



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SAÚDE BRASILEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
NÚCLEO DE PESQUISA EM IMUNOPATOLOGIA E IMUNOLOGIA CLÍNICA**

Álvaro César Dutra Presto

**POTENCIAL CICATRIZANTE DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA CASCA
VERDE DA BANANA (*MUSA SP.*): ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO***

JUIZ DE FORA

2019

Álvaro César Dutra Presto

**POTENCIAL CICATRIZANTE DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA CASCA
VERDE DA BANANA (*MUSA SP.*): ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup

Coorientadores: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa

JUIZ DE FORA

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Presto, Álvaro César Dutra.

Potencial cicatrizante de extratos hidroalcoólicos da casca verde da banana (*Musa* sp.): estudo *in vivo* e *in vitro* / Álvaro César Dutra Presto. -- 2019.

86 f.: il.

Orientadora: Beatriz Julião Vieira Aarestrup

Coorientadores: Ademar Alves da Silva Filho, José Otávio do Amaral Corrêa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2019.

1. Cicatrização de Ferida. 2. *Musa* sp. 3. Extrato Hidroalcoólico. 4. Histopatologia. 5. Cultura de Células. I. Aarestrup, Beatriz Julião Vieira, orient. II. Silva Filho, Ademar Alves da, coorient. III. Corrêa, José Otávio do Amaral, coorient. IV. Título.

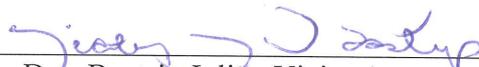
ÁLVARO CÉSAR DUTRA PRESTO

POTENCIAL CICATRIZANTE DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA CASCA
VERDE DA BANANA (*MUSA SP.*): ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO*

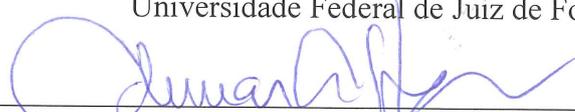
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde, da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de Juiz de
Fora, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Saúde – Área de
Concentração: Saúde Brasileira

Aprovada em 23 / 08 / 2019

BANCA EXAMINADORA



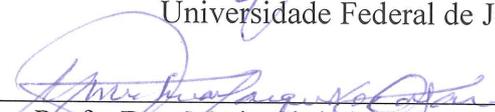
Profa. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup – Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho – Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa – Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Maria Christina Marques Nogueira Castañon
Universidade de Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Maria Cristina Cardoso de Mendonça

*Este trabalho é dedicado à minha família:
Pai, Mãe e Irmão. Grandes incentivadores
da minha caminhada sempre apoiado na
força de vontade, humildade, dedicação e
estudo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me abençoado até esse momento, guardando sempre o que foi melhor para mim.

Aos meus pais e meu irmão, pelo amor e carinho que sustentam nossa família, apoio nas minhas decisões e toda dedicação para que eu realizasse meus sonhos.

Ao pequeno Heitor que, ainda sem consciência da sua existência, trouxe alegria para os meus dias, o que foi fundamental para o desenvolvimento do trabalho.

À minha orientadora Beatriz Aarestrup, pela orientação de anos que começou no 2º período da graduação (2011) despertando em mim o interesse pela Histologia, essa Ciência que eu amo! Sempre muito competente, paciente e dedicada se tornou um exemplo de professora em minha vida.

Aos meus coorientadores, Ademar e José Otávio pelo acompanhamento no procedimento de extração e no experimento *in vitro*.

Ao professor Fernando Aarestrup, pesquisador que sempre inspirou a todos no nosso Núcleo de Pesquisa.

Ao professor Akinori, mestre da estatística, sempre me mostrando formas impecáveis de fazer pesquisa.

À professora Maria Inês, chefe do Departamento de Morfologia, pelo trabalho e carinho desde quando eu ainda era aluno de IC.

À professora Maria Christina (Departamento de Morfologia) por ter me acolhido como aluno em suas aulas, fundamental para minha formação.

Aos meus colegas da Pós-Graduação: Cristina, Daniela, Fabiano, Juliana, Jéssica, Leonardo, Ludmila, Lívia, Harleson, Ivair, Mariana, Vinicius e Wellington. Sempre compartilhando as nossas angústias, os nossos achados, enriquecendo minha personalidade e visão de trabalho.

À Laetitia, minha amiga e colega de profissão, por toda instrução na parte técnica da histologia.

À aluna de IC Wanderléya e às técnicas Lívia e Lorena pelo suporte no experimento *in vitro* e extração das substâncias.

Aos técnicos do Departamento de Morfologia, Carlos e Lúcia, pela ajuda no processamento histológico das amostras.

A todos os funcionários do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) por todo auxílio na parte prática do desenvolvimento desse trabalho.

Aos Amigos que se fizeram presentes durante todo esse tempo em minha vida.

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

RESUMO

A literatura científica abarca um extenso volume de trabalhos voltados para a cicatrização de feridas cutâneas por ser um problema que afeta grande parte da população. Na busca por tratamentos alternativos para essa enfermidade, o uso de produtos naturais tem ganhado destaque uma vez que o Brasil possui grande biodiversidade de plantas. A casca da banana é popularmente conhecida como cicatrizante natural por conta dos compostos fenólicos, muito empregado na cicatrização de fissuras mamilares durante a amamentação. Esse trabalho, portanto, buscou avaliar o potencial cicatrizante dos extratos obtidos a partir da casca verde da banana em um estudo *in vivo* e *in vitro*. Foram obtidos extratos hidroalcoólicos a partir da casca verde seca (dry BPE) e da casca verde fresca (fresh BPE) pelo método de maceração em etanol e água (9:1). Para o estudo *in vitro* foram utilizados fibroblastos humanos cultivados em meio DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich) e com ambos os extratos nas concentrações de 1%, 2%, 4%, 10% e 15% encubado por 24h e 48h. O teste de viabilidade celular foi realizado pelo MTT. O produto tópico utilizado foi obtido incorporando o extrato ao gel de Natrosol nas concentrações de 2%, 4% e 10% do dry BPE e 4% e 10% do fresh BPE, também foi obtido um gel a partir da casca verde *in natura* (natural BP) na concentração de 4%. Para o estudo foram utilizados ratos Wistar machos (N=56) divididos em 7 grupos (n=8): Grupo I – Controle sem tratamento com aplicação do gel sem componentes ativos; Grupo II – natural BP; Grupo III - dry BPE 2%; Grupo IV – dry BPE 4%; Grupo V – dry BPE 10%; Grupo VI – fresh BPE 4% e Grupo VII – fresh BPE 10%. Os animais foram anestesiados e confeccionada uma lesão cirúrgica cutânea na região dorsal de dimensão 3cm x 2cm. O tratamento foi tópico e diário durante um período de 9 dias, no 10º dia os animais foram eutanasiados e as amostras de pele encaminhadas para o processamento histológico de rotina para análise histopatológica descritiva da área em cicatrização e contagem semiautomática do infiltrado inflamatório. Também foi feita a razão entre a área inicial e final da lesão para cálculo do percentual de contração da ferida. O dry BPE nas concentrações de 1% e 2% induziram a proliferação dos fibroblastos enquanto que as demais

concentrações bem como o fresh BPE reduziram a população dessas células. Os grupos II, III, IV e V apresentaram maior contração da ferida quando comparado ao controle. Segundo análise descritiva o GI apresentou crosta aderida, reepitelização discreta e infiltrado neutrofílico; no GII houve crosta espessa aderida, reepitelização extensa porém delgada, remodelamento da derme e infiltrado eosinofílico; o GIII epiderme remodelada com queratina e desprendimento da crosta, derme remodelada e infiltrado inflamatório misto; no GIV foi observado crosta discreta e delgada aderida, reepitelização extensa e discreta, remodelamento da derme e infiltrado misto; o GV apresentou crosta espessa, reepitelização discreta, tecido de granulação jovem e infiltrado misto; no GVI foi observado crosta espessa, reepitelização discreta, início de remodelamento e infiltrado com células gigantes; no GVII houve crosta espessa, reepitelização discreta e infiltrado com células gigantes. Portanto, o dry BPE na concentração de 2% se mostrou como um tratamento em potencial para a cicatrização de feridas devido a proliferação de fibroblastos e remodelamento da epiderme e da derme

Palavras-chave: Cicatrização de Ferida. *Musa* sp. Extrato Hidroalcoólico. Histopatologia. Cultura de Células.

ABSTRACT

The scientific literature covers an extensive volume of works focused on the healing of cutaneous wounds as this is a problem that affects a large part of the population. In the search for alternative treatments for this disease, the use of natural products has been gaining prominence since Brazil possesses a great biodiversity of plants. The banana peel is popularly known as a natural cicatrizant because of its phenolic compounds, and is much used in the healing of nipple fissures during breastfeeding. This work, therefore, sought to assess the healing potential of the extracts obtained from the green banana peel in an *in vivo* and *in vitro* study. Hydroalcoholic extracts were obtained from dried green peel (dry BPE) and fresh green peel (fresh BPE) by the method of maceration in ethanol and water (9:1). For the *in vitro* study, human fibroblasts cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich), and with both extracts at the concentrations of 1%, 2%, 4%, 10%, and 15%, were incubated for 24h and 48h. Cell viability was tested using MTT. The topical product used was obtained by incorporating the extract into Natrosol gel at concentrations of 2%, 4%, and 10% of dry BPE and 4% and 10% of fresh BPE. A gel was also obtained from the natural green peel (natural BP) at 4% concentration. For the study, male Wistar rats (N = 56) divided into 7 groups (n = 8) were used: Group I - Control without treatment, with application of the gel without active components; Group II - natural BP; Group III - dry BPE 2%; Group IV - dry BPE 4%; Group V - dry BPE 10%; Group VI - fresh BPE 4%; and Group VII - fresh BPE 10%. The animals were anesthetized and a cutaneous surgical wound was made in the dorsal region with a dimension of 3cm x 2cm. The treatment was topical and daily for a period of 9 days. On the 10th day the animals were euthanized and the skin samples were sent for routine histological processing for descriptive histopathological analysis of the healing area and semi-automated count of the inflammatory infiltrate. The ratio between the initial and final areas was also calculated for the percentage of wound contraction. The dry BPE at concentrations of 1% and 2% induced fibroblast proliferation while the other concentrations, as well as fresh BPE, reduced the population of these cells. Groups II, III, IV, and V showed greater contraction of the

wound compared to the control. According to descriptive analysis, GI presented adhered crust, discrete reepithelization and neutrophilic infiltrate; in GII there was thick adhered crust, extensive but thin reepithelization, dermis remodeling and eosinophilic infiltrate; GIII keratin remodeling epidermis and detachment of the crust, remodeling dermis and mixed inflammatory infiltrate; GIV showed discreet and adherent thin crust, extensive and discreet reepithelialization, dermis remodeling and mixed infiltrate; SG presented thick crust, discreet reepithelialization, young granulation tissue and mixed infiltrate; GVI showed thick crust, discreet reepithelialization, remodeling and giant cell infiltration; In GVII there was thick crust, discreet reepithelialization and infiltration with giant cells. Therefore, dry BPE at 2% concentration has shown to be a potential treatment for wound healing due to fibroblast proliferation and epidermis and dermis remodeling.

