

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VERA LUCIA PEREIRA DOS SANTOS

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
ÓLEOS ESSENCIAIS E DO EXTRATO BRUTO OBTIDO DE FOLHAS DE *Piper*
amalago L.

CURITIBA

2021

VERA LUCIA PEREIRA DOS SANTOS

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
ÓLEOS ESSENCIAIS E DO EXTRATO BRUTO OBTIDO DE FOLHAS DE *Piper*
amalago L.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Iara José de Messias-Reason.

Co-orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron Budel.

CURITIBA

2021

S237 Santos, Vera Lucia Pereira dos
Estudo da composição química e de atividades biológicas de óleos essenciais e do extrato bruto obtido de folhas de *Piper amalogo L.* [recurso eletrônico] / Vera Lucia Pereira dos Santos.
– Curitiba, 2021.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Profa. Dra. Iara José de Messias-Reason
Coorientadora: Profa. Dra. Jane Manfron Budel

1. Oléos voláteis. 2. Fibroblastos. 3. Células 3T3.
4. Jaborandi. 5. Anti-inflamatórios. I. Messias-Reason, Iara
José de . II. Budel, Jane Manfron. III. Pós-Graduação em
Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da
Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.
NLM: QV 766

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÉNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB 9/991



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de VERA LUCIA PEREIRA DOS SANTOS intitulada: "ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E DO EXTRATO BRUTO OBTIDO DE FOLHAS DE PIPER AMALAGO L.", sob orientação da Profa. Dra. IARA JOSE DE MESSIAS REASON, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Setembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

30/09/2021 14:45:35.0

IARA JOSE DE MESSIAS REASON

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

29/09/2021 08:57:39.0

SILVIO SANCHES VEIGA

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR)

Assinatura Eletrônica

28/09/2021 18:44:27.0

RODRIGO DE CASSIO DA SILVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica

28/09/2021 17:54:01.0

MELISSA NEGRO DELLAQUA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

29/09/2021 09:15:19.0

SILVIA REGINA VALDERRAMAS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua General Carneiro, 181 - Prédio Central - 11º Andar - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80060-150 - Tel: (41) 3360-1099 - E-mail: ppgmedicina@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 116012

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.pppg.ufpr.br/elga/vistoria/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 116012

A DEUS,

Tudo posso naquele que me fortalece (Filipenses, 3:14).

À minha mãe, Raquel, ao meu esposo Paulo, aos meus filhos Herivelton e Ismael, as minhas noras Liziene e Priscila, aos meus netos Vinícius, Henrique, Beatriz, Arthur e Helena, a minha irmã Elizabeth, o meu muito obrigado por ter dividido mais esta etapa, com amor, companheirismo e acima de tudo, muita paciência.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Iara José de Messias-Reason, minha orientadora pelo voto de confiança, a oportunidade de abrir as portas para o doutorado e incentivo tão precioso nessa caminhada.

A Profa. Dra. Jane Manfron Budel, minha co-orientadora, que com sua alegria passou seus conhecimentos, me fez gostar da Botânica e me deu todo o apoio necessário durante todas as pesquisas realizadas. Pela sua amizade acima de tudo, meu muito obrigada.

A Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco, minha querida amiga, por nossa amizade de longos anos e pela valiosa ajuda na parte experimental, que por mais difícil possa parecer, sempre tem uma palavra de ânimo e carinho.

A profa. Dra. Cristina Peitz de Lima, ao prof. Dr. Raneri Campos, ao prof. Dr. Ricardo Wagner, prof. Me. Fábio Branco Godinho de Castro e ao Sr. Alnardo Rodolpho pela amizade e valiosa ajuda.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Marques do Departamento de Química, da Universidade Federal do Paraná, por sua colaboração.

Ao Prof. Dr. Michel Fleith Otuki do Laboratório de Farmacologia e Fisiopatologia da Pele – LAFFPEL, do Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, por sua preciosa contribuição.

A Caroline Dadalt Silva, minha querida ex-aluna, pela sua ajuda no início dos experimentos com os fibroblastos.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pelo acesso à utilização dos equipamentos.

A Profa. Dra. Andréa Emília Marques Stinghen, por ter me dado a oportunidade de desenvolver parte dos experimentos no Laboratório de Nefrologia Experimental, Departamento de Patologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, meu muito obrigada.

A Giane Favretto e a Regiane Stafim da Cunha, do Laboratório de Nefrologia Experimental, pela valiosa ajuda e pelo carinho que fui recebida no laboratório.

Ao Laboratório de Histotecnologia, do Departamento de Biologia Celular, da UFPR, na pessoa do Sr. Herculano Salviano dos Reis Filho pela preciosa ajuda.

Aos professores Dr. Waldemiro Gremski e Dr. Silvio Sanches Veiga que me ensinaram os primeiros passos da pesquisa científica, com muita dedicação e seriedade.

