik, 2020; Chan et al., 2013; Chandler et al., 2010; Liao et al., 2014; Tasneem, Liu, Li, Choudhary, and Wang, 2019). In addition to these polyphenols, a macrocyclic peptide was identified, oscillacyclamide A, for which there are practically no studies regarding its biological properties. Even so, as highlighted by Alexandru-Crivac et al. (2017), these peptides show great promise as therapeutics because they have increased target binding affinity and selectivity, are more stable against proteolytic enzymes, and often have higher membrane permeability than their linear counterparts. Therefore, this information indicates that the chemical matrix of the GA conjugate extract contains bioactive elements that contribute to their antioxidant and anti-

inflammatory properties, and to modulation of the expression of relevant genes in healing processes.

Plant extracts often have relevant therapeutic properties, but their use is restricted because of the toxicity associated with them. For this reason, we initially evaluated the potential cytotoxic and cell proliferative effects of GA-conjugated extract using keratinocytes and fibroblasts that are in direct contact when topically applied. Although there is some level of variation between the results obtained from the three different assays employed here (MTT, neutral red, and ATP), the set of results did not reveal any relevant toxic effects. These results are in accord with those of previous studies that did not indicate toxicity associated with the supplementation of cell cultures with guarana or açai extracts (Bittencourt et al., 2013; Maldaner et al., 2020).

Two tests were conducted to determine the biological capacity of the extracts. The first evaluation of the scavenging power of the DPHH radical by the GA-conjugated extract showed that it has a relevant antioxidant capacity. The presence of GA extract decreased DNA breakage rates, indicating its genoprotective activity. These results allowed the choice of the GA extract concentration to be 5 µg/mL, which was later used in complementary tests *in vitro* with fibroblasts and *in vivo* with earthworms.

The results showed that, in both fibroblasts and earthworms, GA extract induced a greater speed in the wound healing process. Macroscopic and histological analyses of surgical incisions of earthworm tails revealed accelerated healing processes, corroborating the results observed in human fibroblasts. We highlight here that the use of earthworms as an experimental model for regeneration studies has been gaining popularity for a number of reasons. First, earthworms have long been used in ecotoxicity studies to assess soil quality in relation to environmental pollutants. This more primitive organism also has great regenerative capacity while having some cytofunctional elements that have certain similarities to the human immune

system (Alves et al., 2019). Furthermore, earthworm husbandry involves low maintenance cost and incurs fewer ethical problems than the use of vertebrates in experiments involving surgical incision. Although the data using earthworms provided evidence of the role of GA extract in wound healing in *Eisenia fetida*, analyses of potential causal mechanisms were performed only in fibroblasts. This is because *Eisenia fetida* is still a relatively new model in studies of regeneration involving environmental variables, such as plant extracts. Consequently, it will be necessary to establish future analyses of biochemical and molecular markers related to the role of inflammation in healing and other metabolic pathways.

Therefore, the potential effect of GA extracts on oxidative metabolism was investigated in fibroblasts. The results showed a generalized antioxidant effect when the levels of total ROS were evaluated. These values remained lower than in control cells at all time points analyzed. The lipoperoxidation rate was also lower in 6 h fibroblast cultures subjected to the scratch assay. Two other oxidative markers that are directly associated with inflammatory responses (superoxide and NO) were also analyzed. The results showed a decrease in the levels of these two oxidative molecules in 3 h cultures. Thereafter, superoxide and NO levels remained similar to those in control cells. In addition, scratched cultures supplemented with GA extract exhibited lower apoptosis rates than controls.

Previous investigations, such as the study performed by Dai, Chen, and Chai (2019) showed that, in the presence of pro-senescence molecules such as advanced glycation end products (AGEs), dermal fibroblasts are induced to undergo apoptosis, presenting an increase in ROS and overexpression of the *NLRP3* gene, which is directly associated with inflammasome formation. Although this study did not expose dermal fibroblasts to molecules such as AGEs, supplementation of cultures with GA extract showed the opposite effect. That is, 24 h cultures exposed to GA extract showed lower levels of ROS and downregulation of the proinflammatory gene *NLRP3*. It is possible that the peak oxidative stress and proinflammatory responses caused

by scratching decreased in cultures treated with GA extract. This is because there is evidence that the triggering of initial oxy-inflammatory processes is relevant for wound healing to occur (Ito et al., 2017).

Other relevant results concern the induction of greater collagen formation, *Col-1* gene overexpression, and faster scratch closure in fibroblast cultures and those supplemented with GA extract. Moreover, differential modulation of other genes related to tissue regeneration and dermal function was observed in fibroblast cultures supplemented with GA extracts. This is the case with *FGF7* overexpression in fibroblast GA extract supplements, which is considered a relevant gene for organogenesis and mediation of wound healing in mammals (Zinkle and Mohammadi, 2019). In addition to downregulated *NRPL3* expression, this result was also observed for *MMP1*. Collagenases, such as MMP-1 play a major role in the healing process. When a physical lesion occurs, generating a wound, MMP-1 is activated assisting the healing process by elimination of damaged proteins, destroying the provisional extracellular matrix, facilitating fibroblast migration, and remodulation of granulation tissue (Keskin, Keskin, Öztürk, and Çakan, 2021). Again, it is possible that the low expression of *MMP1* observed in 24 h cell cultures may be related to the fact that the GA extract accelerated the wound healing process compared to control cultures.

## **Conclusions**

Since *in vitro* assays have some limitations in assessing the properties of certain extracts or drugs, the results described here from fibroblast cell culture were corroborated by *in vivo* assays involving *E. fetida*. In summary, despite limitations related to *in vitro* and *in vivo* studies, the results obtained from this translational investigation suggest that GA extract has a potential therapeutic effect on the healing of acute wounds, such as those that occur during surgical interventions.

### Declaration of Competing Interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

### Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Apoio a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), by project protocol number 38133.UNI699.56949.07052018; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We appreciate the contributions of laboratory technicians Marina de Souza Vencato and Bruno Tomazele Rovani.