Keywords: Wound Healing. *Musa* sp. Hydroalcoholic Extract. Histopathology. Cell Culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Grau de maturação determinado por Von Leoseck.....	28
Figura 2: Imagem da placa de 96 poços com fibroblastos cultivados com os extratos em diferentes concentrações (1%, 2%, 4%, 10% e 15%)	39
Figura 3: Divisão dos grupos.....	41
Figura 4: Imagem representativa do método utilizado para quantificar a contração da ferida usando o programa Zen Pro 2011	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Citocinas envolvidas no processo de reparo	26
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPE - *Banana Peel Extract*

CBR - Centro de Biologia da Reprodução

DEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EGF - Fator de Crescimento Epidérmico

FGF - Fator de Crescimento Fibroblástico

HE - Hematoxilina e Eosina

IL - Interleucina

KGF - Fator de Crescimento Epitelial

LDL - *Low Density Lipoproteins*

PAF - Fator Ativador de Plaqueta

PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

SFA - Substância Fundamental Amorfa

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador β

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral

UV - Ultravioleta

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

MTT - Brometode3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius

cm - Centímetro

g - Grama

h - Hora

kg - Quilograma

l - Litro

µm - Micrômetro

mbar - Milibar

mg - Miligrama

min - Minuto

ml - Mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. Sistema Tegumentar	20
2.2. Reparo	22
2.2.1. Hemostasia e inflamação	23
2.2.2. Proliferação	24
2.2.3. Remodelamento	25
2.2. Banana (<i>Musa spp.</i>).....	27
2.2.1. Componentes da casca verde da banana.....	29
2.2.1.1. Flavonoides	30
2.2.1.2. Taninos.....	31
2.3. Produção dos extratos.....	32
3. HIPÓTESE	34
4. OBJETIVOS.....	35
4.1. Geral	35
4.2. Específicos	35
5. MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1. Obtenção e Seleção das Bananas (<i>Musa sp.</i>).....	36
5.2. Preparo do Gel com a Casca Verde In Natura	36
5.3. Obtenção dos Extratos da Casca Verde.....	37
5.4 Preparo do Gel com os Extratos da Casca Verde Seca e Fresca	38
5.5. Experimento In Vitro	38
5.5.1 Cultura de Fibroblastos	38
5.6. Experimento In Vivo	40
5.6.1 Animais.....	40

5.6.2. Confecção da ferida cirúrgica.....	40
5.6.3. Tratamento	41
5.6.4 Morfometria da contração da ferida.....	42
5.6.5 Análise Histopatológica	43
5.6.5.1 <i>Avaliação Histopatológica Descritiva</i>	43
5.6.5.2 <i>Histomorfometria do Infiltrado Inflamatório</i>	44
5.7. Análise Estatística.....	44
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS.....	72
ANEXO I.....	77
ANEXO II.....	78
ANEXO III.....	81
APÊNDICE I.....	82
APÊNDICE II.....	86

1. INTRODUÇÃO

Lesões que acometem tecidos moles compreendem pele, músculos, tendões, ligamentos e cápsulas articulares, enquanto que lesões em tecidos duros são aquelas que levam a perda do tecido ósseo; independente da injúria, estratégias utilizando recursos químicos e físicos, bioengenharia e medicina regenerativa compõem o conjunto de medidas terapêuticas que vêm sendo desenvolvidas para potencializar ou mesmo possibilitar o processo de reparo (ATZINGEN et al., 2011; LEE; ROBINSON; LU, 2016).

Após qualquer lesão, independente da causa, iniciarão inúmeros fenômenos biológicos que são desencadeados para que ocorra a reparação tecidual: inflamação, proliferação e remodelação; estes ocorrem não de forma isolada, mas sequencialmente (LINS et al., 2010).

Na fase inicial do reparo podem haver falhas como alterações na síntese de colágeno e diminuição dos elementos celulares. Ainda, diversos fatores locais e sistêmicos podem interferir ou até retardar o processo de cicatrização, merecendo atenção em vários estudos, buscando recursos que venham solucionar ou diminuir problemas que possam vir a atrasar o fenômeno cicatricial (MACEDO; OLIVEIRA, 2010).

O Brasil possui uma grande variedade de plantas e ervas com propriedades medicinais. Essa diversidade botânica pode, portanto, compor o arsenal terapêutico no tratamento de muitas doenças (ATZINGEN et al., 2011). Dentre estas, a banana prata (*Musa sapientum*), comum em países tropicais, tem sido alvo de pesquisas devido a seu potencial antihiperlipidêmico, no controle do LDL e por suas propriedades antioxidantes. Nos últimos anos, estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de elucidar se o gel obtido a partir da casca verde da banana exerce efeitos benéficos sobre a cicatrização de feridas em pele. Diversos autores obtiveram resultados promissores quanto à evolução da inflamação e à proliferação vascular e fibroblástica (AGARWAL et al., 2009; ATZINGEN et al., 2011; ATZINGEN et al., 2013; ATZINGEN et al., 2015).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sistema Tegumentar

O sistema tegumentar é constituído pela pele – dividida em epiderme e derme, e por anexos epidérmicos, tendo como funções gerais formar uma barreira protetora contra o ambiente externo, participar da termorregulação, do metabolismo e do armazenamento de vitaminas e lipídios, além de desempenhar função sensorial, captando estímulos contínuos do meio como temperatura, tato e dor (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; AARESTRUP, 2012).

A epiderme possui origem embrionária ectodérmica, caracterizada por tecido epitelial de revestimento pavimentoso estratificado queratinizado com espessura da camada de queratina variável de acordo com o atrito e a região anatômica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; AARESTRUP, 2012). As células epiteliais são denominadas queratinócitos e, histologicamente, se organizam de modo citoarquitetural típico:

- Camada germinativa ou basal: mais profunda, composta por células fonte responsáveis pela renovação epidérmica, são lábeis, altamente renováveis e capazes de regeneração. Acredita-se que a renovação completa das camadas epidérmicas a partir destas células ocorra fisiologicamente entre 21 a 28 dias. Microscopicamente, estas células se organizam em monocamada, são pequenas, de cúbicas a cilíndricas baixas e núcleo intensamente corado; por vezes observam-se figuras mitóticas dada a própria natureza desta região epidérmica;
- Camada média, espinhosa ou Malpighiana: intermediária, é a camada mais espessa da epiderme, formada por células em gradual diferenciação, adquirindo gradualmente polarização horizontal;
- Camada granulosa: camada correspondente à área de maturação dos grânulos de queratina, tornando o citoplasma cada vez mais pavimentoso e

repleto de estruturas basofílicas. À medida que as células amadurecem e se aproximam da superfície, o processo apoptótico é desencadeado e o conteúdo destes grânulos é liberado juntamente com desintegração do núcleo e, posteriormente, da célula como um todo;

- Camada córnea: constituída por várias camadas de proteínas e lipídeos com espessura variável, responsável pela barreira física, impermeável à água, impedindo a desidratação e proporcionando proteção mecânica.

A epiderme apresenta, além dos queratinócitos, outros três tipos celulares: melanócitos – produzem a melanina, responsáveis pela pigmentação e pela proteção da pele contra radiação ultravioleta; células de Langerhans – células apresentadoras de antígenos (APC's) e células de Merkel – dispersas entre a camada basal acredita-se que essas células têm função relacionadas ao sistema neuroendócrino, no estímulo de proliferação dos queratinócitos e garantia da homeostase da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BOULAIS, et al., 2009; AARESTRUP, 2012).

A derme, por sua vez, tem origem no mesoderma, e é constituída por tecido conjuntivo propriamente dito com seus elementos histológicos típicos: células fixas (fibroblastos, linfócitos, macrófagos e mastócitos, que se encontram fisiologicamente no tecido) e móveis (leucócitos polimorfonucleares que migram diante de estímulos imunológicos), e matriz extracelular contendo substância fundamental amorfa (SFA) e proteínas fibrosas. A SFA é rica em glicosaminoglicanas hidrofílicas e outras proteínas não-colagenosas que têm atuação relevante em processos de reparo. As proteínas fibrosas, denominadas de modo geral “fibras” são provenientes de duas famílias: colágena (fibras colágenas, cujo precursor é o tropocolágeno, e fibras reticulares, cujo precursor é a reticulina) e família elástica, que tem por molécula básica a elastina (fibras elaunínicas, oxitalânicas e elásticas) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; AARESTRUP, 2012).

De acordo com a organização e proporção dos elementos histológicos do tecido conjuntivo propriamente dito, a derme é dividida em duas camadas; papilar e reticular. A primeira, mais superficial, situada entre as cristas epiteliais, é composta por tecido conjuntivo frouxo, apresenta feixes de colágeno tipo I mais delgados e,

proporcionalmente, maior celularidade, inervação e vascularização. A derme reticular, subjacente à papilar, é mais fibrosa, exibindo feixes de colágeno tipo I mais densos e proporcionalmente, menos elementos celulares, vasos e nervos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; AARESTRUP, 2012).

Subjacente à derme reticular é encontrada a hipoderme, rica em tecido adiposo unilocular e tecido fibroadiposo. Nesta região, assim como na derme reticular, é observado o maior volume dos anexos epidérmicos – glândulas sebáceas e sudoríparas e folículos pilosos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; AARESTRUP, 2012).

De um modo geral, os anexos têm como função proporcionar uma barreira que protege o corpo contra invasão de microrganismos bem como evitar a perda de água e conseqüente ressecamento da pele. Em muitas lesões que atingem estas camadas, os anexos não são repostos, tendo uma perda da proteção ou da função (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; AARESTRUP, 2012).

2.2. Reparo

O reparo é um processo de reposição tecidual importante para restaurar a integridade de áreas lesadas. Uma série de eventos complexos e sobrepostos visam recuperar tais regiões tanto em sua anatomia quanto em funcionalidade (SNYDER, 2005; CARVALHO et al., 2006).

Independente da área anatômica lesada, são observadas de três a cinco fases no processo de cicatrização, que não acontecem de maneira isolada, mas em transição contínua e gradual, muitas vezes se sobrepondo (ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010; REINK; SORG, 2012). As fases são:

2.2.1. Hemostasia e inflamação

Esta fase ocorre imediatamente após a lesão estimulando a vasoconstrição endotelial e a ativação da cascata de coagulação, resultando em formação de um tampão plaquetário frouxo, provisório. Este tampão inicial é rico em plaquetas que degranulam grânulos alfa, estimulando a secreção de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias (REINK; SORG, 2012; HO et al., 2017).

Destacam-se, inicialmente, o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), tromboxanos e fator ativador de plaquetas (PAF) que unidos farão quimiotaxia para recrutamento de leucócitos associados diretamente à resposta inflamatória no local da ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; REINK; SORG, 2012).

Considerando as células circulantes do sistema imunológico, os neutrófilos são os primeiros a migrar para o leito da ferida onde fagocitarão bactérias, corpos estranhos pequenos e parte do tecido necrosado além de produzirem fatores de crescimento e citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas, IL1- α , IL1- β e IL-6, além do TGF- β (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; REINK; SORG, 2012).

Outra população celular que atua na fase de inflamação são os mononucleares linfócito e macrófago, funcionando de modo recíproco para remoção de restos e fragmentos provenientes da lesão, principalmente após as primeiras 48 a 72 horas. Neste momento, esta população celular libera citocinas pró-inflamatórias vasoativas quimiotáticas como TNF- α , IL-1 (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; REINK; SORG, 2012). Esta mesma interação celular favorecerá suporte de proliferação celular pela liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) assim como TGF- α , TGF- β , PDGF e restauração do tecido pós lesão, uma vez que secreta fatores quimiotáticos que recrutam outras células inflamatórias, a permeabilidade vascular devido a produção de prostaglandinas, estimula a angiogênese e fibroplasia formando a transição para a fase proliferativa (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; MENDONÇA;

COUTINHO-NETTO, 2009; REINK; SORG, 2012). Após a reabsorção do coágulo há formação de crosta fibrinosa sobre a área da lesão assim como amadurecimento da derme subjacente e síntese da lâmina basal (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; REINK; SORG, 2012).

2.2.2. Proliferação

Esta fase tem início entre o 3º e o 14º dia pós lesão e está voltada para o fechamento da ferida, logo, compreende os processos de reepitelização, angiogênese, deposição de matriz extracelular envolvendo a formação de tecido cicatricial jovem denominado tecido de granulação (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; HO et al., 2017). Para tal, há participação do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e VEGF (BARRIENTOS et al., 2008; BARRIENTOS et al., 2014).

A angiogênese acontece, inicialmente, devido a estímulos do TNF- α e é caracterizada pela mitose e migração de células endoteliais com formação de brotos sólidos e posterior canalização dos mesmos, dando origem a formação de capilares (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Isso acontece uma vez que as células endoteliais ativadas secretam enzimas proteolíticas que degradam a camada basal e, dessa forma, os vasos e as células podem proliferar para a ferida e se reconectar para fornecer nutriente ao tecido (REINK; SORG, 2012; HO et al., 2017).

Esses novos vasos fornecerão suporte para que o tecido cicatricial se desenvolva (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). As células endoteliais e os fibroblastos estão envolvidos neste processo, onde a liberação de PDGF estimula sua proliferação, seguido do TGF- β que estimula os jovens fibroblastos a produzirem, inicialmente, colágeno tipo III e outras proteínas da matriz extracelular; se transformarem em miofibroblastos que farão a contração da ferida (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINK; SORG, 2012). Assim, os fibroblastos são células relevantes nesta fase, pois sintetizam a matriz que será o suporte para migração e organização dos demais elementos não só da derme como também da epiderme (HINZ, 2007).