Ao Centro Universitário Internacional Uninter por ter proporcionado a chance para que eu pudesse desenvolver meu trabalho e pela confiança em mim depositada.

Ao Profe. Dr. Rodrigo Berté, um querido amigo, pela oportunidade, incentivo e confiança.

Aos todos os colegas de trabalho da Escola Superior de Saúde, Biociência, Meio Ambiente e Humanidades, vocês são muito valiosos para mim.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, pelos ensinamentos que nos foram passados, para o aprimoramento de nossos conhecimentos.

A Amanda Carvalho Garcia, minha ex-aluna e com orgulho minha colega no programa de doutorado, obrigado pelo companheirismo e amizade.

Aos secretários do Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Valéria Tania Avelleda Knapp e Bryan Oliveira, meus sinceros agradecimentos.

A minha querida amiga Maria de Fátima Pereira de Oliveira que caminhou comigo a muitos anos, minha gratidão (*in memoriam*).

Aos meus familiares e a todos, que de uma forma ou outra ajudaram na execução deste trabalho.

Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar".

(JOSUÉ, 1:9)

RESUMO

Piper amalago L. (Piperaceae) é uma planta medicinal encontrada na América Central e do Sul que possui atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-litíase e usada como agente cicatrizante de feridas, queimaduras, abcessos, furúnculos e picadas de insetos. O objetivo deste estudo foi analisar a composição química e a atividade antimicrobiana de óleos voláteis e os possíveis efeitos do extrato aquoso lyophilizado obtidos de folhas de *P. amalago* em diferentes concentrações e em diferentes tempos de incubação, utilizando o modelo in vitro de fibroblastos de camundongo (3T3). O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação e a análise da atividade antimicrobiana foi realizada em discos de papel filtro impregnados com óleo volátil contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. O extrato aquoso foi testado em fibroblastos de camundongo (3T3) em diferentes concentrações por 24 horas para a avaliação da viabilidade celular através do vermelho neutro; da viabilidade celular pelo MTT; da adesão celular e do grau de espriamento; da determinação de proliferação celular pelo cristal de violeta; da análise morfológica através de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura; detecção de microfilamentos de actina através de citoquímica de fluorescência. No tempo de exposição por 96 horas ao extrato, os ensaios foram realizados para determinar a concentração de hidroxiprolina e a atividade da metaloproteinase MMP2. No estudo dos óleos voláteis obtidos de folhas de *Piper amalago* foram identificados 28 compostos que representam 99,35% de seus constituintes. Na análise de atividade antimicrobiana, o óleo essencial resultou em zona de inibição para as cepas de *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. O extrato aquoso obtido de folhas de *P. amalago* sobre a linhagem de fibroblastos (3T3) apresentou as seguintes atividades: modulação positiva no grau de disseminação celular, proliferação celular, adesão, coesão intercelular e produção de colágeno. Esses resultados endossam o uso etnofarmacológico de *P. amalago* como agente cicatrizante de feridas e queimaduras pelas comunidades da América Central e do Brasil, podendo ser importante no desenvolvimento de novos fitomedicamentos.

Palavras-chave: Jaborandi-manso. Óleos voláteis. Extrato aquoso. Atividade antimicrobiana. Fibroblastos 3T3.

ABSTRACT

Piper amalago L. (Piperaceae) is a medicinal plant found in Central and South America that has anti-inflammatory, antimicrobial, anti-lithiasis activities and used as a healing agent for wounds, burns, abscesses, boils, and insect bites. The aim of this study was to analyze the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils and the possible effects of the lyophilized aqueous extract obtained from *P. amalago* leaves at different concentrations and at different incubation times, using the in vitro mouse fibroblast model (3T3). The essential oil was obtained by hydro distillation and the analysis of antimicrobial activity was performed on filter paper discs impregnated with volatile oil against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* strains. The aqueous extract was tested on mouse fibroblasts (3T3) at different concentrations for 24 hours to assess cell viability through neutral red; cell viability by MTT; cell adhesion and degree of spreading; determination of cell proliferation by crystal violet; morphological analysis through light microscopy and scanning electron microscopy; detection of actin microfilaments by fluorescence cytochemistry. At the 96-hour exposure time to the extract, assays were performed to determine the hydroxyproline concentration and the metalloproteinase MMP2 activity. In the study of volatile oils obtained from *P. amalago* leaves, 28 compounds were identified that represent 99.35% of its constituents. In the analysis of antimicrobial activity, the essential oil resulted in an inhibition zone for the strains of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. The aqueous extract obtained from *P. amalago* leaves on the fibroblast lineage (3T3) showed the following activities: positive modulation in cell dissemination degree, cell proliferation, adhesion, intercellular cohesion, and collagen production. These results support the ethnopharmacological use of *P. amalago* as a healing agent for wounds and burns by communities in Central America and Brazil and may be important in the development of new phytomedicines.