### References

- Arthur, T. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Bosilevac, J. M., Nou, X., & Koohmaraie, M. (2005). Effects of Low-dose, low-penetration electron beam irradiation of chilled beef carcass surface cuts on *Escherichia coli* O157:H7 and Meat Quality. *Journal of Food Protection*, 68(4), 666–672. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.4.666>
- Al Zahrani, N. A., El-Shishtawy, R. M., and Asiri, A. M. (2020). Recent developments of Gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 204, 112609. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112609>
- Alexandru-Crivac, C. N., Umeobika, C., Leikoski, N., Jokela, J., Rickaby, K. A., Grilo, A. M., ... Houssen, W. E. (2017). Cyclic peptide production using a macrocyclase with enhanced substrate promiscuity and relaxed recognition determinants. *Chemical Communications*, 53(77), 10656–10659. <https://doi.org/10.1039/c7cc05913b>
- Algarve, T. D., Assmann, C. E., Cadoná, F. C., Machado, A. K., Manica-Cattani, M. F., ... da Cruz, I. B. M. (2019). Guarana improves behavior and inflammatory alterations triggered by methylmercury exposure: An in vivo fruit fly and in vitro neural cells study. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(15), 15069–15083. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04881-0>
- Alminderej, F., Bakari, S., Almundarij, T. I., Snoussi, M., Aouadi, K., and Kadri, A. (2021). Antimicrobial and Wound Healing Potential of a New Chemotype from *Piper cubeba* L. Essential Oil and in silico Study on *S. aureus* tyrosyl-tRNA Synthetase Protein. *Plants*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/plants10020205205>
- Alves, A. O., Weis, G. C. C., Unfer, T. C., Assmann, C. E., Barbisan, F., Azzolin, V. F. (2019). Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells. *Food and Chemical Toxicology*, 134, 110809. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110809>

Aminin, D., and Polonik, S. (2020). 1,4-Naphthoquinones: Some biological properties and application. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 68(1), 46–57.

<https://doi.org/10.1248/cpb.c19-00911>

Bai, J., Zhang, Y., Tang, C., Hou, Y., Ai, X., Chen, X., . . . Meng, X. (2021). Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 133, 110985.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110985>

Barchitta, M., Maugeri, A., Favara, G., Magnano San Lio, R., Evola, G., Agodi, A., and Basile, G. (2019). Nutrition and wound healing: An overview focusing on the beneficial effects of curcumin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1119.

<https://doi.org/10.3390/ijms20051119>

Benatrehina, P. A., Pan, L., Naman, C. B., Li, J., and Kinghorn, A. D. (2018). Usage, biological activity, and safety of selected botanical dietary supplements consumed in the United States. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(2), 267–277.

<https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2018.01.006>

Bernatoniene, J., and Kopustinskiene, D. M. (2018). The Role of Catechins in cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules*, 23(4), 965.

<https://doi.org/10.3390/molecules23040965>

Bittencourt, L. S., Machado, D. C., Machado, M. M., Dos Santos, G. F., Algarve, T. D., Marinowic, D. R., . . . Cruz, I. B. (2013). The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.041>

Borges, G. Á., Elias, S. T., da Silva, S. M., Magalhães, P. O., Macedo, S. B., Ribeiro, A. P., and Guerra, E. N. (2017). *In vitro* evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 45(3), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.01.005>

Cadoná, F. C., Cattanni, M. F. M. R., Machado, A. K., Oliveira, R. M., Flores, E. R. S., Assmann, C. E., . . . Cruz, I. B. M. (2014). Genomodifier capacity assay: A non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. *Analytical methods (print)*, v, 20, p. 1/c4ay01709a-11.

<https://doi.org/10.1039/C4AY01709A>

Chan, B. C., Ip, M., Gong, H., Lui, S. L., See, R. H., Jolivald, C., . . . Lau, C. B. (2013). Synergistic effects of diosmetin with erythromycin against ABC transporter over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) RN4220/pUL5054 and inhibition of MRSA pyruvate kinase'. *Phytomedicine*, 20(7), 611–614.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.007>

Chandler, D., Woldu, A., Rahmadi, A., Shanmugam, K., Steiner, N., Wright, E., . . . Münch, G. (2010). Effects of plant-derived polyphenols on TNF-alpha and nitric oxide production induced by advanced glycation endproducts. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(Suppl. 2), S141–S150. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900504>

- Chang, S. K., Alasalvar, C., and Shahidi, F. (2019). Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects - A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(10), 1580–1604. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1422111>
- Choi, W. S., Shin, P. G., Lee, J. H., and Kim, G. D. (2012). The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophage cells *Cellular Immunology*, 280(2), 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.007>
- Dai, J., Chen, H., and Chai, Y. (2019). Advanced glycation End Products (AGEs) Induce Apoptosis of Fibroblasts by Activation of NLRP3 inflammasome via reactive oxygen species (ROS) Signaling Pathway. *Medical Science Monitor*, 25, 7499–7508. <https://doi.org/10.12659/MSM.915806>
- de Almeida Magalhães, T. S. S., de Oliveira Macedo, P. C., Converti, A., and Neves de Lima, Á. A. (2020). The Use of *Euterpe oleracea* Mart. As a New Perspective for Disease Treatment and Prevention. *Biomolecules*, 10(6), 813. <https://doi.org/10.3390/biom10060813>
- de Araújo, F. F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., and Pastore, G. M. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338, 127535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535>
- de Souza, D. V., Pappis, L., Bandeira, T. T., Sangoi, G. G., Fontana, T., Rissi, V. B., . . . Machado, A. K. (2020 November 10). Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) presents anti-neuroinflammatory capacity in LPS-activated microglia cells. *Nutritional Neuroscience*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1842044>
- Halliwell, B., and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Harris, C. L., Kuhnke, J., Haley, J., Cross, K., Somayaji, R., Dubois, J. et al. (2017). Best practice recommendations for the prevention and management of surgical wound complications. In *Foundations of best practice for skin and wound management*. A supplement of Wound Care Canada. <https://www.woundscanada.ca/docman/public/health-care-professional/bpr-workshop/555-bpr-prevention-and-management-of-surgical-wound-complications-v2/file>.
- Herman, A., and Herman, A. P. (2013). Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. *Skin Pharmacology and Physiology*, 26(1), 8–14. <https://doi.org/10.1159/000343174>
- Ito, H., Kanbe, A., Sakai, H., and Seishima, M. (2018) Activation of NLRP3 signalling accelerates skin wound healing. *Experimental Dermatology*, 27(1), 80–86. <https://doi.org/10.1111/exd.13441>
- Jentzsch, A. M., Bachmann, H., Fürst, P., and Biesalski, H. K. (1996). Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(2), 251–256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8)