A reepitelização, por sua vez, é possível por mitose de queratinócitos basais que, uma vez ativados, migram das bordas da ferida através do coágulo de fibrina para o centro da lesão sob ação do fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento epitelial (KGF) e à medida que a lâmina basal se estabelece (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; REINK; SORG, 2012). Este processo ocorre até que as células migratórias encontrem a região oposta onde o epitélio se funde e a lesão fecha por “inibição por contato”, similar a um “zíper” (REINK; SORG, 2012).

Posteriormente, a região passará pelo processo de remodelamento (REINK; SORG, 2012).

2.2.3. Remodelamento

A última fase do processo de reparo está voltada para a recuperação normal da estrutura do tecido e se inicia no 8º dia até 1º ano após lesão (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; REINK; SORG, 2012).

Como nas demais fases houve proliferação celular e deposição de matriz, no remodelamento ocorre a maturação do tecido cicatricial. O colágeno tipo III (fibrilas reticulares), produzido na fase proliferativa de função de sustentação de células e estruturas jovens, gradualmente deixa de predominar sobre o colágeno tipo I, mais denso, em feixes, assumindo sua função estrutural (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINK; SORG, 2012). Inicialmente, estes feixes de colágeno na derme reticular se dispõem paralelamente em relação à derme papilar e epiderme, caracterizando o remodelamento da derme em áreas cicatrizadas (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINK; SORG, 2012; DE MENDONÇA, 2018).

Destacam-se os miofibroblastos, células que surgem nas áreas cicatriciais na fase de proliferação, mas cuja função é extremamente relevante no modelamento. Em seu amadurecimento, levam à contração da ferida e ajudam a diminuir a superfície da cicatriz; posteriormente, entram em apoptose (REINK; SORG, 2012).

Fibroblastos e leucócitos participam desta fase secretando colagenase, que degrada a matriz antiga promovendo maior qualidade da cicatriz quando o equilíbrio entre a síntese de nova e antiga matriz é alcançado (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; TZIOTZIOS; PROFYRIS; STERLING, 2012).

Finalmente, o surgimento de novos vasos diminui, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo e atividade metabólica característica da ferida aguda, também (REINK; SORG, 2012).

A diferenciação de queratinócitos resulta na produção da queratina que conseqüentemente permite o desprendimento da crosta, caracterizando o remodelamento da epiderme (TZIOTZIOS; PROFYRIS; STERLING, 2012; REINK; SORG, 2012).

As citocinas e produtos teciduais que participam do processo de cicatrização encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1: Citocinas envolvidas no processo de reparo.

CITOCINA, FC	SÍNTESE	PRINCIPAIS FUNÇÕES	REFERÊNCIA
EGF	Plaquetas Macrófagos Fibroblastos	Proliferação e migração de células epiteliais - Reepitelização.	SHEN et al., 2017.
FGF	Queratinócito Fibroblasto Células Endoteliais	Formação de tecido de granulação; Remodelamento da matriz; Reepitelização	BIENERT et al., 2017.
TGF- β	Queratinócito Macrófago Linfócito Fibroblasto	Proliferação, diferenciação e migração celular; Produção de matriz extracelular e modulação imunológica; Reepitelização.	LICHTMAN; OTERO-VINAS; FALANGA, 2016.
TNF- α	Neutrófilo Macrófago	Inflamação; Reepitelização	BIENERT et al., 2017.
PDGF	Plaquetas Queratinócitos Macrófago Células Endoteliais Fibroblastos	Inflamação; Formação de tecido de granulação; Reepitelização; Remodelamento da matriz	BIENERT et al., 2017.
VEGF	Plaquetas Neutrófilo Macrófago Células endoteliais	Angiogênese; Aumento da permeabilidade vascular; Proliferação e migração de células endoteliais.	ZANG et al., 2017.
IL-1	Neutrófilo Linfócito Macrófago	Inflamação; Reepitelização.	REINK; SORG, 2012.
IL-6	Macrófago Linfócito Células endoteliais	Inflamação; Reepitelização	REINK; SORG, 2012.

Como citado, a pele é um órgão exposto a alterações do meio e agressões químicas, mecânicas e físicas que podem resultar em lesões que comprometem, inevitavelmente, seu funcionamento além de possibilitar complicações (HO et al., 2017). Assim, tratamentos e terapias complementares como os compostos naturais, que reduzam o tempo de fechamento da ferida e/ou que diminuam o risco de complicações durante o processo vêm sendo estudados por diversos autores.

2.2. Banana (*Musa spp.*)

De origem asiática, especificamente do Sudeste e Sul do continente, a bananeira é cultivada atualmente em países de clima tropical e úmido como o Brasil, responsável pela quinta maior produção do mundo segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE – (2015) com produção de 7,1 milhões de toneladas ao ano. O cultivo compreende cerca de 480 mil hectares de área plantada distribuída entre os estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Santa Catarina e Pará (PEREZ, 2002; ALVES, MACHADO; NORONHA, 2011; LINO et al., 2011).

O fruto da bananeira, popularmente denominada banana, é uma monocotiledônea representada pela família Musaceae e o gênero *Musa* (PEREIRA, 2010). Está entre as frutas mais consumidas no mundo e tem grande potencial nutritivo sendo rica em carboidratos, fibras, lipídeos, proteínas e compostos antioxidantes como β -caroteno e vitaminas C e E (KANAZAWA; SAKAKIBARA, 2000; MAINA; HEIDI; SHAGAL, 2012). Além disso, foi descrito por Someya et al. (2002), Melo (2010) e Anal, Jaisanti e Noomhorm (2014), a presença de compostos como dopamina e galocatequina que conferem proteção ao organismo contra os radicais livres. A casca possui componentes secundários ou não essenciais em maior quantidade que na polpa, os quais podemos listar: taninos, oxalatos, flavonoides e fitatos; destaca-se que todos estão em maior abundância na casca verde do que na casca madura (MAINA; HEIDI; SHAGAL, 2012). Para determinar o

grau de maturação os pesquisadores têm utilizado a escala determinada por Von Loesecke (Figura 1).

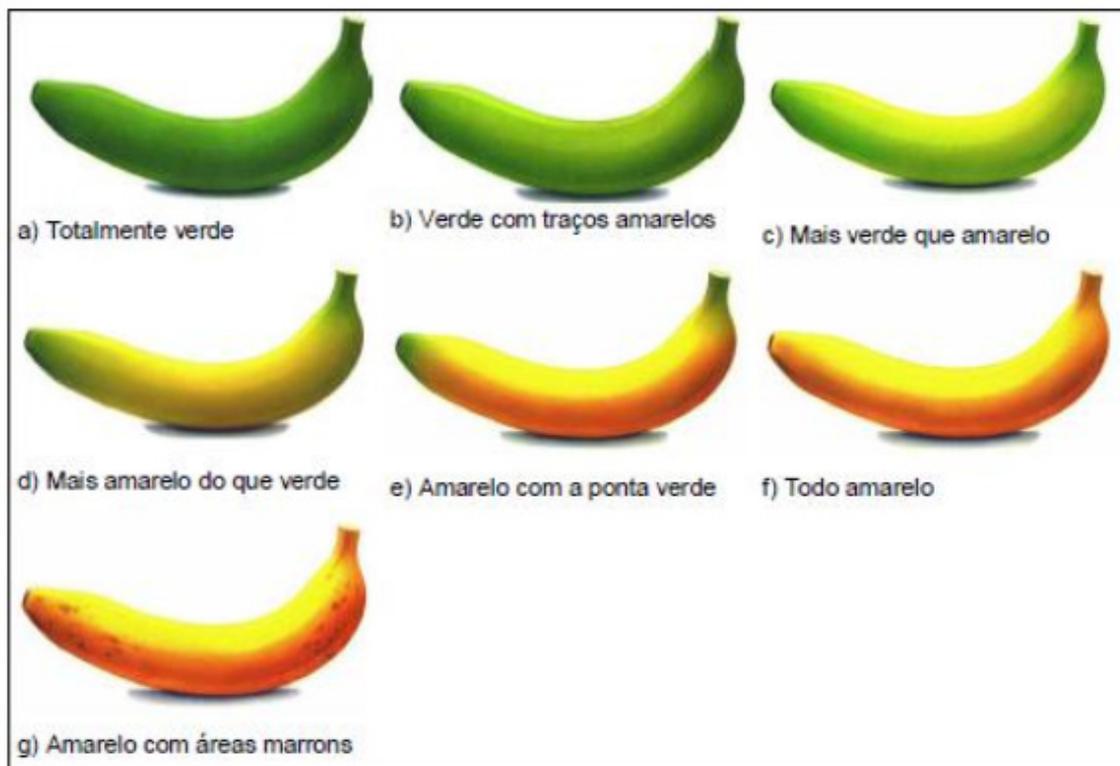


Figura 1: Grau de maturação determinado por Von Loesecke.

Fonte: IZIDORO, 2007.

A importância do fruto vai além das suas propriedades nutritivas, dada sua relevância na taxa de produção e de comercialização (SOMEYA; YOSHIKI; OKUBO, 2002). O cultivo da banana (*Musa spp.*) representa para muitos países destaque econômico e social, contribuindo com fonte de renda, mão-de-obra e desenvolvimento das regiões que cultivam o fruto (FIORAVANÇO, 2003).

Devido à riqueza de substâncias encontradas na banana, o fruto tem sido alvo de pesquisas quanto ao seu potencial no controle da hiperglicemia (DIKSHIT et al., 2012) e do hipercolesterolemia e potencial antioxidante (DIKSHIT et al., 2016), porém o conhecimento quanto à sua ação cicatrizante e antiulcerogênica ainda é muito limitado na literatura.

2.2.1. Componentes da casca verde da banana

Como consequência do alto consumo da banana temos o descarte da casca como resíduo em grande quantidade gerando impacto ambiental (ROSSO, 2009). Cerca de 30 a 40% da massa total do fruto é representada pela casca (EMAGA et al., 2008) sem utilização industrial. Por esta razão, torna-se importante o reaproveitamento da casca, cujo potencial benéfico vem sendo pesquisado.

Possíveis utilizações da casca têm sido propostas por alguns autores como na produção de farinha com propriedades antibacterianas (RATTANAVICHAI; CHENG, 2014); produção de biogás (MOHAPATRA, MISHRA; SUTAR, 2010); obtenção do etanol (OBEROI et al., 2011); incorporado à massa de macarrão (RAMLI et al., 2009), Samad et al. (2017) demonstraram que a casca da banana exerceu atividades antidepressivas e anti-ansiedade em ratos, além de melhorar a memória. Alguns estudos experimentais buscaram determinar a efetividade da casca na cicatrização da pele e a polpa como antiulcerogênico (KUMAR et al., 2013; ATZINGEN et al., 2015).

Entretanto, para explorar as potenciais aplicações da casca da banana é preciso ter conhecimento dos seus componentes químicos e suas propriedades. Segundo Battestin, Matsuda e Macedo (2004) os taninos são compostos fenólicos de alto peso molecular encontrados em folhas, caules, frutos, cascas e sementes tanto em gimnospermas quanto em angiospermas. Sabe-se que este é um dos componentes da casca da banana. Ainda, segundo Atzingen et al. (2015), a casca possui leucocianidina e flavonoides, substâncias que segundo os autores induzem a proliferação celular.

De acordo com Lino et al. (2011), a ação antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante das plantas está associada aos flavonoides e taninos. Portanto, a casca verde da banana pode ser matéria-prima para a obtenção desses compostos bioativos (ROSSO, 2009).

2.2.1.1. Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos de baixo peso molecular, de origem vegetal, derivados de benzopirona e possuem estrutura química de anéis benzênicos e pirano (VIEIRA et al., 2008).

Podem ser encontrados nas frutas, sementes, flores e cascas de árvores, possuem baixo peso molecular e são derivados do metabolismo secundário das plantas. Nos vegetais, sua função consiste basicamente na proteção contra patógenos, herbívoros e radiação ultravioleta (PEREIRA, 2010).

Quando ingeridos, atuam em processos fisiológicos como a absorção de ferro e de vitaminas, possui atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e estimula a proliferação celular favorecendo a cicatrização (VIEIRA et al., 2008).