Key words: Jaborandi-manso. Volatile oils. Aqueous extract. Activity Antimicrobial Volatile Oils. 3T3 Fibroblasts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 JUSTIFICATIVA	12
1.2 OBJETIVOS	12
1.2.1 Objetivos gerais	12
1.2.1 Objetivos específicos	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 A FAMÍLIA PIPERACEAE.....	14
2.1.1 O Gênero <i>Piper</i>	14
2.1.2 A Espécie <i>Piper amalago</i> L.....	15
2.1.2.1 Análise Morfonatômica de <i>Piper amalago</i> L	17
2.2 A Pele	22
2.2.1 O Processo de Cicatrização	23
2.2.2 O Papel do Fibroblasto na Cicatrização	25
2.2.3 O Papel das Metaloproteinases na Cicatrização	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1.Material Botânico	28
3.2 Obtenção do óleo de <i>Piper amalago</i> por Hidrodestilação	28
3.3 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)	28
3.4 Identificação dos Picos	29
3.5 Análise Antimicrobiana	29
3.6 Obtenção do Extrato Aquoso	30
3.7 Obtenção do Produto Liofilizado	31
3.8 Cultivo Celular	31
3.9 Avaliação da Viabilidade Celular pelo Ensaio do Vermelho Neutro	31
3.10 Avaliação da Viabilidade Celular pelo ensaio de Thiazolyl Blue Tatrazoluimbromide (MTT)	32
3.11 Determinação de Proliferação Celular pelo ensaio do Cristal de Violeta ...	33
3.12 Avaliação da Adesão Celular e Grau de Espaçamento	33
3.13 Análise Morfológica através de Microscopia de Luz	34
3.14 Análise Morfológica e Ultraestrutural através de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	35

3.15 Ensaios de citoquímica de fluorescência para detecção de microfilamentos de actina (MMP2-MMP9).....	35
3.16 Determinação da Concentração de Hidroxiprolina	36
3.17 Quantificação e Atividade da Metaloproteinase MMP2	37
3.17.1 Concentração de Proteína	37
3.17.2 Zimografia.....	37
3.17.3 Immunoblotting	38
4. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	41
5. CONCLUSÕES.....	89
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
7. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	92
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE 1 – ARTIGOS PUBLICADOS	113

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais despertam grande interesse por apresentarem metabólitos secundários, componentes que representam uma fonte importante de substâncias farmacologicamente ativas. Algumas espécies de plantas são popularmente utilizadas em várias regiões do Brasil como agentes cicatrizantes (PIRIZ et al., 2014).

Piperaceae Gisek é uma das famílias botânicas mais importantes distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios. Compreende cerca de 2.658 espécies, divididas em 13 gêneros (THE PLANT LIST, 2019). Essas espécies são encontradas na Mata Atlântica brasileira e na Floresta Amazônica, com 450 espécies pertencentes a 4 gêneros, sendo o gênero *Piper* um dos mais representativos em Piperaceae, com cerca de 290 espécies e 45 variedades (FLORA DO BRASIL, 2020).

Estudos etnofarmacológicos do gênero *Piper* forneceram evidências de atividade biológica como antioxidante, psicotrópica, antiofídica e antimicrobiana (FACUNDO et al., 2008; REGASINI et al., 2009; CARRARA et al., 2012). Estudos fitoquímicos realizados com folhas, frutos e raízes detectaram a presença de chalconas e flavonóis (NOVAES et al., 2014), nerolidol (CRUZ et al., 2012), sesquiterpenos (CARRARA et al., 2010), pirrolidina, isobutilamidas e piperidina (DOMÍNGUEZ et al., 1985; ACHENBACH et al., 1986).

Investigações realizadas com óleos essenciais extraídos de espécies de *Piper* mostraram também atividade antifúngica (LOBATO et al., 2007; SILVA; BASTOS, 2007; SANTOS et al., 2012); efeito alelopático sobre plantas daninhas (SOUZA FILHO et al., 2009); atividade inseticida (FAZOLIN et al., 2005 e 2007; SOUTO et al., 2012; SOARES et al., 2012); atividade acaracida (FERRAZ et al., 2010) e antimicrobiana (BRAZÃO, 2012; SANTOS et al., 2012).

Diferentes extratos e compostos obtidos das partes áreas e raiz de espécies de *Piper* têm sido estudados a fim de elucidar seus benefícios no processo de cicatrização (BASTOS et al., 2011; JARDIM, 2011; PACO et al., 2016).

Entre as espécies de gênero *Piper* destaca-se *Piper amalago* L., conhecida popularmente como jaborandi-manso, sendo essa, o foco do presente estudo. Essa espécie é um arbusto que mede de 2 a 7m, encontrado desde a América Central até o Rio Grande do Sul (GUIMARÃES; VALENTE, 2001). Possui óleos voláteis em

células oleíferas que estão presentes no caule e na folha (SIMEONE et al., 2009; SANTOS et al., 2015).