- Keskin, E. S., Keskin, E. R., Öztürk, M. B., and Çakan, D. (2021). The effect of MMP-1 on wound healing and scar formation. *Aesthetic Plastic Surgery*. <https://doi.org/10.1007/s00266-021-02369-2>
- Khan, B. A., Mahmood, T., Mena, F., Shahzad, Y., Yousaf, A. M., Hussain, T., and Ray, S. D. (2018). New Perspectives on the Efficacy of Gallic Acid in Cosmetics and Nanocosmeceuticals. *Current Pharmaceutical Design*, 24(43), 5181–5187. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190118150614>
- Khedir, S. B., Bardaa, S., Chabchoub, N., Moalla, D., Sahnoun, Z., and Rebai, T. (2017). He healing effect of Pistacia lentiscus fruit oil on laser burn. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1407–1414. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1233569>
- Liao, W., Ning, Z., Chen, L., Wei, Q., Yuan, E., Yang, J., and Ren, J. (2014). Intracellular antioxidant detoxifying effects of diosmetin on 2, 2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress through inhibition of reactive oxygen species generation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(34), 8648–8654. <https://doi.org/10.1021/jf502359x>
- Lin, Y. H., Lin, J. H., Li, T. S., Wang, S. H., Yao, C. H., Chung, W. Y., and Ko, T. H. (2016). Dressing with epigallocatechin gallate nanoparticles for wound regeneration. *Wound Repair and Regeneration*, 24(2), 287–301. <https://doi.org/10.1111/wrr.12372>
- Lourenço, A. R., and Coffey, P. J. (2017). SOX4: Joining the Master Regulators of Epithelial-to-Mesenchymal Transition? *Trends in Cancer*, 3(8), 571–582. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.06.002>
- Machado, A. K., Andrezza, A. C., da Silva, T. M., Boligon, A. A., do Nascimento, V., Scola, G., . . . da Cruz, I. B. (2016). Neuroprotective Effects of Acai (Euterpe oleracea Mart.) against rotenone in vitro Exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 8940850. <https://doi.org/10.1155/2016/8940850>
- Machado, A. K., Cadoná, F. C., Azzolin, V. F., Dornelles, E. B., Barbisan, F., . . . da Cruz, I. B. M. (2015). Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. *Food Research International*, 67, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.056>
- de Oliveira, D.M., Barreto, G., Galeano, P., Romero, J.I., Holubiec, M.I., Badorrey, M.S., Capani, F., Alvarez, L.D.G. (2011). *Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis* protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against rotenone-induced cytotoxicity. *Human & Experimental Toxicology*, 30(9):1382-91. <https://doi.org/10.1177/0960327110389837>
- Maldaner, D. R., Pellenz, N. L., Barbisan, F., Azzolin, V. F., Mastella, M. H., Teixeira, C. F. Da Cruz IBM, Duarte MMMF. Interaction between low-level laser therapy and Guarana (*Paullinia cupana*) extract induces antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects and promotes proliferation in dermal fibroblasts. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(3), 629–637. <https://doi.org/10.1111/jocd.13055>

- Montrief, T., Bornstein, K., Ramzy, M., Koyfman, A., and Long, B. J. (2020). Plastic surgery complications: A review for emergency clinicians. *Western Journal of Emergency Medicine*, 21(6), 179–189. <https://doi.org/10.5811/westjem.2020.6.46415>
- Morabito, G., Trombetta, D., Singh Brajendra, K., Prasad Ashok, K., Parmar Virinder, S., Naccari, C., . . . Saso, L. (2010). Antioxidant properties of 4-methylcoumarins in in vitro cell-free systems. *Biochimie*, 92(9), 1101–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.04.017>
- Ojeh, N., Stojadinovic, O., Pastar, I., Sawaya, A., Yin, N., and Tomic-Canic, M. (2016). The effects of caffeine on wound healing. *International Wound Journal*, 13(5), 605–613. <https://doi.org/10.1111/iwj.12327>
- Orlowski, P., Zmigrodzka, M., Tomaszewska, E., Ranoszek-Soliwoda, K., Pajak, B., Slonska, A., . . . Krzyzowska, M. (2020). Polyphenol-conjugated bimetallic Au@AgNPs for improved Wound healing. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 4969–4990. <https://doi.org/10.2147/IJN.S252027>
- Repetto, G., del Peso, A., and Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Roggia, I., Dalcin, A. J. F., de Souza, D., Machado, A. K., de Souza, D. V., . . . Gomes, P. (2020). Guarana: Stability-Indicating RP-HPLC method and safety profile using microglial cells. *Journal of Food Composition and Analysis*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103629>
- Santos, I. B., de Bem, G. F., da Costa, C. A., de Carvalho, L. C. R. M., de Medeiros, A. F., Silva, D. L. B., . . . Resende, A. C. (2020). Acai seed extract prevents the renin-angiotensin system activation, oxidative stress and inflammation in white adipose tissue of high-fat diet-fed mice. *Nutrition Research*, 79, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.05.006>
- Schimpl, F. C., da Silva, J. F., Gonçalves, J. F., and Mazzafera, P. (2013 October 28). Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(1), 14–31. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.023>
- Souza-Monteiro, J. R., Arrifano, G. P. F., Queiroz, A. I. D. G., Mello, B. S. F., Custódio, C. S., Macêdo, D. S., . . . Crespo-López, M. E. (2019). Antidepressant and Antiaging Effects of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 3614960. <https://doi.org/10.1155/2019/3614960>
- Spanakis, M., Kamas, S., and Niopas, I. (2009). Simultaneous determination of the flavonoid aglycones diosmetin and hesperetin in human plasma and urine by a validated GC/MS method: In vivo metabolic reduction of diosmetin to hesperetin. *Biomedical Chromatography*, 23(2), 124–131. <https://doi.org/10.1002/bmc.1092>
- Syed, F., Bagabir, R. A., Paus, R., and Bayat, A. (2013 August). Ex vivo evaluation of antifibrotic compounds in skin scarring: EGCG and silencing of PAI-1 independently inhibit growth and induce keloid shrinkage. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 93(8), 946–960. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.82>

- Tasneem, S., Liu, B., Li, B., Choudhary, M. I., and Wang, W. (2019). Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. *Pharmacological Research*, *139*, 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.001>
- Ud-Din, S., Foden, P., Mazhari, M., Al-Habba, S., Baguneid, M., Bulfone-Paus, S., . . . Bayat, A. (2019 August). A Double-Blind, Randomized Trial Shows the Role of Zonal Priming and Direct Topical Application of Epigallocatechin-3-Gallate in the Modulation of Cutaneous Scarring in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, *139*(8), 1680–1690.e16. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.01.030>
- Wang, X., Liu, K., Ruan, M., Yang, J., and Gao, Z. (2018 November 1). Gallic acid inhibits fibroblast growth and migration in keloids through the AKT/ERK signaling pathway. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *50*(11), 1114–1120. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmy115>
- Xie, C., Kang, J., Li, Z., Schauss, A. G., Badger, T. M., Nagarajan, S., . . . Wu, X. (2012 September). The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: Blockade of LPS-mediated TNF- $\alpha$  and IL-6 production through inhibiting NF- $\kappa$ B activation and MAPK pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *23*(9), 1184–1191. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.06.013>
- Zinkle, A., and Mohammadi, M. (2019 February 12). Structural Biology of the FGF7 Subfamily. *Frontiers in Genetics*, *10*, 102. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00102>

## 6 CONCLUSÃO

Apesar das limitações metodológicas inerentes a trabalhos *in vitro* e com modelos animais como a *Eisenia fetida*, nossos resultados são relevantes e incluem >:

- O formulado desenvolvido a base de semente de guarana e de açaí apresentou uma alta concentração de moléculas bioativas, inclusive, moléculas que ainda não tinham sido descritas em extratos isolados de guarana e açaí, ainda capacidade genoprotetora e antioxidante;
- O formulado desenvolvido e testado apresentou em células de linhagem commercial atividade na modulação pró-regeneração relacionada a marcadores oxidativos, apoptóticos e fatores de crescimento;
- No modelo de regeneração *in vivo* (minhocas), houve modulação da expressão de genes associados à regeneração bem como forte modulação nos marcadores de regeneração visualizados através de análises histológicas que mostram uma aceleração do processo cicatricial em feridas de minhocas tratadas com o extrato desenvolvido;

Em resumo, os resultados obtidos nesta investigação translacional sugerem que o extrato de GA tem um potencial efeito terapêutico na cicatrização de feridas agudas, como aquelas que ocorrem durante intervenções cirúrgicas, provavelmente via modulação da rota oxidativa, inflamatória e pelo seu efeito pró- colágeno. Mais estudos precisam ser realizados para a disponibilização de um produto pró-reparo a ser disponibilizado a população em geral, tal produto traria benefício inclusive para a cadeia produtiva do açaí e do guaraná e obviamente a população, pois este pode ser uma opção de baixo custo e alto poder pró-reparo.

## REFERÊNCIAS

- BALDEZ, R.N.; MALAFAIA, O.; CZESCKO, N.G.; MARTINS, N.L.P.; FERREIRA, L.M., RIBAS, C.A.P.M., SALLES, J.R.G, DEL CLARO, R.P. SANTOS LOM, GRAÇA NETO L.; ARAÚJO, L.R.R. Análise da cicatrização do colon com uso do extrato aquoso da *Orbignya phalerata* (babaçu) em ratos. **Acta Cir Brasil**. 21 (suplem 2), p. 31-38, 2006.
- BARBISAN, F. et al. Methotrexate-Related Response on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells May Be Modulated by the Ala16Val-SOD2 Gene Polymorphism. **Plos One**, 2014.
- BARBOSA, F. S. **Modelo de impedância de ordem fracional para a resposta inflamatória cutânea**. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Biomédia). Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.
- BARCELLOS, O.S. et al. Avaliação Bioquímica e toxicológica do extrato dos frutos de *Euterpe oleracea* Martius (AÇAÍ). **Revista de Ciências da Saúde**. v.12, n.2, p. 91-96, 2010.
- BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v.230, n.3, p.257-262, 2012.
- BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p.679-688, 2009.
- BEZERRA, J.A.F.; CAMPOS, A.C.L.; VASCONCELOS, P.R.L.; NICARETA, J.R.; RIBEIRO, G.R.; SEBASTIÃO, A.P.M.; URDIALES, A.I.A.; MOREIRA, M.; BORGES, A.M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cir Bras**, v. 21, supl 3, p. 16-25, 2006.
- BITTENCOURT, L. S. et al. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food Chemical Toxicology**. v.53, p. 119-125, 2013.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v.117, 2006.
- CADONÁ, F. C. **Desenvolvimento de um método de análise in vitro da capacidade genomodificadora de compostos químicos e sintéticos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.
- CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA, Jr. J.M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. v. 78, p.98-106, 2008.
- COELHO, J. M. et al. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, v. 37, n. 1, p. 45-51, 2010.
- DELAVARY, B.M. et al. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**. v.216, p.753-762, 2011.

DI PIETRO, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. **Shock**, v. 4, p. 233-240, 1995.

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

ESPOSTI, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**. v. 26, p. 335-340, 2002.

FELIN, I.P.D.F.; FELIN, C.R. **Patologia Geral em Mapas Conceituais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

FERREIRA, C.M.; D'ASSUMPÇÃO, E. A. Cicatrizes hipertróficas e queloides: *Hypertrophic scars and keloids*. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.21, n.1, 2006.

FUKUI, M.; YAMABE, N.; ZHU, B. T. Resveratrol Attenuates the Anticancer Efficacy of Paclitaxel in Human Breast Cancer Cells In Vitro and In Vivo. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 10, p. 1882-1891, 2010.

GAMBA, M.A.; PETRI, V.; COSTA, M.A.F. **Lesões, prevenção causas e tratamento**. São Paulo: Santos / Grupo Gen, 2016.

GOMES, C.S.; CAMPOS, A.C.L.; TORRES, O.J.M.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, A.T.R.; TENÓRIO, S.B.; TÂMBARA, E.M.; SAKATA, K.; MORAES, J.R.H.; FERRER, A.L.S. Efeito do extrato de *Passiflora Edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cir Brasil**, v. 21, supl 2, p. 9-16, 2006.

GUILHERMINO, J. F. et al. Desafios e complexidade para inovação a partir da biodiversidade brasileira. **Revista de Pesquisa Inovação Farmacêutica**, v. 4, n.1, p. 18-30, 2012.

GUIMARÃES, L. C. et al. Estudo prospectivo de produtos e processos tecnológicos com o açaí (*Euterpe oleracea*). **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 10, n. 2, p.215-225, abril 2017.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue. I. Quantitative study of the vascular volume. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v.1, p.6-8, 1987.

HAYTA, S.; POLAT, R.; SELVI, S. Traditional uses of medicinal plants in Elazığ (Turkey). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n.1, p. 613-623, 2014.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, p. 231-255, 2004.

HOCHMAN, B. et al., Distribuição de queuloide e cicatriz hipertrófica segundo fototipos de pele de Fitzpatrick. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, n.2, p.185-189, 2012.

HO, J. et al. Current Advancements and Strategies in Tissue Engineering for Wound Healing: A Comprehensive Review. **Adv Wound Care (New Rochelle)**. v.6, n.6, p.191-209, 2017.

- HOWELL, E. G. M. et al. FT-Raman spectroscopic studies of guaraná and some extracts. **Analytica Chimica Acta**. v. 532, p. 177-186, 2005.
- JENTZSCH, A.M. et al. Improved analysis human of malondialdehyde in body fluids. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 20, n. 2, p. 251-256, 1996.
- JOYCE, C.W. et al. Scar Wars: Preferences in Breast Surgery. **Archives of Plastic Surgery**, v.42, n.5, p.596-600, 2015.
- KANG, M.H. et al. Skin Wound Healing Effects and Action Mechanism of Açai Berry Water Extracts. **Toxicological Research**. v.33, n.2, p.149-156, 2017.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robbins & Cotran Patología: Bases Patológicas das Doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- KREWER, C.C. et al. Guaraná, a supplement rich in caffeine and catechin modulates cytokines: Evidence from human *in vitro* and *in vivo* protocols. **European Food Research and Technology**. v.239, p.49-57, 2014.
- LEVINE, R.L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. v.233, p.346-357, 1994.
- LIANG, C.C.; PARK, A.Y.; GUAN, J.L. *In vitro scratch assay*: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nat Protoc**, v. 2, n.2, p.329-333, 2007.
- LOURENÇO, A.R.; COFFER, P.J. SOX4: Joining the Master Regulators of Epithelial-to-Mesenchymal Transition? **Trends Cancer**. v. 3, n.8, p. 571-582, 2017.
- MACHADO, A.K. et al. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. **Food Research International**. v.67 p. 426-433, 2015.
- MADDEN JW, PEACOCK EE., Jr. Studies on the biology of collagen during wound healing. I. Rate of collagen synthesis and deposition in cutaneous wounds of the rat. **Surgery**. v.64, 1968.
- MALDANER, D. R. et al. *In vitro* effect of low-level laser therapy on the proliferative, apoptosis modulation, and oxi-inflammatory markers of premature-senescent hydrogen peroxide-induced dermal fibroblasts. **Lasers Medical Science**, 2019.
- MINUTTI, C.M. et al. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.61, p.3-11, 2017.
- MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. **PNAS**. v. 85, n.13, p.4894-4897, 1988.
- MOORE, K.L.; DALLEY, A.F.; AGUR, A.M.R. **Anatomia orientada para clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