Com o intuito de identificar o mecanismo de ação dos flavonoides, investigações bioquímicas demonstraram que estes compostos inibem a ação de uma grande quantidade de enzimas como a prostaglandina sintetase responsável pela biossíntese de eicosanoides fundamentais na inflamação, na sensação de dor e no reparo tecidual. Ainda, inibem a enzima hialuronidase prevenindo disseminação de bactérias (VIEIRA et al., 2008).

Süntar et al. (2011), aplicaram extratos aquosos da floração e dos frutos de *Colutea cilicica* em feridas cirúrgicas excisionais experimentais em ratos até completa cicatrização. Foi observado uma porcentagem na redução da ferida equivalente a 78,1% no grupo tratado com o extrato aquoso, enquanto no grupo tratado com Madecassol, pomada utilizada no mercado, apresentaram 100% de redução no mesmo período. Embora o tratamento controle tenha sido mais eficiente, destaca-se que, em análise preliminar dos extratos das partes aéreas e dos frutos de *Colutea cilicica*, os autores identificaram elevado conteúdo de flavonoides e de taninos em sua composição. Os autores ressaltam que os flavonoides têm potencial para promover a cicatrização por apresentar propriedades antimicrobianas e estimular a reepitelização.

2.2.1.2. Taninos

Os taninos são compostos polifenólicos com alto peso molecular provenientes do metabolismo secundário das plantas onde são armazenados em cloroplastos, vacúolos e parede celular. Os taninos podem ser solúveis em água, formando complexos insolúveis com proteínas, ou não solúveis em água, quando associados a polissacarídeos (MONTEIRO et al., 2005; DA SILVA FILHO; ROCHA, 2017).

A adstringência em alimentos e bebidas, bem como as propriedades de precipitar proteínas solúveis, foram as primeiras características na identificação dos taninos. Alguns autores afirmam a participação dessas substâncias na proteção da planta contra herbívoros e doenças como consequência da ligação com as proteínas, ou seja, os taninos participam da defesa natural das plantas (QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO, 2002; CABRAL FILHO, 2004). Atualmente, tal componente químico tem sido investigado quanto ao potencial antioxidante, cicatrizante, antisséptico, antimicrobiano, antifúngico, antidiarreico e hemostático (MONTEIRO et al., 2005; DA SILVA FILHO; ROCHA, 2017).

Existem dois tipos de taninos: os condensados e os hidrolisáveis. Os condensados são conhecidos como protocianidinas devido a característica de adstringência e precipitação de proteínas. As protocianidinas apresentam pigmento avermelhado da classe das antocianidinas, como por exemplo cianidina e delphinidina, as quais possuem grande diversidade estrutural, diversidade de posições entre suas ligações e estereoquímica de seus compostos. Menos abundantes na natureza, os taninos hidrolisáveis são poliésteres de ácidos fenólicos como ácido gálico e possuem uma molécula de D-glucose (MONTEIRO et al., 2005; DA SILVA FILHO; ROCHA, 2017).

Embora seja encontrado em praticamente todos os seres vivos vegetais, a concentração de taninos varia de um indivíduo para outro. É preciso considerar fatores climáticos, região e estágio de maturação do fruto (MONTEIRO et al., 2005; DA SILVA FILHO; ROCHA, 2017).

Usados pelas plantas como proteção, os taninos também podem ser aplicados na saúde humana devido a sua natureza antioxidante e redutora de radicais livres. Em lesões de pele e mucosas os taninos agem como inibidores enzimáticos inespecíficos, o que permite ligação com enzimas e proteínas favorecendo um efeito hemostático e de redução da permeabilidade vascular devido à vasoconstrição local e formação de coágulo. Em feridas na pele a reação tanino-proteínas reduz a hemorragia e compõe um revestimento protetor no tecido rompido (MONTEIRO et al., 2005; DA SILVA FILHO; ROCHA, 2017).

De modo similar às lesões de pele, os taninos podem ser efetivos no tratamento de lesões ulcerativas, pois reagem com as proteínas presentes no muco e em células epiteliais tornando a superfície impermeável bem como protege a região de resíduos gástricos (MONTEIRO et al., 2005; DA SILVA FILHO; ROCHA, 2017).

O potencial inibitório de crescimento microbiano proporcionado pelos taninos já foi descrito em alguns trabalhos e também exhibe propriedades bactericidas ao formar complexos com a parede celular de bactérias, prejudicando a difusão de nutrientes (QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO, 2002; CABRAL FILHO, 2004; GUIMARÃES-BEELLEN et al., 2006).

2.3. Produção dos extratos

Na literatura há uma grande variedade de métodos envolvendo a produção de extratos e amostras usando a casca da banana verde ou madura.

Akamine, Koyama e Yazawa (2009) investigaram o potencial de extratos da casca madura da banana na redução da próstata em ratos tratados com testosterona. Na produção do extrato da casca madura, deixaram o epicarpo em contato com metanol por dois dias em temperatura ambiente, em seguida o produto foi filtrado e concentrado a vácuo, liofilizado e mantido refrigerado até o dia do experimento. Os resultados sugeriram que o extrato pode ser útil no tratamento da hiperplasia benigna da próstata em ratos tratados com o extrato via oral.

Anal, Jaisanti e Noomhorm (2014) processaram as cascas de bananas maduras por diferentes métodos de extração com o objetivo de verificar qual deles resultaria em maior rendimento de compostos fenólicos. Inicialmente, as cascas foram cortadas em tamanhos pequenos e secas a 50°C por 48 horas em forno de ar quente, as amostras secas foram maceradas e mantidas a vácuo. A extração em si foi feita com 100ml de etanol para 5 g do pó usando micro-ondas e ultrassom a 40, 50 e 60°C. Para o micro-ondas o tempo foi de 10, 15 e 20 minutos e para o ultrassom foi de 30, 60 e 90min. Por fim, as soluções foram filtradas em papel filtro e os solventes evaporados usando rotatório evaporador a 50°C e pressão a milibar (mbar). Os autores concluíram que a temperatura mais elevada juntamente com o maior tempo resultou em alto rendimento do extrato bem como de conteúdo fenólico. Ainda, segundo os autores, a extração pelo ultrassom resultou em maior conteúdo fenólico quando comparado ao micro-ondas a vácuo.

Lino et al. (2011) realizaram a extração de taninos e flavonoides pelo método de decocção. Foram utilizadas 250g do epicarpo fatiado adicionado a 1,8L de água destilada onde o material foi mantido em fervura por 2h em uma almofada de aquecimento. Em seguida o material foi filtrado e armazenado sob refrigeração a 4°C.

De maneira simples, Atzingen et al. (2015) prepararam um gel utilizando a casca verde da banana. Pela escala de Von Loeseck foram selecionadas apenas bananas completamente verdes, lavadas em água corrente e deixadas para secar a temperatura ambiente seguido por uma segunda lavagem com 500ml de água destilada secas em toalha de papel e deixadas a temperatura ambiente por 20min. Em seguida, a polpa foi descartada e a casca foi cortada em cubos e moídas em pilão por 60min até completa homogeneização. A casca da banana moída foi pesada e incorporada ao gel de Natrosol, sendo o produto finalizado com 4% da casca. O gel foi aplicado em feridas cutâneas cirúrgicas em ratos concluindo que o mesmo possuiu ação anti-inflamatória e apresentou potencial cicatrizante.

Até o momento, não foram publicados estudos *in vitro* com extratos provenientes de partes da banana ou bananeira quanto a toxicidade ou proliferação de fibroblastos.

3. HIPÓTESE

Extratos hidroalcoólicos obtidos da casca verde da banana, aplicados topicamente, estimulam a proliferação e diferenciação epidérmica e remodelamento dérmico, favorecendo a cicatrização cutânea.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Avaliar o potencial cicatrizante de extratos hidroalcoólicos obtidos a partir da casca verde da banana por meio de estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

4.2. Específicos

- Avaliar a toxicidade dos extratos em culturas de fibroblastos humanos;
- Avaliar o estímulo à proliferação celular de fibroblastos cultivados com os extratos em cultura;
- Avaliar, morfometricamente, a contração da ferida cirúrgica cutânea em ratos Wistar;
- Avaliar, descritivamente, as características histopatológicas da área em reparo das amostras cutâneas, provenientes dos animais do experimento, a saber:
 - Reepitelização e crosta na epiderme;
 - Intensidade e localização da reação inflamatória na derme (edema, vasodilatação, tipo de infiltrado);
 - Estabelecimento e amadurecimento de tecido de granulação na derme seu remodelamento.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção e Seleção das Bananas (*Musa sp.*)

As bananas utilizadas no experimento foram coletadas no município de Piau, localizado na região da Zona da Mata Mineira que possui a produção de banana como principal fonte econômica.

O espécime foi reconhecido pela equipe do Herbário Leopoldo Krieger no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF (MG) como sendo o gênero *Musa* cuja casca do fruto foi usada como matéria prima no preparo dos géis.

5.2. Preparo do Gel com a Casca Verde *In Natura*

Foi utilizada a escala para amadurecimento dos frutos definida por Von Loeseck, apenas frutos totalmente verdes foram selecionados para o preparo do gel. Inicialmente os frutos foram lavados com água corrente e esponja macia, em seguida neutralizados com água destilada e deixados para secar durante 20 minutos. Após esse tempo, a polpa foi descartada e 20 gramas da casca fatiada em cubos e transferida para um graal onde foi pulverizada com pistilo por 60 minutos. Posteriormente, 6 gramas do material fragmentado foi incorporado a 144 gramas do gel de Natrosol usado como veículo, totalizando 150g de produto final com 4% de concentração, que foi definida como ótima por Atzingen et al. (2011), assim como o preparo do produto.

5.3. Obtenção dos Extratos da Casca Verde

Guo et al. (2007) encontraram maior teor de taninos extraídos da raiz de *Euphorbia hylonoma* utilizando etanol como solvente. Mallmanna et al. (2018) realizaram extração de folhas e raízes de *Acanthospermum australe* pelo método de maceração usando etanol como solvente na concentração de 9:1 onde encontraram a presença de taninos e flavonoides no fim do procedimento de extração. É sabido que os polifenóis possuem uma natureza polar e por essa razão são facilmente solubilizados em meio prótico polar como em soluções hidroalcoólicas.

O processo de extração foi inspirado no realizado por Mallmanna et al. (2018) com algumas adaptações. Utilizando a escala de Von Loeseck foram separados frutos totalmente verdes para o experimento que contou com a extração da casca da banana prata seca (dry BPE) e fresca (fresh BPE).

Para a obtenção do dry BPE os frutos foram lavados em água corrente e esponja macia, secos a temperatura ambiente e em seguida separado a polpa da casca que foi fatiada em cubos e colocados para secagem em estufa a 35°C durante 15 dias. Após esse tempo as cascas secas foram pulverizadas e o material (760,579g) colocado em maceração com etanol e água na proporção de 9:1 em um volume de 2L de solução. Durante 30 dias o solvente foi submetido à rotaevaporação em rotaevaporador marca Buchi, modelo R11, bomba a vácuo marca Buchi modelo V-700 e Banho Ultratermostático, marca Cientec, modelo CT-281-28, com temperatura em torno de 40°C e baixa pressão.

Para a obtenção do fresh BPE os frutos lavados em água corrente e esponja macia e em seguida separado a polpa da casca. Um total de 2.200g de casca fresca foi fatiada em cubos e colocado em maceração com etanol e água na concentração de 9:1 em um volume de 4,5 litros de solução. Durante 30 dias o solvente foi submetido à rotaevaporação em rotaevaporador marca Buchi, modelo R11, bomba a vácuo marca Buchi modelo V-700 e Banho Ultratermostático, marca Cientec, modelo CT-281-28, com temperatura em torno de 40°C e baixa pressão.

O extrato obtido através da casca seca apresentou consistência líquida enquanto o extrato obtido através da casca fresca apresentou consistência sólida.

5.4 Preparo do Gel com os Extratos da Casca Verde Seca e Fresca

Para o dry BPE foram produzidos géis nas concentrações de 2%, 4% e 10% e para o fresh BPE foram produzidos géis nas concentrações de 4% e 10%.

Para o preparo do gel a 2% pesou-se 3g do extrato que em seguida foi diluído em 1,5g de glicerina e incorporado a 155,5g do gel de Natrosol.

Para o preparo do gel a 4% pesou-se 6g do extrato que em seguida foi diluído em 1,5g de glicerina e incorporado a 142,5g do gel de Natrosol.