No Brasil, suas folhas são utilizadas na medicina tradicional como agente cicatrizante de feridas, queimaduras, abcessos, furúnculos e picadas de insetos (SEMA, 2003; ALVES et al., 2008; BRATTI et al., 2013; SALEHI et al., 2019). Além disso, *P. amalago* é utilizado como analgésico e auxiliar digestivo (FACUNDO et al., 2008), para tratar cálculos urinários e problemas cardíacos (NOVAES et al., 2014). Em Porto Rico, as folhas mastigadas de *P. amalago* são colocadas em cortes sangrentos; enquanto no México, as tribos Huasteco-Maya usam *P. amalago* para tratar edema, inflamações e como agente antipirético (DURANT-ARCHIBOLD et al., 2018).

Estudos farmacológicos realizados com *P. amalago* mostraram atividades anti-inflamatória (SOSA et al., 2002; NOVAES et al., 2014), antimicrobiana (CARRARA et al., 2012; SANTOS et al., 2016), esquistossomicida (CARRARA et al., 2014), diurético e anti-litiásico (NOVAES et al., 2014), ansiolítico (LOPES et al., 2012), anti-leishmania (CARRARA et al., 2013) e cicatrizante (GUIMARÃES; VALENTE, 2001). A aplicação tópica do extrato aquoso, produzido a partir de folhas de *P. amalago*, auxiliou na cicatrização de uma ferida lacerada no polegar esquerdo de paciente com diabetes mellitus tipo 2, após 15 dias de uso (SANTOS et al., 2020).

A análise fitoquímica das folhas de *P. amalago* mostrou a presença de amidas, alcalóides, taninos condensados, flavonóides e triterpenos (DOMÍNGUEZ et al., 1985; CARRARA et al., 2013; LOPES et al., 2012; ROVANI et al., 2013; NOVAES et al., 2014). Os óleos essenciais extraídos das folhas de *P. amalago* evidenciaram a presença de monoterpenos e sesquiterpenos (CARRARA et al., 2010; SANTOS et al., 2016; SALEHI et al., 2019).

A cicatrização envolve vários eventos celulares e bioquímicos que interagem para a regeneração do tecido lesado, ocorrendo em três fases: inflamatória; proliferação ou granulação e remodelação ou maturação (CAMPOS et al., 2007; PENG et al., 2013; MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2016). É um processo complexo que envolve múltiplos componentes celulares, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (PENG et al., 2011; PENG et al., 2013; DE MAIS et al., 2016). Poucas horas após a lesão, inicia-se a fase inflamatória com aumento da permeabilidade vascular, secreção de citocinas e fatores de crescimento, com ativação da migração celular (MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2016).

1.1 JUSTIFICATIVA

Piper amalago L. é uma espécie de planta medicinal tradicionalmente usada como cicatrizante de feridas, para queimaduras, abcessos, furúnculos e picadas de insetos. Estudos mostram que o chá das folhas da espécie *Piper amalago* L. é utilizado popularmente para o tratamento de pele, ferimentos e queimaduras, como analgésico e coagulante.

O ecossistema brasileiro é uma fonte importante de produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos devido a sua grande diversidade e alto potencial terapêutico. Atualmente, o uso de plantas medicinais está aumentando e configura-se como uma estratégia tecnológica viável e efetiva, sendo alvo de inúmeras patentes e pesquisas científicas para o tratamento de diferentes doenças.

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC) integra a medicina tradicional e a medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de saúde. Nesse sentido, há necessidade de se comprovar o uso popular de espécies medicinais, determinando-se a composição química do vegetal e verificando-se as atividades biológicas de diferentes extratos e de biomoléculas para que possam ser empregados como componentes para o desenvolvimento de novos fármacos.

Considerando a presença de amidas, alcaloides, triterpenos, taninos condensados, flavonoides e óleos essenciais e o potencial farmacológico de folhas de *Piper amalago* L. como anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante e como cicatrizante; o presente trabalho objetivou determinar a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial e dos efeitos biológicos induzidos pelo extrato aquoso de folhas de *P. amalago* em fibroblastos murinos, a fim de subsidiar possível validação de seu uso popular como agente cicatrizante.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Analizar a composição química e a atividade antimicrobiana de óleos voláteis e os efeitos biológicos induzidos pelo extrato aquoso em fibroblastos murinos, obtidos de folhas de *P. amalago*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Analisar a composição química e a atividade antimicrobiana de óleos voláteis obtidos das folhas de *P. amalago*;
- Avaliar a ação citotóxica, a proliferação celular e a perda da viabilidade de células 3T3 (fibroblastos de camundongo), expostos ao extrato bruto aquoso obtido das folhas de *P. amalago*;
- Avaliar possíveis alterações morfológicas no grau de espraiamento celular de fibroblastos murinos frente ao tratamento com extrato bruto obtido das folhas de *P. amalago* após o tratamento empregando-se microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar o comprometimento da adesão celular em diferentes substratos da matriz extracelular (MEC) e a organização dos constituintes do citoesqueleto através de imunomarcação, para detecção de microfilamentos de actina e carboidratos de superfície específicos da superfície celular;
- Determinar a concentração de hidroxiprolina produzida por fibroblastos murinos;
- Avaliar a atividade proteolítica da metaloproteinase (MMP2) através do ensaio de zimografia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A FAMÍLIA PIPERACEA