- NUNES, D.S. **Avaliação dos efeitos antioxidantes e pró-longevidade do extrato de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) no organismo modelo *Caenorhabditis elegans***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de Ouro Preto, Minas Gerais, 2011.
- OLCZYK, P.; MENCNER, L.; KOMOSINSKA-VASSEV, K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. **Biomed Research International**, 2014.
- PALMEIRA FILHO, P.L.; CAPANEMA, L.X.L. A cadeia farmacêutica nacional e o desafio da inovação: possibilidades para a atuação do BNDES e outros agentes. **Anais XXX Encontro Nacional de Engenharia de Produção, ENEGEP**, São Carlos, 2010.
- RESNICK, A. Z.; PACKER, K. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 357-363, 1994.
- SHECHTER, R.; SCHWARTZ, M. CNS sterile injury: just another wound healing? **Trends in Molecular Medicine**, v.19, n.3, p.135–143, 2013.
- SCHIMPL, F. C. et al. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**. 150, p. 14-31, 2013.
- SHROFF, A.; MAMALIS, A.; JAGDEO, J. Oxidative Stress and Skin Fibrosis. **Current Pathobiology Reports**. v.2, n.4, p.257-267, 2014.
- SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guaranás Journey from Region Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 7, p. 279-282, 2010.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. **Conheça a pele**. 2016. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/cuidado/conheca-a-pele/>. Acesso em 20 mar. 2018.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA ESTÉTICA. **Comuns no Brasil, cirurgias plásticas demandam precauções**. 2015. Disponível em: <http://www2.cirurgioplastica.org.br/blog/2015/05/>. Acesso em: 05 maio 2019.
- STUNOVA, A.; VISTEJNOVA, L. Dermal fibroblasts - A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 39, p. 137-150, 2018.
- TAO, J. et al. Toxic responses of Sox2 gene in the regeneration of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to Retnoic acid. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. v. 204, p.106-112, 2018.
- TRACY, L.E.; MINASIAN, R.A.; CATERSON, E.J. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. **Advanced Wound Care**. v.5, p.119-136, 2016.
- VALE, J. R.; CZECZKO, N.C.; AQUINO, J.U.; RIBAS-FILHO, J.M.; BETTEGA, L.; VASCONCELOS, P.R.L.; CORREA NETO, M.A.; NASSIF, P.A.N.; MAZZA, M.; HENRIQUES, G.S. Estudo comparativo da cicatrização de gastrorrafias com e sem o uso do extrato de *Jatropha gossypifolia* L. (pião roxo) em ratos. **Acta Cir Brasil**, v.21, supl 3, p. 40-48, 2006.
- WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**. v.127, n.5, p.998-1008, 2007.
- WYNN, T.A.; VANNELLA, K.M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. **Immunity**. v.44, n.3, p. 450-462, 2016.

ZHANG, X.; XU, J.K.; WANG, J.; WANG, L.; KURIHARA, H.; KITANAKA, S.; YAO, X.S. Bioactive Bibenzyl Derivatives and Fluorenones from *Dendrobium nobile*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 1, p 24-28, 2007.

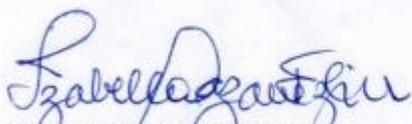
ZIEGLER, T.R.; PIERCE, G.F.; HERNDON, D.N. **Growth Factors and Wound Healing: Basic Science and Potential Clinical Applications**. New York: Springer, 2012.

**ANEXO A- DECLARAÇÃO DE PERMISSÃO PARA USO DE IMAGENS FELIN E FELIN (2016)**

**AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGENS**

**Autorizo o Mestrando Fellipe Danezi Felin - CPF 026.130.750-90,** assim como também seu orientador Tiango Aguiar Ribeiro e co-orientadora Ivana Mânica da Cruz, a veicularem todas as imagens do livro de nossa autoria **PATOLOGIA GERAL EM MAPAS CONCEITUAIS/ ELSEVIER/ 2016,** em qualquer meio de comunicação, para fins didáticos, de pesquisa e divulgação de conhecimento científico sem quaisquer ônus e restrições. Informamos também que o referido mestrando autorizado por esse documento, foi colaborador da obra acima citada.

SANTA MARIA, 6 de JUNHO DE 2020.



IZABELLA PAZ DANEZI FELIN

CPF 56768702068

(AUTORA DO LIVRO PATOLOGIA GERAL EM MAPAS CONCEITUAIS)



CARLOS ROBERTO FELIN

CPF 21690944072

(AUTOR DO LIVRO PATOLOGIA GERAL EM MAPAS CONCEITUAIS)

**ANEXO B- DECLARAÇÃO DE PERMISSÃO PARA USO DAS IMAGENS DAS FIGURAS 7A, 7B E 7C**

**AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGENS**

**Autorizo o Mestrando Fellipe Danezi Felin** - CPF 026.130.750-90 bem como seu orientador Prof. Dr. Tiango Aguiar Ribeiro e Coorientadora Prof<sup>a</sup> Dra Ivana Beatrice Manica da Cruz à veicular imagens dos frutos e árvores de guaraná, tais imagens fazem parte de meu acervo e podem ser utilizadas para fins didáticos, de pesquisa e divulgação de conhecimento científico sem quaisquer ônus e restrições.

Santa Maria, 16 de junho de 2020.

*Felipe Santos da Rosa*  
**Felipe Santos da Rosa**  
Analisa B- Embrapa

## Anexo C- DECLARAÇÃO DE PERMISSÃO PARA USO DE IMAGENS DA FIGURA 7D

**iStock**  
by Getty Images™

---

**Número do pedido 2063995712**

**Informações de pagamento**

Data	15 de junho de 2020	 Visa com terminação 7485
Endereço de cobrança	Felipe Felin Not applicable Avenida Fernando Ferrari 1993 Santa Maria RS 97050001 Brasil izabellafelin@gmail.com	

---

**Notas**

Título do projeto ou trabalho: Autorização de uso de imagem em publicações  
Pedido por: Felipe Danezi Felin

---

**Detalhes da compra (1 item)**

1 crédito da iStock	RS 45,00
Subtotal	RS 45,00
BRAISS	RS 1,12
BRAIOF	RS 0,17
<b>Total</b>	<b>RS 46,29</b>

Um comprovante de compra para este pedido estará disponível em **sua conta** no próximo dia útil.