Para o preparo do gel a 10% pesou-se 15g do extrato que em seguida foi diluído em 1,5g de glicerina e incorporado a 133,5g do gel de Natrosol.

5.5. Experimento *In Vitro*

5.5.1 Cultura de Fibroblastos

Foram utilizados fibroblastos de humanos adultos obtidos por meio de cirurgia de bleferoplastia, na Clínica de Olhos da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte e Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais. As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich) suplementos: 5mM de bicarbonato de sódio e 10% soro fetal bovino em pH 7,2, estéril. Os dois extratos obtidos foram diluídos em DMSO na concentração final de 3% e em meio de cultura resultando em duas soluções concentradas (uma solução para cada tipo de extrato obtido).

As soluções obtidas foram diluídas em meio de cultura nas concentrações de 1%, 2%, 4%, 10% e 15% para ambos os extratos. Foi feito o plaqueamento e incubação para 24h e 48h. Após esse tempo foi adicionado o reagente de MTT (brometode3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium) e a placa foi posta em uma estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 3 horas. O reagente MTT em contato com o

metabolismo celular é reduzido a cristais de formazan que possui uma coloração púrpura. A intensidade da cor na placa foi lida em espectrofotômetro marca Thermo Scientific modelo Multiskan Go, para visualizar o número de células viáveis. Todo o experimento foi realizado em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com luz ultravioleta (UV) assim como todos os instrumentos utilizados (Figura 2).

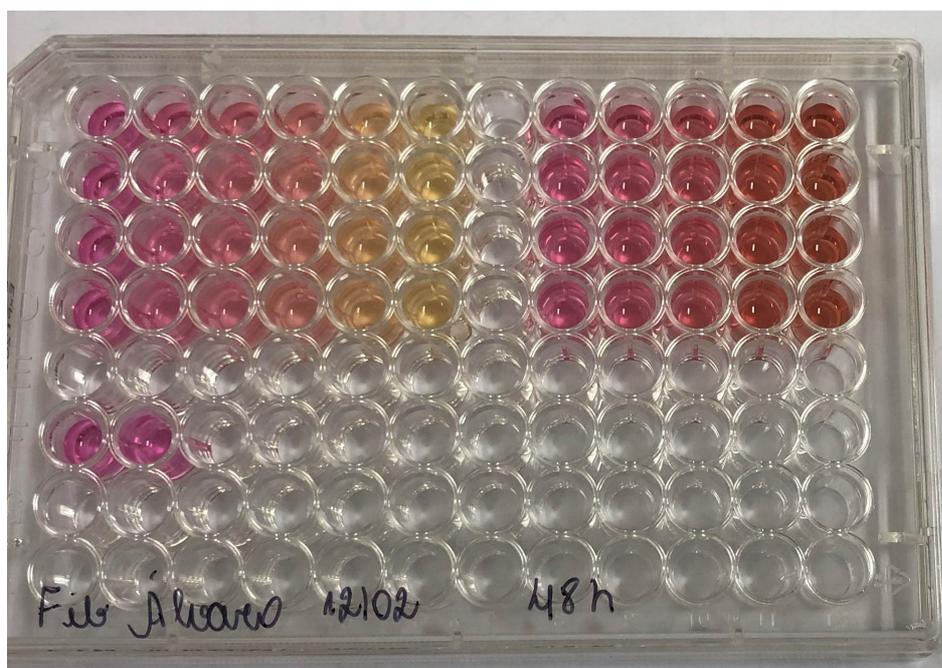


Figura 2: Imagem da placa de 96 poços com fibroblastos cultivados com os extratos em diferentes concentrações (1%, 2%, 4%, 10%, 15%).

Fonte: Arquivo pessoal do autor, 2019.

5.6. Experimento *In Vivo*

5.6.1 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar (N=56), machos, com cerca de 12 semanas e em torno de 250-300 gramas provenientes do biotério da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF (MG) cadastrado pelo CONCEA. Durante o experimento os animais ficaram alojados em gaiolas individuais; os ambientes contaram com controle de temperatura (22 °C em média) e umidade relativa mantida em torno de 40-60%; fotoperíodo alternado (12 horas claro/12 horas escuro); com água e comida *ad libitum*.

O desenvolvimento do modelo experimental foi realizado dentro do próprio biotério.

5.6.2. Confeção da ferida cirúrgica

Para a confecção das feridas cirúrgicas os animais receberam anestesia via intraperitoneal com a combinação do anestésico dissociativo cloridrato de quetamina na dose de 90mg/kg (Vernacol[®], Koning – Brasil) e o sedativo e miorelaxante cloridrato de xilazina na dose de 10mg/kg (Kenso[®], Koning – Brasil). Em seguida, o pelo de uma área 6cm x 5cm da região dorsal foi removido na direção céfalo-caudal com o auxílio de uma máquina. Com uso de um lápis foi delimitado uma área de 3cm x 2cm em forma de elipse e, após assepsia local com álcool iodado 2%, usando material previamente esterilizado, a região foi pinçada e o fragmento do tecido retirado usando uma tesoura de ponta reta obedecendo os limites anteriormente demarcados sem romper a fáscia. A cirurgia foi realizada dentro de capela de fluxo laminar com o animal sobre uma placa aquecida e a região dorsal coberta por campo cirúrgico.

Após o procedimento os animais receberam analgesia com Tramadol (10mg/kg) duas vezes ao dia durante 48 horas e ficaram em observação em gaiolas individuais de polipropileno (sistema *open cage*) em estantes climatizadas com temperatura controlada (25°C) durante 24 horas. Em seguida, foram transferidos para gaiolas individuais com microisolador e permaneceram em raques ventiladas até o término do experimento. A divisão dos grupos de animais assim como os respectivos tratamentos estão apresentados na figura 3.

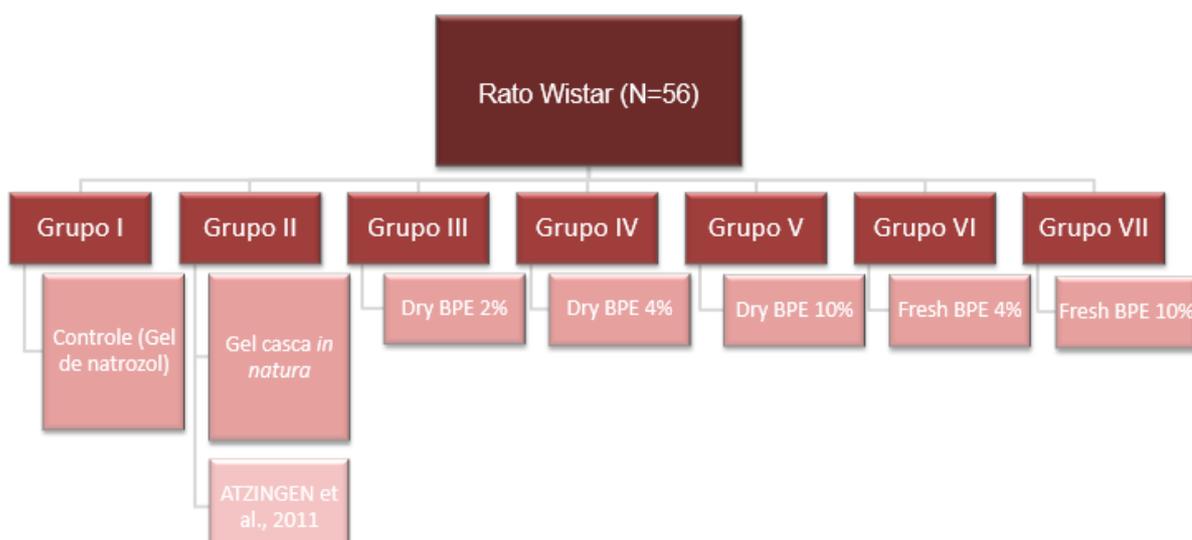


Figura 3: Divisão dos grupos.

Fonte: Arquivo pessoal do autor, 2019.

5.6.3. Tratamento

Os animais receberam tratamento tópico, diariamente, 2h após o procedimento cirúrgico até o 9º dia após a confecção das feridas.

No 10º dia os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica via intraperitoneal com a combinação do anestésico dissociativo cloridrato de quetamina na dose de 90mg/kg (Vernacol®, Koning – Brasil) e o sedativo e miorelaxante cloridrato de xilazina na dose de 10mg/kg (Kensol®, Koning – Brasil) seguida por ruptura diafragmática.

As amostras de pele retiradas foram fixadas em formalina 10% e submetidas ao processamento histológico de rotina, emblocadas em parafina de modo que evidenciasse as camadas da pele (epiderme e derme) e os cortes de 4µm foram corados pela hematoxilina e eosina. As lâminas histológicas foram fotografadas por uma câmera AXIOCAM ICc 5 acoplada em microscópio trinocular AXIOSTAR PLUS ZEISS, e avaliadas em toda extensão do corte para avaliação descritiva da área em cicatrização bem como quantificação semiautomática do infiltrado inflamatório.

5.6.4 Morfometria da contração da ferida

As áreas cruentas persistentes da lesão cirúrgica inicial foram fotografadas por uma câmera digital Nikon Colpix 995, 3.34 megapixel, objetiva a 40 cm de distância, posicionada paralelamente por suporte fixo ao dorso do animal e fonte de luz fixa. As imagens digitalizadas foram submetidas à morfometria automática pelo programa Zen Pro 2011. Por meio da diferença entre tamanho final e tamanho inicial, o resultado obtido foi expresso por porcentagem média (SD±) de área de fechamento da ferida e nível de significância $p < 0,001$ (figura 4).

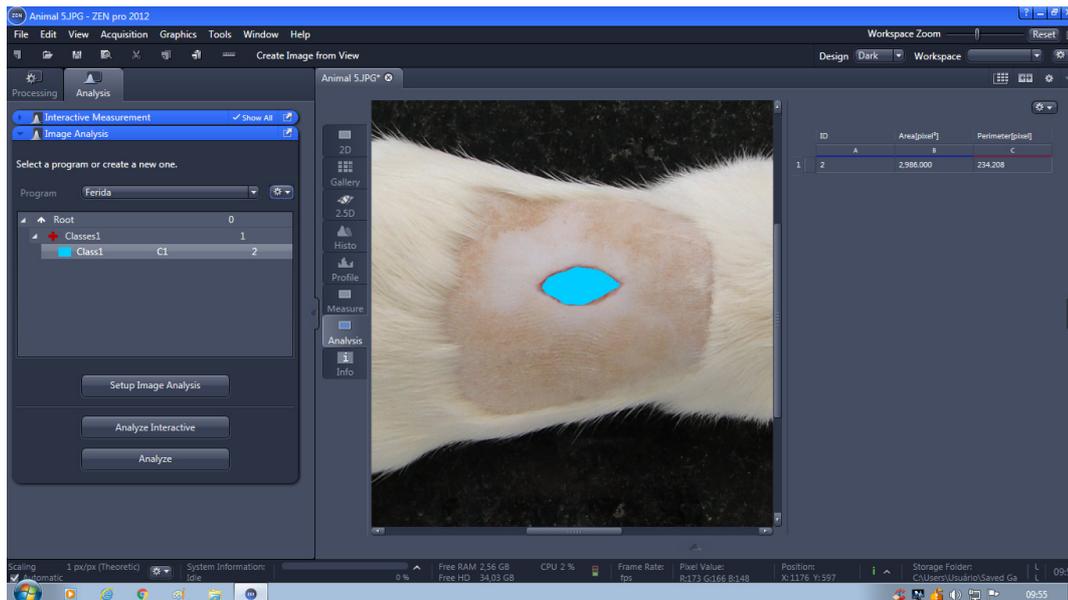


Figura 4: Imagem representativa do método utilizado para quantificar a contração da ferida usando o programa Zen Pro 2011.

Fonte: Arquivo pessoal do autor, 2019.

5.6.5 Análise Histopatológica

5.6.5.1 Avaliação Histopatológica Descritiva

Toda a extensão dos cortes corados em HE foram avaliados por dois patologistas e realizada a análise descritiva em aumento de 100x em microscópio Zeiss avaliando as áreas correspondentes à epiderme e à derme. Na epiderme foi avaliado a reepitelização, ceratinização e crosta; na derme foi observado presença e caracterização do infiltrado inflamatório, presença e amadurecimento do tecido de granulação, remodelamento da matriz extracelular colagenosa.