Os representantes da família Piperaceae são plantas de porte arbustivo, herbáceo ou arbóreo de mais de 3 metros, que apresentam caule articulado e nodoso. Suas folhas são simples, alternas, opostas ou verticiladas, sésseis ou pecioladas, inteiras, de consistência e formas diversas. Possuem flores pequenas, aperiantadas, protegidas por bracteólas pediceladas ou sésseis, dispostas esparsas ou congestas em espigas, formando umbelas ou dispostas em racemos, axilares ou terminais, opostos ou não às folhas. O fruto é uma drupa, séssil ou pedicelado (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

Essa família apresenta diferentes compostos biologicamente ativos como terpenos de baixa massa molecular, fenilpropanoides, amidas, lignoides, flavonoides e outros metabólitos de biossíntese mista (NAVICKIENE et al., 2000; CHAVES; SANTOS, 2002; SILVA et al., 2002; CARDOZO JUNIOR; CHAVES, 2003; ALVES et al., 2011).

Os constituintes voláteis de algumas espécies pertencentes à família Piperaceae ao serem analisados mostraram a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e arilpropanoides, componentes esses com importantes propriedades biológicas (MESQUITA et al., 2005; ESTRELA et al., 2006; CREMASCO; BRAGA, 2010; SILVA et al. 2013; LIMA et al., 2014).

2.1.1 O Gênero *Piper*

Espécies do gênero *Piper* demonstram que componentes presentes nos extratos de folhas, caules e raízes possuem atividades antioxidantes (ROVANI et al., 2013; SILVA et al. 2014). As oxidações biológicas geram espécies reativas de oxigênio e radicais livres, podendo ocasionar lesões celulares, muitas vezes irreversíveis. Nos compostos vegetais a atividade antioxidante pode ser atribuída a diversos mecanismos, como a capacidade sequestrante de radicais livres e a prevenção da peroxidação lipídica (GOUVÊA, 2004; KAUR; GEETHA, 2006).

Vários compostos têm sido isolados de espécies de *Piper*, incluindo amidas, lignanas, neolignanas, hidroquinonas, alcaloides, terpenos, derivados do ácido benzóico e aristolactamas, flavonoides, representados por flavonas, di-

hidrochalconas, chalconas e flavanonas (PARMAR, et al., 1997; YAMAGUCHI, 2006; SANTOS et al., 2015).

Algumas espécies de *Piper* são utilizadas na medicina popular, além de despertarem grande interesse econômico devido à presença de óleos em suas estruturas (SOUSA et al., 2008; GOGOSZ et al., 2012). Estudos realizados com óleos essenciais extraídos de espécies de *Piper* mostraram atividade antifúngica (LOBATO et al., 2007; SILVA; BASTOS, 2007; SANTOS et al., 2012); efeito alelopático sobre plantas daninhas (SOUZA FILHO et al., 2009); atividade inseticida (FAZOLIN et al., 2005 e 2007; SOUTO et al., 2012; SOARES et al., 2012); atividade acaricida (FERRAZ et al., 2010) e antimicrobiana (BRAZÃO, 2012; SANTOS et al., 2012).

2.1.2 A Espécie *Piper amalago* L.

A espécie *Piper amalago* L., conhecida popularmente como jaborandi-manso, jaborandi-falso, jaborandi-nhandi, higuiho-de-limon, joint-wood, rough-leaved-pepper e amalagopfeffer, é um arbusto que mede de 2 a 7m (GUIMARÃES; VALENTE, 2001) e habita desde a América Central até o Rio Grande do Sul (PARMAR et al., 1997; GUIMARÃES; VALENTE, 2001).

É utilizada na medicina tradicional como digestivo (PISSINATE, 2006), no tratamento de problemas cardíacos, como diurética e no tratamento de cálculo urinário (NOVAES et al., 2013), para dores musculares e queda de cabelo (PAULA et al., 2009). No estado do Rio Grande do Sul a espécie é usada para emagrecimento, abcessos, furúnculos, febres e picadas de insetos (SECRETARIA ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE, 2003).

Quimicamente, contém amidas que evidenciaram ação anti-inflamatória, antimicrobiana (CARRARA et al., 2012), cicatrizante (GUIMARÃES; VALENTE, 2001) e anti-leishmania (CARRARA et al., 2013).

O chá de suas folhas é utilizado para o tratamento de pele, ferimentos e queimaduras (ALVES, 2008; BRATTI et al., 2013), como analgésico e coagulante (BRATTI et al., 2013).