Para acessar detalhes de seu pedido, histórico de downloads, renovações automáticas, compras, etc., entre na **sua conta**. Precisa de ajuda? [Contate-nos](#)

Reservatórios de pacotes de créditos não utilizados poderão ser efetuados dentro de 14 dias após a compra e serão creditados no método de pagamento usado originalmente. Você não poderá ser reembolsado se algum crédito de pacote de créditos tiver sido utilizado. Os créditos continuarão válidos enquanto a conta estiver ativa.

© 2020 iStockphoto LP. O design da iStock é uma marca comercial da iStockphoto LP.

**Comprovantes de compra**

Número do pedido	2063995712
Data da compra	15 de junho de 2020
Número do trabalho	Autorização de uso de imagem em publicações
Total do pedido	RS 46,29



**15 de junho de 2020**  
**14:29**  
**1 crédito**

---

**ID do arquivo:** 657271026  
**Licença:** Padrão  
**Coleção:** Essenciais  
**Licenciado para:** Felipe Danezi Felin

Imagem do Açai disponível para compra em

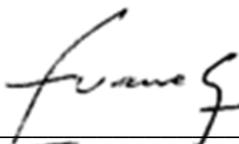
<https://www.istockphoto.com/br/purchase/checkout?fastcheckoutasset=657271026> / ID Imagem Fruto do Açai: 657271026. Categoria: Fotos de Stock/ fruta tropical. Compra de direito de uso de imagem N° 2063995712, disponível em: <https://www.istockphoto.com/br/sales-order/2063995712?nh=1>

**ANEXO D- DECLARAÇÃO DE CONCORDÂNCIA PARA A REALIZAÇÃO DOS  
EXPERIMENTOS NO LABORATÓRIO DE BIOGENÔMICA DA UFSM**

**DECLARAÇÃO**

Eu, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, portadora do SIAPE: 1561230, professora associada do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Santa Maria e Professora responsável pelo Laboratório de Biogenômica, localizado na Avenida Roraima, 1000, prédio 19, sala 3102, venho através desta declaração, manifestar a minha concordância na realização dos experimentos relacionados ao projeto: “EFEITO DE UM FORMULADO DESENVOLVIDO COM GUARANÁ E SEMENTE DE AÇAÍ, EM MODELOS EXPERIMENTAIS PÓS-CIRÚRGICOS: ESTUDO DA REPARAÇÃO *IN VITRO E IN VIVO*” de autoria de Fellipe Danezi Felin.

Santa Maria, RS, 16 de maio de 2019.



---

Prof. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

SIAPE: 1561230

Professora responsável/ Coordenadora Geral do Laboratório Biogenômica da Universidade  
Federal de Santa Maria, RS- UFSM

## ANEXO E- FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

**FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS DO ESTUDO “EFEITO DE UM FORMULADO DESENVOLVIDO COM GUARANÁ E SEMENTE DE AÇAÍ EM MODELOS EXPERIMENTAIS PÓS-CIRÚRGICOS: ESTUDO DA REPARAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*”**

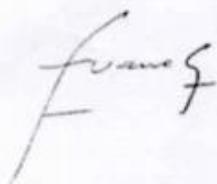
<b>FASES-1-2: sem uso celular</b>	<b>FASE-3: ESTUDO <i>IN VITRO</i></b>	<b>FASE-4: ESTUDO <i>IN VIVO</i></b>
<p><b>Obtenção dos extratos a partir de frutos obtidos na EMBRAPA/Manaus-AM.</b></p> <p>A- Através da EMBRAPA serão enviadas para o laboratório biogenômica- UFSM, semente de guaraná e bagas de açaí para obtenção do caroço de açaí;</p> <p>B- Moagem;</p> <p>C- Exposição a água quente e baixo pH por meio da adição de ácido cítrico</p> <p>D- Retroevaporação;</p> <p>E- Liofilização;</p> <p>F- Obtenção do extrato</p>	<p><b>Cultivo celular de fibroblastos e queratinócitos expostos às concentrações 1, 3, 5, 10 e 30 µg / mL</b></p> <p>A- Obtenção comercial de linhagens de fibroblastos (linhagem HFF-1 / ATCC® SCRC-1041™) e queratinócitos (linhagem HACAT) do Banco de células do Rio de Janeiro;</p> <p>B- Cultivo celular em condições controladas/ padronizadas</p> <p>C- Tratamento das células de ambas as linhagens com cada uma das concentrações 1, 3, 5, 10 e 30 µg / mL do extrato para análise da viabilidade e proliferação celular;</p>	<p><b>Protocolo-1: análise dos padrões de regeneração em <i>Eisenia Fetida</i> (minhocas californianas).</b></p> <p>A- Obtenção comercial de minhocas californianas- <i>Eisenia Fetida</i>;</p> <p>B- Aclimatização laboratorial e escolha da melhor concentração dos tratamentos;</p> <p>B- Crioanestesia e incisão cirúrgica entre o 3º e 5º segmentos das minhocas;</p> <p>C- Plaqueamento das minhocas em triplicatas independentes/ 5 minhocas por placa /3 placas por tratamento/ Total= 30 minhocas;</p> <p>D- Submissão aos tratamentos (pipetado na ferida operatória) por 1,3,6,12 e 24 horas. Tratamentos: 1- Controle, tratamento com tampão fosfato; 2- Tratamento com 5 µg / mL do extrato conjugado GA.</p> <p>E- Crioanestesia e fixação do animal em Formol 4%, elaboração das lâminas histológicas.</p>
<p><b>Caracterização química do composto desenvolvido, através de:</b></p> <p>A- Análise por espectrometria de massa de tempo de voo com ionização por eletrospray de alta resolução (ESI-ToF-MS),</p>	<p><b>Definida a concentração 5 µg/mL do extrato desenvolvido, foi induzido em fibroblastos o modelo de “ferida” <i>in vitro</i></b></p> <p>A-Taxa de migração dos fibroblastos para a área rasgada (<i>STRACH ASSAY</i>) após 6, 24 e 72 horas</p> <p>B- Análise da apoptose via Citometria de fluxo 24 horas após o scratch assay e tratamento;</p> <p>C- Formação de colágeno total após 24, 48 e 72 horas.</p>	<p><b>Protocolo-2: Análise da expressão gênica em <i>Eisenia Fetida</i> (minhocas californianas).</b></p> <p>Mesmos passos do protocolo acima em A-B-C-D;</p> <p>E- Crioanestesia e nova incisão cirúrgica nos 3 segmentos mais próximos ao corte inicial;</p> <p>F-Extração do mRNA</p> <p>G-Análise da expressão gênica (gene SOX-4).</p>
<p><b>Avaliação do efeito antioxidante e genoprotetor do formulado composto desenvolvido através de testes não celulares: Respectivamente DPPH e Teste GEMO.</b></p>	<p><b>Avaliação do efeito dos marcadores do metabolismo oxidativo após 3,6,24 e 72 horas de tratamento</b></p> <p>A-Lipoperoxidação;</p> <p>B-Carbonilação de proteínas;</p> <p>C-Espécies reativas do oxigênio (EROS).</p> <p>D- Óxido nítrico</p>	
	<p><b>Análise da expressão gênica:</b> proliferação celular (FGF-1, FGF-7), marcadores de regeneração/ cicatrização: COL-1, MMP-1 e marcador inflamatório: NLRP-3</p>	