5.6.5.2 Histomorfometria do Infiltrado Inflamatório

Foram realizadas fotomicrografias em aumento de 400x das bordas e do centro, tanto em profundidade quanto em superfície, da área correspondente à lesão inicial em cada amostra para realização de morfometria semiautomática de células do infiltrado inflamatório. O critério para seleção das bordas foram regiões onde não havia presença de anexos epidérmicos uma vez que esses elementos não regeneram após lesão. Os resultados foram expressos em mediana ($SE\pm$) e nível de significância $p < 0,01$.

5.7. Análise Estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão e mediana e erro padrão. Para verificar a normalidade da amostra foi feito o teste D'Agostino e Pearson. A diferença entre os dados paramétricos foi testado pelo teste de análise de variância ANOVA seguida do pós teste Tukey para identificação entre os pares de grupos. A diferença entre os dados não paramétricos foi testado através do teste kruskal-wallis seguido do teste de Comparação Múltipla de Dunn's. Os dados da análise de viabilidade celular (MTT) foram expressos em porcentagem. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste t de student não pareado. Foi considerado o intervalo de compatibilidade de 95% e o valor de probabilidade $p < 0,05$. Os dados estatísticos foram analisados no Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA).

Além dos testes de probabilidade, para as implicações práticas dos resultados e o julgamento de compatibilidade da importância ou não dos efeitos testados foram calculadas as taxas de aumento ou redução percentual das médias aritméticas de cada grupo comparadas ao controle.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desse trabalho serão apresentados na forma de artigo de acordo com regras pré estabelecidas pelo Programa de Pós Graduação em Saúde: Área de Concentração Saúde Brasileira da faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

7. CONCLUSÃO

O extrato obtido da casca verde seca da banana a 2% se mostrou, no modelo estudado, o melhor tratamento, visto que induziu a proliferação de fibroblastos humanos em cultura, reepitelização da epiderme e remodelamento da derme.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, B. J. **Histologia essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 389-407.
- AGARWAL, P. K. et al. Evaluation of wound healing activity of extracts of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisica*) in rats. **Indian J Exp Biol**. v. 47, p. 32-40, 2009.
- AKAMINE, K.; KOYAMA, T.; YAZAWA, K. Banana peel extract suppressed prostate gland enlargement in testosterone-treated mice. **Biosci Biotechnol Biochem**. v. 73, n. 9, p. 1911-1914, 2009.
- ALVES, H.; MACHADO, T. M.; NORONHA, A. M. N. W. Análise qualitativa do processo de reparo em cicatriz cirúrgica de ratos tratados com extrato de *Musa sapientum*, *Aloe vera*, colagenase e placebo. **Revista Ciências em Saúde**. v. 1, n. 2, p. 8, 2011.
- ANAL, A. K.; JAISANTI, S.; NOOMHORM, A. Enhanced yield of phenolic extracts from banana peels (*Musa acuminata* Colla AAA) and cinnamon barks (*Cinnamomum varum*) and their antioxidative potentials in fish oil. **J Food Sci Technol**. v. 51, n. 10, p. 2632-2639, 2014.
- ANDRADE, A. G.; LIMA, C. F.; ALBUQUERQUE, A. K. B.; Effects of the therapeutic laser on the wound healing of burns: a bibliographic review. **Rev Bras Queimaduras**. v. 9, n. 1, p. 21-30, 2010.
- ATZINGEN, D. A. N. C. V. et al. Gel from unripe *Musa sapientum* peel to repair surgical wounds in rats. **Acta Cir Bras**. v. 26, n. 5, p. 379, 2011.
- ATZINGEN, D. A. N. C. V. et al. Unripe *Musa sapientum* peel in the healing of surgical wounds in rats. **Acta Cir Bras**. v. 28, n. 1, p. 33, 2013.
- ATZINGEN, D. A. N. C. V. et al. Repair of surgical wounds in rats using a 10% unripe *Musa sapientum* peel gel. **Acta Cir Bras**. v. 30, n. 9, p. 586-592, 2015.
- BARRIENTOS, S. et al. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen**. v. 22, n. 5, p. 569-578, 2014.
- BARRIENTOS, S. et al. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen**. v. 16, n. 5, p. 585-601, 2008.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e Tanases em alimentos. **Alim Nutr.** v. 15, n. 1, p.63-72, 2004.

BIENERT, M. et al. Growth factor-functionalized silk membranes support wound healing in vitro. **Biomed Mater.** v. 12, n. 4, p. 045023, 2017.

BOULAIS. N. et al. Merkel cells as putative regulatory cells in skin disorders: an in vitro study. **PLoS ONE.** v. 4, n. 8, p. e6528, 2009.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg.** v. 117, p. 12-34, 2006.

CABRAL FILHO, S. L. S. **Efeito do teor de tanino do sorgo sobre a fermentação ruminal e parâmetros nutricionais dos ovinos.** 2004. 64f. Tese (Doutorado em ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arq Bras Cir Dig.** v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CARVALHO, P. T. C. et al. Analysis of the influence of low-power HeNe on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cir Bras.** v. 21, n. 3, p. 177-183, 2006.

DA SILVA FILHO, A. A.; ROCHA, F. D. **Taninos.** In: FURTADO, N. A. J. C.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R. (Org.). **Taninos.** São Paulo: Atheneu, 2017, p. 407-422, cap. 7.

DE MENDONÇA, M. C. C., **Peeling de fenol pontuado no tratamento do fotoenvelhecimento facial:** estudo histoquímico e imuno-histoquímico. 2018. 95f. Tese (Doutorado em Saúde) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.

DIKSHIT, P. Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of the stem of *Musa sapientum* Linn. in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Diabetes.** v. 4, n. 4, p. 378-385, 2012.

DIKSHIT, P. et al. Antihypercholesterolemic and antioxidant effect of sterol rich methanol extract of stem of *Musa sapientum* (banana) in cholesterol fed wistar rats. **J Food Sci Technol.** v. 53 n. 3 p.1690-1697, 2016.

EMAGA, T. H. et al. Characterisation of pectins extracted from banana peels (*Musa AAA*) under different conditions using an experimental design. **Food Chem.** v. 108, p. 463-471, 2008.

FIORAVANÇO, J. C. Mercado mundial de banana: produção, comércio e participação brasileira. **Informações Econômicas**. v. 33, n. 10, p. 1-13, 2003.

GUIMARÃES-BEELEN, P. M. et al. Effects of condensed tannins from northeastern semi-arid shrubs on growth and cellulolytic activity of *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arq Bras Med Vet Zootec**. v. 58, n. 5, p. 910-917, 2006.

GUO, Z. J.; SUN, Q. S.; LONG, L. H.; BU, X. Q. Studies on the methods of extract and determination of total tannins and gallic acids of the root of *Euphorbia hylonoma*. **Zhong Yao Cai**. v. 30, n. 11, p. 1398-1401, 2007

HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **J Invest Dermatol**. v. 127, n. 3, p. 526-537, 2007.

HO, J. et al. Current advancements and strategies in tissue engineering for wound healing: A comprehensive review. **Adv Wound Care**. v. 6, n. 6, p. 191-209, 2017.

IZIDORO, D. R. **Influência da polpa de banana (*musa cavendishii*) verde no comportamentoreológico, sensorial e físico-químico de emulsão**. 2007. 133f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de tecnologia, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2007.

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

KANAZAWA, K.; SAKAKIBARA, H. High content of dopamine, a strong antioxidant, in *Cavendish* banana. **J Agric Food Chem**. v. 48, p. 844-848, 2000.

KUMAR, M. et al. Healing effects of *Musa sapientum* var. *paradisiacain* diabetic rats with co-occurring gastric ulcer: cytokines and growth factor by PCR amplification. **BMC Complement Altern Med**. v. 13, p. 305, 2013.

LEE, N.; ROBINSON, J.; LU, H.; Biomimetic strategies for engineering composite tissues. **Curr Opin Biotechnol**. v. 21, n. 40, p. 64-74, 2016.

LINO, P. B. et al. Evaluation of post-surgical healing in rats using a topical preparation based on extract of *Musa sapientum* epicarp. **Braz J Pharmacogn**. v. 21, n. 3, p. 491-496, 2011.

LINS, U. A. D. R. et al. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **An Bras Dermatol**. v. 85, n. 6, p. 849-855, 2010.

MACEDO, A. C. B.; OLIVEIRA, S. M. Atuação da fisioterapia no pré e pós-operatório de cirurgia plástica corporal: uma revisão de literatura. **Cad Esc Sau.** v. 1, n. 4, p. 185-201, 2010.

MAINA, H. M.; HEIDI, E. S.; SHAGAL, M. H. Analytical screening of nutritional and nonessential components in unripe and ripe fruits of banana (*Musa sapientum*). **J Med Plants Res.** v. 1, n. 3, p. 20-25, 2012.

MALLMANNA, R. et al. Effectiveness of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze against diarrhea-inducing bacteria. **Braz J Biol.** v. 78, n. 4, p. 619-624, 2018.

MELO, A. A. M. **Estresse oxidativo em banana 'prata' minimamente processada tratada com antioxidantes e avaliado em camundongo APO-EI.** Viçosa – MG, 2010, 76p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal), Departamento de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 2010.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol.** v. 84, n. 3, p. 200-205, 2009.

MOHAPATRA, D.; MISHRA, S.; SUTAR, N. Banana and its by-product utilization: an overview. **J Sci Ind Res.** v. 69, p. 323-329, 2010.

MONTEIRO, J. M. M. et al. Tannis: from chemistry to ecology. **Quím Nova.** v. 25, n. 5, p. 892-896, 2005.

OBEROI, H. S. et al. Ethanol production from banana peels using statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process. **Waste Manag.** v. 31, n. 7, p. 1576-1584, 2011.

PEREIRA, A. **Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa spp*).** 2010. 138f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis, 2010.

PEREZ, L.H. Distribuição geográfica da bananicultura no Estado de São Paulo, 1983-2001. **Informações Econômicas.** v. 32, n. 4, p. 41, 2002.

QUEIROZ, C. R. A. dos A; MORAIS, S. A. L; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*myracrodruon urundeuva*). **Rev Árvore.** v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.

RAMLI, S. et al. Utilization of banana peel as a functional ingredient in yellow noodle. **As J Food Ag-Ind.** v. 2, n. 3, p. 321-329, 2009.

RATTANAVICHAI, W., CHENG, W. Effects of hot-water extract of banana (*Musa acuminata*) fruit's peel on the antibacterial activity, and anti-hypothermal stress, immune responses and disease resistance of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbegii*. **Fish Shellfish Immunol.** v. 39 n. 2 p. 326-335, 2014.

REINK, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **Eur Surg Res.** v. 49, p. 35-43, 2012.

ROSSO, S. R. **Aproveitamento do resíduo da agroindústria da banana: caracterização química e levantamento de parâmetros termodinâmicos.** 2009. 144f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Desenvolvimento de Processos na Indústria de Alimentos, UFSC, Florianópolis, 2009.

SAMAD, N. et al. Banana fruit pulp and peel involved in antianxiety and antidepressant effects while invigorate memory performance in male mice: Possible role of potential antioxidants. **Pak J Pharm Sci.** v. 30, n. 3, p.989-995, 2017.

SNYDER, R. J. Treatment of nonhealing ulcers with allografts. **Clin Dermatol.** v. 23, p. 388-395, 2005.

SOMEYA, S.; YOSHIKI, Y.; OKUBO, K. Antioxidant compounds from bananas (*Musa cavendish*). **Food Chem.** v. 79, p. 351-354, 2002.

SÜNTAR, I. P. et al. Assessment of wound healing activity of the aqueous extracts of *Colutea cilicica* Boiss. & Bal. fruits and leaves. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** p. 2011-2017, 2011

TZIOTZIOS, C.; PROFYRIS, C.; STERLING, J. Cutaneous scarring: pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics. **J Am Acad Dermatol.** v. 66, n. 1, p. 13-24, 2012.

VIEIRA, A. P. et al. Ação dos flavonoides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina Cienc Biol Saude.** v. 29, n. 1, p. 65-74, 2008.