Estudos realizados com as folhas e caule mostraram a presença de amidas que evidenciaram ação anti-inflamatória (GUIMARÃES; VALENTE, 2001); antimicrobiana (CARRARA et al., 2012), e anti-leishmania (CARRARA et al., 2013).

A análise fitoquímica do extrato etânico de folhas de *P. amalago*, evidenciou a presença de vitexina e lupeol (ROVANI et al., 2013) e a presença de flavonol e

chalconas (NOVAES et al., 2014) indicando potencial antioxidante dessa espécie (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

A análise dos óleos essenciais presentes nas folhas de *P. amalago* mostrou a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, compostos com importante atividade biológica, antimicrobiana e antioxidante (NOGUEIRA NETO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016).

A procura por novos agentes antimicrobianos a partir de plantas vem aumentando, uma vez que os microrganismos que causam prejuízos à saúde humana estão adquirindo resistência aos antibióticos tradicionais (DUARTE, 2006; CUNICO et al., 2007). Como o Brasil possui uma flora diversificada e uma tradição na utilização de plantas medicinais, vários estudos são realizados com extratos e óleos essenciais de plantas nativas com o intuito de investigar a ação antimicrobiana desses compostos (SOUZA et al., 2013).

Pesquisas realizadas com diferentes espécies do gênero *Piper* têm demonstrado a presença de compostos com atividades antibacteriana e antifúngica, tornando essas espécies promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos. Por apresentar importantes resultados frente a *Staphylococcus aureus*, óleos e extratos obtidos de folhas e caule de espécies de *Piper* tornam-se promissores antimicrobianos.

A espécie *Staphylococcus aureus* é uma bactéria do grupo dos cocos gram-positivos que pode causar doenças, como uma simples infecção como espinhas, furúnculos e celulites ou levar a infecções graves como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras (SANTOS et al., 2007).

O óleo essencial obtido das folhas de *Piper cernuum* Vell.; a fase hexânica obtida de folhas de *Piper arboreum* Aubl.; o extrato bruto e a fase hexânica do caule de *Piper caldense*; extrato etanoico de folhas de *Piper solmsianum* C. DC., e o extrato bruto de folhas de *Piper hispidum* Sw. mostraram ação antimicrobiana frente a *S. aureus* (CONSTANTIN et al., 2001; ALVES et al., 2016; COSTA et al., 2016).

O extrato hidroalcoolico de folhas de *P. umbellatum* L. mostraram atividade frente a *Enterococcus faecalis* (SILVA JÚNIOR et al., 2014). As spécies de enterococos atuam como patógenos oportunistas que causam infecções em pacientes hospitalizados por um longo período de tempo (REIS et al., 2001).

A colonização em lesão por pressão (LPP) é polimicrobiana e as bactérias de importância médica como *S. aureus* e *E. faecalis* geralmente estão presentes e são isoladas (BIERING-SORENSEN et al., 2000).

2.1 2.1 Análise morfoanatômica de *Piper amalago* L.

A análise morfoanatômica de *Piper amalago* L. realizada por Santos et al. (2015) mostra que essa espécie é um arbusto que mede aproximadamente 2-7m, com ramos cilíndricos, nodosos e ramosos (Fig. 1A). As folhas são simples, alternas, pecioladas, com formato ovado-elíptico, ápice acuminado, base assimétrica e margem inteira. O padrão geral de venação é curvinérvea (Fig.1B). As inflorescências são do tipo espiga de coloração amarela (Figura 1B).

A lâmina foliar de *P. amalago*, em vista frontal, mostra as células da epiderme com paredes anticlinais retas e delgadas, em ambas as faces (Figs. 1C, 1D). Os estômatos são do tipo tetracítico e estão presentes somente na face abaxial, caracterizando a folha como hipoestomática (Fig.1D).

FIGURA 1 - *Piper amalago* L. (Piperaceae). Parte aérea e hábito.



Fonte: Santos et al. (2015).