**ANEXO F- DECLARAÇÃO DE PERMISSÃO PARA O USO DE IMAGENS DO  
LABORATÓRIO DE BIOGENÔMICA DA UFSM**

**AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGENS**

**Autorizo o Mestrando Fellipe Danezi Felin - CPF 026.130.750-90,** assim como também seu orientador Tiango Aguiar Ribeiro, a veicularem todas as imagens que dizem respeito às linhagens celulares HFF-1 e Hacat que fazem parte do Banco de Imagens do Laboratório Biogenômica da Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, para fins didáticos, de pesquisa e divulgação de conhecimento científico sem quaisquer ônus e restrições.

Santa Maria, 06 de junho de 2020.



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Beatrice Mânica da Cruz- SIAPE 1561230  
Coordenadora Laboratório Biogenômica -UFSM

**ANEXO G- DECLARAÇÃO DE PERMISSÃO PARA O USO DE IMAGENS  
RIBEIRO FILHO (2019)**

**AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGENS**

**Autorizo o Mestrando Fellipe Danezi Felin - CPF 026.130.750-90,** assim como também seu orientador Tiango Aguiar Ribeiro e co-orientadora Ivana Mânica da Cruz, a veicularem a imagem denominada como figura 10 sobre o método do arranhão (*scratch assay*) em cultura de fibroblasto, elaborada por mim, em virtude da minha dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia- Universidade Federal do Amazonas. A presente autorização se refere a qualquer meio de comunicação, para fins didáticos, de pesquisa e divulgação de conhecimento científico, sem quaisquer ônus e restrições.

Manaus-AM, 6 de junho de 2020.



Médico, MsC. Euler Esteves Ribeiro Filho

Autor da dissertação Desenvolvimento e análise do efeito de um extrato combinado de andiroba, copaíba e guaraná em modelos de cicatrização *in vitro* e *in vivo* -UFAM.

## ANEXO H- CERTIDÃO DE CADASTRO NO SISGEN



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**

**Cadastro nº AFC0D3A**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AFC0D3A**  
 Usuário: **UFSM**  
 CPF/CNPJ: **95.591.764/0001-05**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

**Espécie**

**Paullinia cupana**

Título da Atividade: **EFEITO DE UM FORMULADO DESENVOLVIDO COM GUARANÁ E SEMENTE DE AÇAÍ EM MODELOS EXPERIMENTAIS PÓS-CIRÚRGICOS: ESTUDO DA REPARAÇÃO IN VITRO E IN VIVO**

**Equipe**

<b>Tiango Aguiar Ribeiro</b>	<b>UFSM</b>
<b>Fellipe Danezi Felin</b>	<b>UFSM</b>
<b>Ivana Beatrice Mânica da Cruz</b>	<b>UFSM</b>

Data do Cadastro: **13/08/2020 10:58:18**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:59** de **13/08/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**

## ANEXO I- APROVAÇÃO GABINETE DE PROJETOS DA UFSM

## Folha Rosto do Projeto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA - UFSM		
		Data/Hora: 05/08/2021 12:12 Autenticação: 478E.7ACA.DE96.01B3.B230.7A78.868D.67BF Consulte em <a href="http://www.ufsm.br/autenticacao">http://www.ufsm.br/autenticacao</a>
PROJETO NA ÍNTEGRA		
<b>Título:</b> EFEITO DE UM FORMULADO DESENVOLVIDO COM GUARANÁ E SEMENTE DE AÇAI EM MODELOS EXPERIMENTAIS PÓS-CIRÚRGICOS: ESTUDO DA REPARAÇÃO IN VITRO E IN VIVO		
<b>Número:</b> 054403	<b>Classificação:</b> Pesquisa	<b>Registrado em:</b> 26/06/2020
<b>Situação:</b> Em andamento	<b>Início:</b> 26/06/2020	<b>Término:</b> 31/07/2022
<b>Avaliação:</b> Avaliado		<b>Última avaliação:</b> 15/06/2021
<b>Fundação:</b> Não necessita contratar fundação		<b>Número na fundação:</b> Não se aplica
<b>Supervisor financeiro:</b> Não se aplica		
<b>Proteção do conhecimento:</b> Projeto não gera conhecimento passível de proteção		
<b>Tipo de evento:</b> Não se aplica	<b>Carga Horária:</b> Não se aplica	<b>Alunos matriculados:</b> Não se aplica
		<b>Alunos concluintes:</b> Não se aplica
<b>Palavras-chave:</b> Ferida operatória, Cicatrização, Colagenização, Regeneração		
<b>Resumo:</b> Introdução: O reparo dos tecidos é um processo complexo que exige ativação de mediadores e de mecanismos relacionados à cicatrização e à regeneração. A cicatrização envolve inflamação, proliferação de fibroblastos e remodelagem do colágeno. Estudos têm elucidado a modulação do reparo a nível molecular e bioquímico na tentativa de evitar cicatrizes patológicas. O reparo pode ser influenciado pelo estado nutricional do paciente e por isso ser estimulado por produtos originários de plantas, incluindo o guaraná e o açaí, que possuem efeito cicatrizante por modularem as fases inflamatória e proliferativa. É possível que a combinação destes, resulte em um potencial produto farmacológico inovador, com elevado poder cicatrizante. Objetivo: Avaliar o efeito de um formulado, desenvolvido com pó de guaraná e semente de açaí, em modelo experimental de reparo pós-cirúrgico, in vitro e in vivo. Métodos: O estudo comparará o efeito pró-cicatrizante do formulado desenvolvido com o pó de guaraná e a semente de açaí isolados, utilizando modelo de cicatrização in vitro, através da linhagem comercial de fibroblastos (HFF-1) e queratinócitos (HCAAT). Também utilizará um modelo de regeneração in vivo, através de minhocas californianas (Eisenia Fetida), obtidas comercialmente. No modelo in vitro, as culturas celulares serão rasgadas (teste scratch assay) e cultivadas em condições padronizadas. No modelo in vivo, a região caudal das minhocas será incisa cirurgicamente. Será feita uma curva de concentração dos extratos isoladamente, e a menor concentração de cada composto que tenha efeito pró-proliferação celular serão consideradas de escolha. As principais moléculas bioativas do composto desenvolvido serão determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Os modelos experimentais então serão suplementados com: A - formulado composto desenvolvido, B - pó de guaraná isolado, C - semente de açaí isolada, D - controle sem suplementação. Cada um dos modelos (in vitro e in vivo) será exposto a quatro tratamentos, em três placas por vez, em três dias diferentes (triplatas independentes). No caso do modelo in vivo, cada placa conterá cinco minhocas. Para a avaliação do efeito no modelo in vitro serão analisados: marcadores oxidativos e apoptóticos, fatores de crescimento (FGF-1, KGF-1 e VEGF), citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Para a avaliação no modelo in vivo, após 24 horas da incisão caudal e exposição a cada tratamento, será analisada a expressão de genes associados à regeneração. Após sete dias serão analisados os padrões de regeneração. Os resultados serão estatisticamente comparados por análise de variância de uma ou duas vias seguida de teste post hoc de Tukey ou Dunnet. Serão considerados significativos testes com $p < 0.05$ . Por não se tratar de um estudo com vertebrados, não há necessidade de aprovação em Comitê de Ética.		