ANEXO I



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 034/2017 – CEUA sobre “Avaliação do efeito da casca verde da banana (*Musa sapientum*) e do alecrim (*baccharis dracunculifolia*) no reparo de feridas cutâneas cirúrgicas em ratos Wistar: Análise histopatológica”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Beatriz Julião Vieira Aarestrup com a colaboração de Alvaro César Dutra Presto e Ademar Alves da Silva Filho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 10/10/2017. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 64 ratos heterogênicos Wistar machos de 12 semanas de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período 01/11/2017 a 01/11/2018.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 034/2017 – CEUA about “Avaliação do efeito da casca verde da banana (*Musa sapientum*) e do alecrim (*baccharis dracunculifolia*) no reparo de feridas cutâneas cirúrgicas em ratos Wistar: Análise histopatológica”, under responsibility of Beatriz Julião Vieira Aarestrup and collaboration of Alvaro César Dutra Presto e Ademar Alves da Silva Filho is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 10/10/2017. For the development of the research will be used 64 male heterogenic Wistar rats of 12 weeks of age, as requested and that will be used in the period 01/11/2017 to 01/11/2018.

Juiz de Fora, 25 de outubro de 2017

P: 

Vice-coordenadora
CEUA



Coordenadora
CEUA

ANEXO II

Meio de cultura basal

O meio de cultura basal consistiu de DMEM-*high glucose* (Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio (Cinética Química Ltda), 100 U/mL de penicilina, 0,10 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich), 60 mg/L de gentamicina (Schering-Plough) e 10% de SFB (Cripion Biotecnologia Ltda).

O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm (Millipore).

Cultivo dos fibroblastos humanos

Os fibroblastos humanos foram obtidos da pele da pálpebra superior de adultos submetidos a bleferoplastia, na Clínica de Olhos da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte e Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais. O isolamento, cultivo e caracterização dessas células foi realizado anteriormente (Martins et al. 2014). O estudo foi realizado de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer nº ETIC.02887512.6.0000.5149).

A cada dois dias o meio de cultura foi removido e substituído por novo meio de cultura basal. Quando as células atingiram 70-80% de confluência, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,2 e tratadas com 1 mL de tripsina 0,05% ácido tetracético etilenodiamidina (EDTA; Invitrogen), por 5 minutos. Após a ação da tripsina, esta foi inativada com meio de cultura basal (9 mL), a suspensão formada foi dividida em duas novas garrafas de cultura celular T-75 e acrescentado mais meio de cultura basal. As células foram expandidas dessa maneira para serem utilizadas no ensaio de viabilidade celular.

Viabilidade celular *in vitro*

A viabilidade dos fibroblastos humanos após o tratamento com os extratos secos e aquoso foram avaliadas pelo ensaio colorimétrico de MTT (Invitrogen). Este baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes em células viáveis, em converter o sal de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium, que é solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água. O número de células viáveis é diretamente proporcional à quantidade de cristais de formazan produzido (Mosmann, 1983).

Os fibroblastos humanos, na 5ª passagem, foram semeados em placas de 96 poços (Sarstedt) na densidade de 1×10^4 células/poço contendo 150 μL do meio de cultura basal. As células foram incubadas a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO_2 por 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi removido e substituído por 150 μL /poço do meio de cultura basal com os respectivos tratamentos: extrato seco e extrato aquoso, nas concentrações de 1%, 2%, 4%, 10% e 15%, e os controles, e incubado por 24 e 48 horas. Após os tempos de incubação, foi acrescentado 100 μL /poço de solução de MTT 5 mg/mL (Invitrogen) e a placa incubada em estufa a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO_2 , por 4 horas.

Após o período de incubação as células foram observadas ao microscópio invertido trinocular Physis para visualização dos cristais de formazan. Estes foram solubilizados através da adição de 100 μL por poço de solução de isopropanol - HCl 0,05 M, por 30 minutos sob agitação. Em seguida, a densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro marca Thermo Scientific modelo Multiskan Go a 570 e 645 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata. Durante o experimento, todos os passos envolvendo o reagente MTT foram executados em condições mínimas de luminosidade.

Referências

Martins, T. M. M., A.C.C. de Paula, D.A. Gomes, and A.M. Goes. 2014. "Alkaline Phosphatase Expression/Activity and Multilineage Differentiation Potential Are the Differences Between Fibroblasts and Orbital Fat-Derived Stem Cells – A

Study in Animal Serum-Free Culture Conditions.” *Stem Cell Reviews and Reports* 10 (5). doi:10.1007/s12015-014-9529-9.

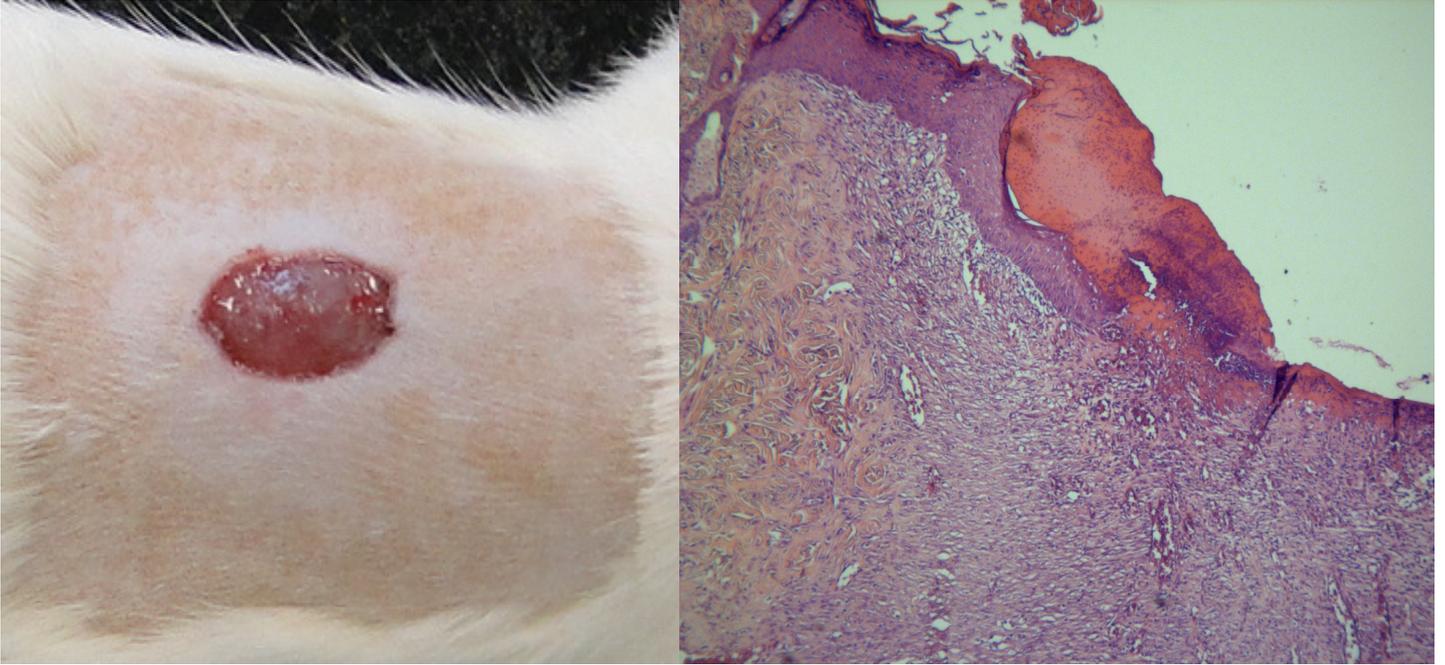
Mosmann, T. 1983. “Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.” *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2): 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.

ANEXO III

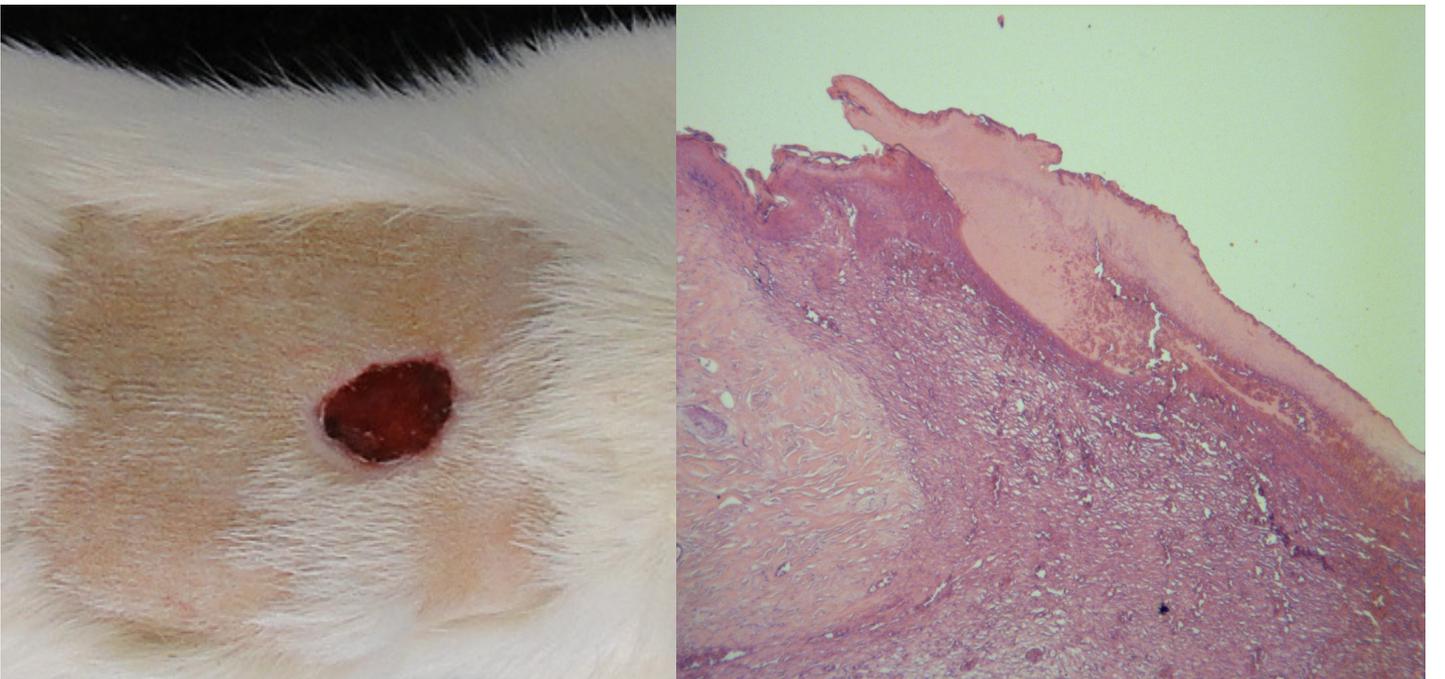
PROTOCOLO COLORAÇÃO HE

SEQUÊNCIAS			
ETAPA	ESTÁGIO	AGENTE / observação	DURAÇÃO
1	Desparafinização	Estufa 60 °C	30 min
2	Desparafinização	Xilol I	5 min
3	Desparafinização	Xilol II	5 min
4	Desparafinização	Xilol III	5 min
5	Hidratar	Álcool Etílico 100% I	5 min
6	Hidratar	Álcool Etílico 100% II	5 min
7	Hidratar	Álcool Etílico 100% III	5 min
8	HEMATOXILINA	Corante básico	5 min
9	Lavagem	Água corrente = VIRAGEM	20 min
10	Desidratação	Álcool Etílico 100% I	5 min
11	Desidratação	Álcool Etílico 100% II	5 min
12	Desidratação	Álcool Etílico 100% III	5 min
13	EOSINA	Coloração ácida	2 min
14	Lavagem	Álcool Etílico 100% I - Passar uma lâmina por vez no borrel	3 passagens
15	Lavagem	Álcool Etílico 100% II - Passar uma lâmina por vez no borrel	3 passagens
16	Lavagem	Álcool Etílico 100% III - Passar uma lâmina por vez no borrel	3 passagens
17	Diafanização	Xilol I	5 min
18	Diafanização	Xilol II	5 min
19	Diafanização	Xilol III	5 min
20	Montagem	Material: lamínulas e entellan	-----
RESULTADO		Tons de roxo azulado: núcleo e o nucléolo	basofílico
		Tons de rosa avermelhado: citoplasma e componentes extracelulares	acidofílicas