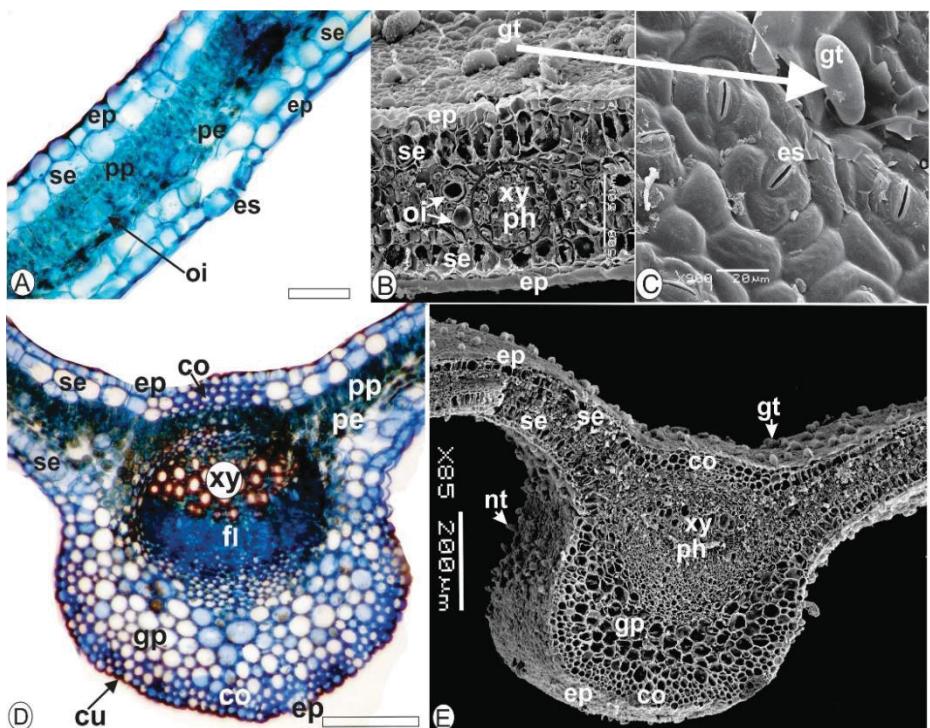
A. Aspecto da parte aérea e hábito. B. Detalhe de folhas e inflorescência. C-E. Vista frontal de folhas. C. Face adaxial da epiderme. D. Face abaxial da epiderme mostrando estômatos. E. Superfície abaxial mostrando detalhe dos estômatos. st: estômatos. Barra = 5cm (A), 2 centímetros (B), 100 µm (E).

Em secção transversal, a epiderme de *P. amalago* apresentou-se uniestratificada com cutícula delgada e lisa, estando os estômatos localizados ligeiramente acima das demais células. Uma camada subepidérmica foi observada em ambas as superfícies (Fig. 2A e 2B).

Foram encontrados tricomas glandulares pluricelulares e unisseriados, de pedicelo curto e cabeça ovoide alongada no sentido longitudinal, em ambas as superfícies (Fig. 2B, 2C e 2E) e tricomas tectores não glandulares, pluricelulares e unisseriados formados por cerca de 5 células, sendo a célula apical levemente aguda também podem ser observados (Fig. 2E e 3B).

Em *P. amalago*, o mesofilo mostrou-se dorsiventral, formado por um estrato de parênquima paliçádico e 2-3 camadas de parênquima esponjoso (Fig. 2A, 2B, 2D e 2E). A endoderme parenquimatosa rodeia feixes vasculares colaterais pequenos que estão imersos no parênquima esponjoso (Fig. 2B). O mesofilo contém células com óleo essencial (Fig. 2A) e compostos fenólicos (Fig. 5A).

FIGURA 2. *Piper amalago* L. (Piperaceae). Morfoanatomia das Folhas.



Fonte: Santos et al. (2015).

A. Organização da lámina mostrando mesofilo dorsiventral. B. Organização da lámina mostrando mesofilo dorsiventral. C. Face adaxial da epiderme, mostrando estômatos e tricomas glandulares. D. Nervura mediana atravessada por feixe vascular colateral. E. Nervura mediana e organização da lámina. co: collenchyma, ep: epiderme, fp: parênquima fundamental gt: tricomas glandulares, oi: célula oleosa, nt: tricomas não-glandular, ph: floema, pp: parênquima paliçádico, se: camada subepidérmica,

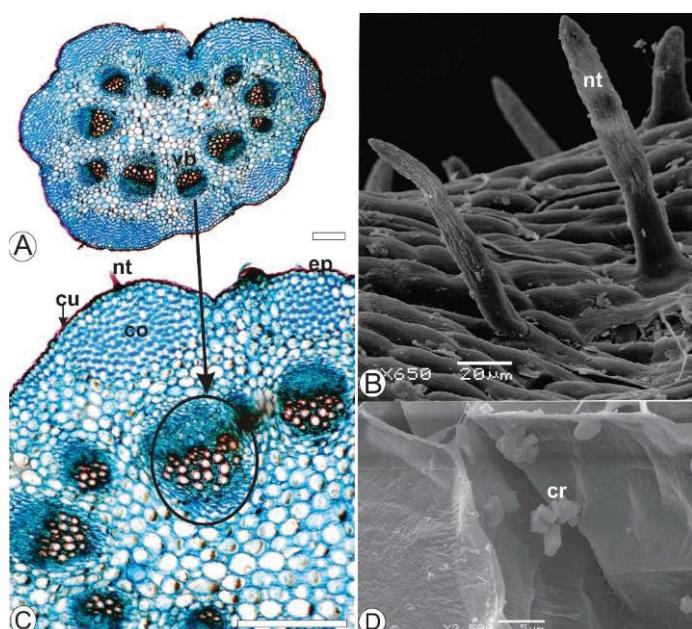
sp: parênquima esponjoso, nt : tricomas não-glandular, vb: feixes vasculares, xy: xilema. Barra = 50 µm (A), 200 µm (D).