Página 1 de 3

**Objetivos:** Objetivo geral: Avaliar o efeito de um formulado desenvolvido com guaraná e semente de açaí, em modelos experimentais pós-cirúrgicos: estudo da reparação in vitro com células de linhagem comercial e in vivo utilizando como modelo experimental a Eisenia Fetida. Objetivos específicos: Desenvolver um formulado a base de pó de guaraná e semente de açaí, combinados, visando uma maior concentração de moléculas bioativas com atividade antioxidante, anti-inflamatória e pró-colágeno e consequentemente alto poder de reparo; Analisar o efeito pró-cicatrizante do composto desenvolvido em modelo in vitro (cultura de fibroblastos e queratinócitos), através da análise de marcadores oxidativo, apoptóticos, fatores de crescimento, das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias; Analisar o reparo por regeneração no modelo in vivo (minhocas), através da expressão de genes associados à regeneração e dos padrões de regeneração (via microscopia) nos animais que sofreram incisão caudal.

**Justificativa:** O processo de colagenização/cicatrização e regeneração dos tecidos constitui o reparo que é altamente complexo, pois envolve vários mecanismos, entre esses: a angiogênese, a migração e proliferação de fibroblastos, a deposição de elementos da matriz extracelular, a síntese e a remodelação do colágeno. Cada fase dessas depende de vários mediadores químicos e da expressão gênica adequada para efetivação eficiente e normal do processo de cicatrização das feridas operatórias. Nesse contexto, estudos atuais têm focado no melhor entendimento da modulação do reparo a nível gênico, molecular e bioquímico na tentativa de evitar cicatrizes patológicas que podem conduzir a problemas estéticos, psicológicos e funcionais e, portanto, extremamente indesejadas, especialmente pelos médicos cirurgiões que atuem diretamente envolvidos nessas questões e prezam pelo reparo da ferida operatória de uma forma eficiente, minimizando danos e consequências pós-operatórias. Estudos recentes apontam alguns produtos naturais, incluindo frutos, amazônicos, com potencial atividade cicatrizante. Alguns estudos apontam o guaraná e o açaí com potencial efeito cicatrizante via modulação das fases inflamatória e proliferativa da cicatrização. É possível que a combinação destes, resulte em um potencial produto farmacológico inovador, com elevado poder cicatrizante. Assim, e diante do contexto de estudos prévios o pó de Guaraná (Paulinia Cupana) e a semente de açaí (Euterpe oleracea), plantas de origem amazônica que possuem potencial efeito cicatrizante via modulação da fase inflamatória e proliferativa de fibroblastos. Tem sua testagem em conjunto justificada uma vez que a combinação desses compostos, resulte em um potencial produto farmacológico inovador, com alto potencial pró-cicatrizante.

**Resultados esperados:** Que o formulado desenvolvido com guaraná e semente de açaí tenha efeitos promissores nos modelos experimentais pós-cirúrgicos.

PARTICIPANTES							
MATRÍCULA	NOME	VINCULO	CURSO/LOTAÇÃO	FUNÇÃO	C.H.*	INÍCIO	TÉRMINO
201970233	FELIPE DANEZI FELIN	Aluno de Pós-graduação	PG-Mestrado Profissional em Ciências da Saúde	Autor	2	26/06/2020	26/06/2021
1561230	IVANA BEATRICE MANICA DA CRUZ	Docente	DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA	Co-orientador	2	26/06/2020	26/06/2021
3768107	TIANGO AGUIAR RIBEIRO	Docente	DEPARTAMENTO DE CIRURGIA	Orientador	2	26/06/2020	31/07/2022

\* carga horária semanal

Página 2 de 3

UNIDADES VINCULADAS				
UNIDADE	FUNÇÃO	VALOR	INÍCIO	TÉRMINO
04.31.00.00.0.0 - DEPARTAMENTO DE CIRURGIA	Promotor		26/06/2020	31/07/2022
04.31.00.00.0.0 - DEPARTAMENTO DE CIRURGIA	Responsável		26/06/2020	31/07/2022
04.40.00.00.0.0 - DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA	Executor		26/06/2020	31/07/2022
04.10.23.00.0.0 - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - Mestrado Profissional	Promotor		26/06/2020	31/07/2022

CLASSIFICAÇÕES	
TIPO DE CLASSIFICAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
Classificação CNPq	4.01.02.01-7 - CIRURGIA PLÁSTICA E RESTAURADORA
Grupo do CNPq	962 - Grupo de Pesquisa em Cirurgia
Linha de pesquisa	99.00.00 - LINHA DE PESQUISA INEXISTENTE
Quanto ao tipo de projeto de pesquisa	2.03 - Projeto de Dissertação

Página 3 de 3

# ANEXO J- COMPROVAÇÃO DA SUBMISSÃO DO ARTIGO

*Food Research International Journal*

ISSN: 0963-9969

*Fator de Impacto: 2020: 6.475*

editorialmanager.com/foodres/default.aspx

**FOOD RESEARCH INTERNATIONAL** Editorial Manager

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • POLICIES

Role: Author Username: ivana.ufsm@gmail.com

**Submissions Being Processed for Author Ivana Cruz**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">View Reference Checking Results</a> <a href="#">Send E-mail</a>	FOODRES-D-21-03968	Amazonian guarana- and açai-conjugated extracts improve scratched-fibroblast healing and Eisenia fetida surgical tail amputation by modulating oxidative metabolism.	Aug 11, 2021	Aug 15, 2021	With Editor

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.