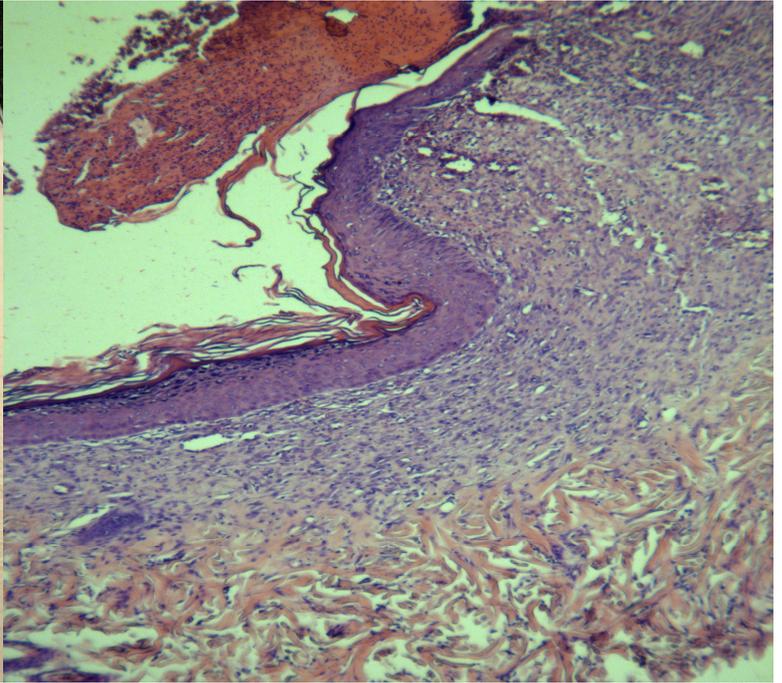
APÊNDICE I



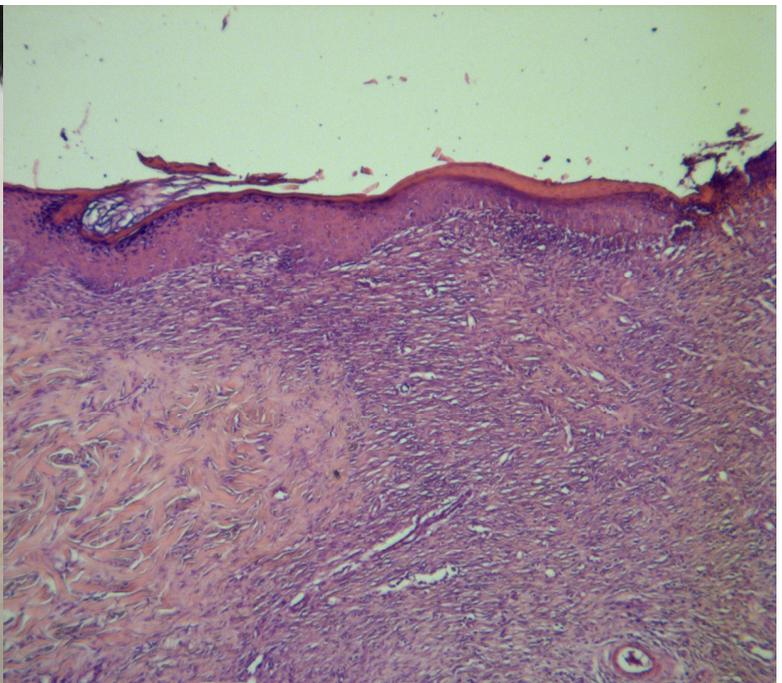
GRUPO I: Controle sem tratamento



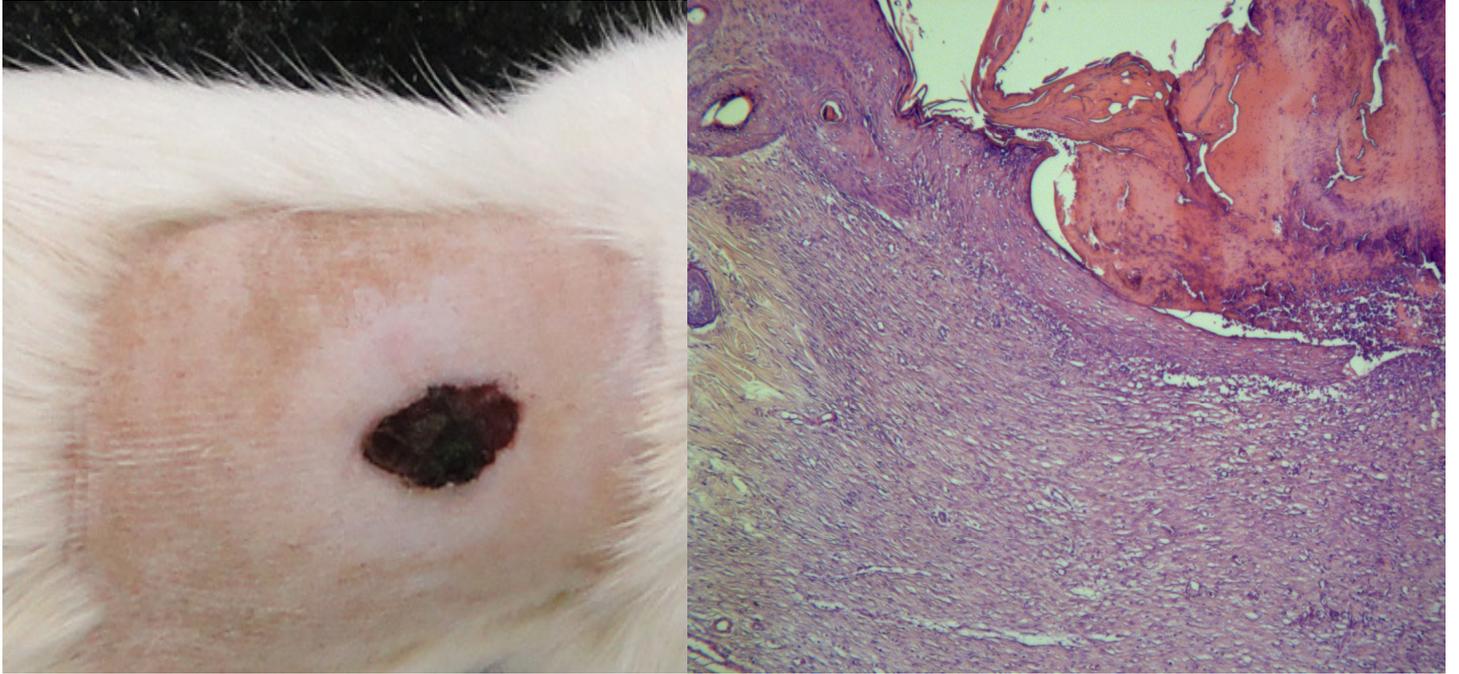
GRUPO II: Casca da banana *in natura* 4%



GRUPO III: Extrato casca seca 2%



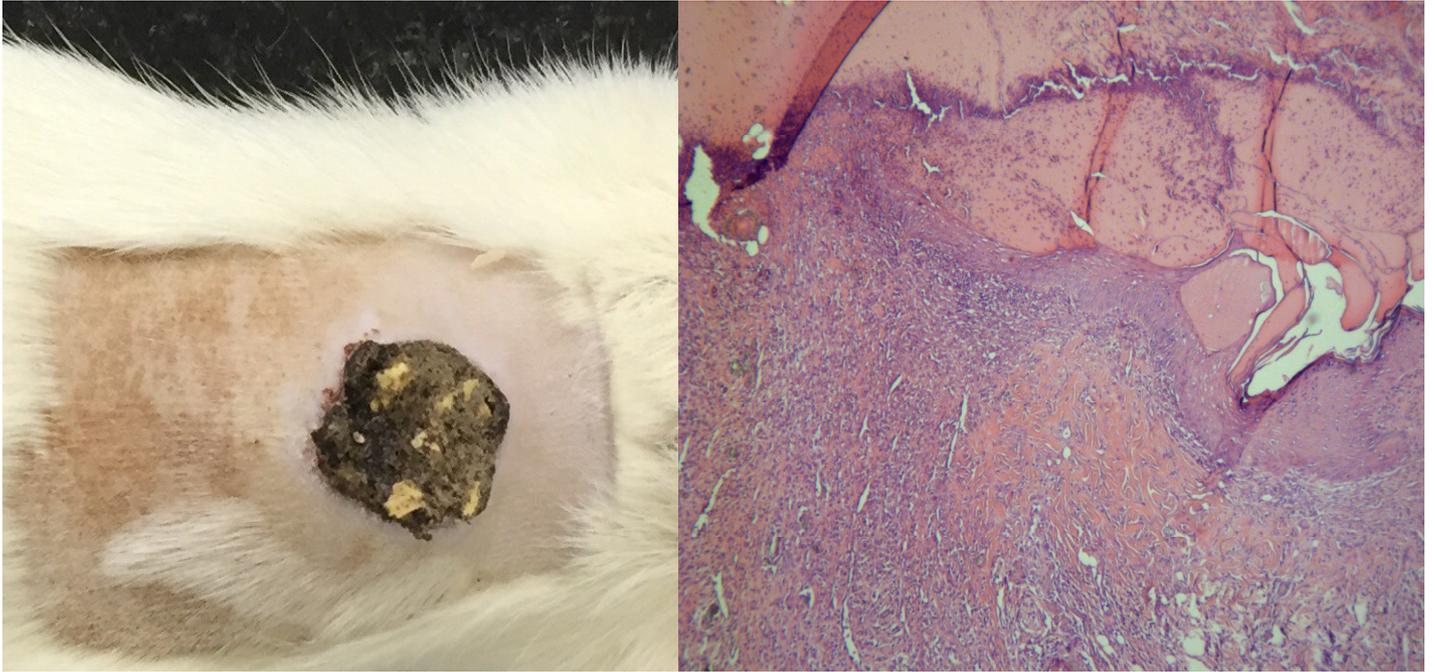
GRUPO IV: Extrato casca seca 4%



GRUPO V: Extrato casca seca 10%



GRUPO VI: Extrato casca fresca 4%



GRUPO VII: Extrato casca fresca 10%

APÊNDICE II

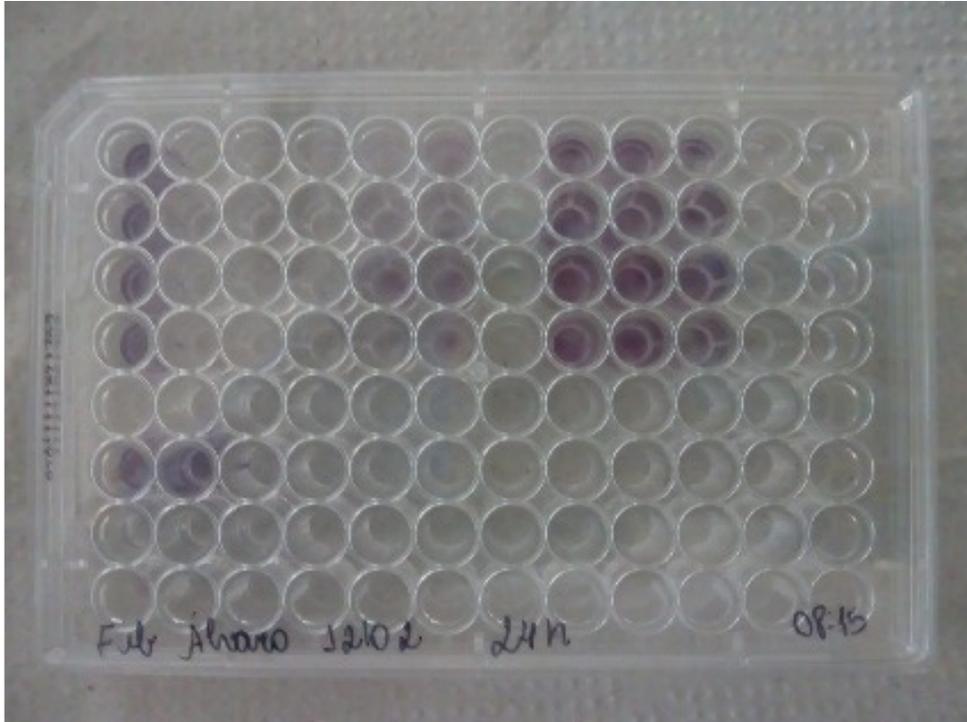


Imagem da Placa de 96 poços onde há deposição dos cristais de formazan na coloração púrpura