A nervura central, em secção transversal, possui formato praticamente côncavo-convexo, exibindo proeminente convexidade na face abaxial (Fig. 2D e 2E).

A epiderme uniestratificada é revestida por cutícula levemente espessada e estriada. Cerca de 3 camadas de colênquima angular são observadas em ambas as faces. O sistema vascular é representado por um feixe vascular colateral único e central (Fig. 2D e 2E).

O pecíolo é curto, de formato irregular e sulcado na face adaxial. A epiderme mostra as mesmas características descritas para a lâmina foliar (Fig. 3A e 3C). Tricomas tectores pluricelulares unisseriados também são observados no pecíolo (Fig. 3B). Encontra-se cerca de 11 feixes vasculares colaterais de diferentes tamanhos, dispostos em círculo e opostos a faixas descontínuas de colênquima angular constituído por 10 a 12 estratos de células (Fig. 3A e 3C). Nas células do parênquima fundamental foram encontrados cristais prismáticos de oxalato de cálcio (Fig. 3D). O teste microquímico com floroglucinol mostra a presença de lignina nas fibras e no xilema, como mostra a Fig. 5B.

FIGURA 3. *Piper amalago* L. (Piperaceae). Morfoanatomia do Pecíolo.

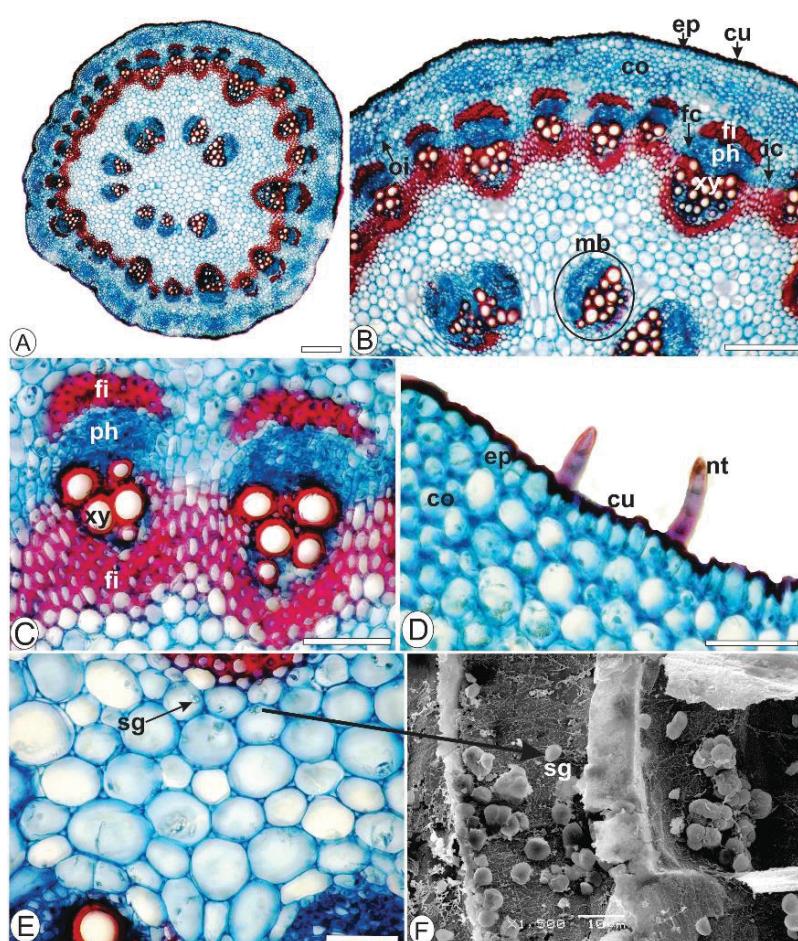


Fonte: Santos et al. (2015).

A. Aspecto geral. B. Detalhe dos tricomas não-glandulares. C. Pecíolo mostrando vários feixes vasculares colaterais. D. Detalhe de cristais prismáticos de oxalato de cálcio. co: collenchyma, cr: cristal de oxalato de cálcio, cu: cutícula, ep: epiderme, nt: tricoma não-glandular, vb: vascular bundle. Barra = 200 µm (A, C).

O caule, em estrutura secundária incipiente, apresenta formato circular (Fig. 4A). A epiderme é uniestratificada e revestida por cutícula moderadamente espessa (Fig. 4B) e que reagiu com Sudan III (Fig. 5D). Tricomas tectores já mencionados para a folha podem ser observados (Fig. 4D). Encontram-se alguns estratos de parênquima cortical e faixas de colênquima angular, formado por células em diferentes estágios de lignificação (Fig. 4A, 4B e 4B). Na endoderme são encontrados grãos de amido (Fig. 5E).

FIGURA 4. *Piper amalago* L. (PIPERACEAE). Morfoanatomia do Caule.



Fonte: Santos et al. (2015).

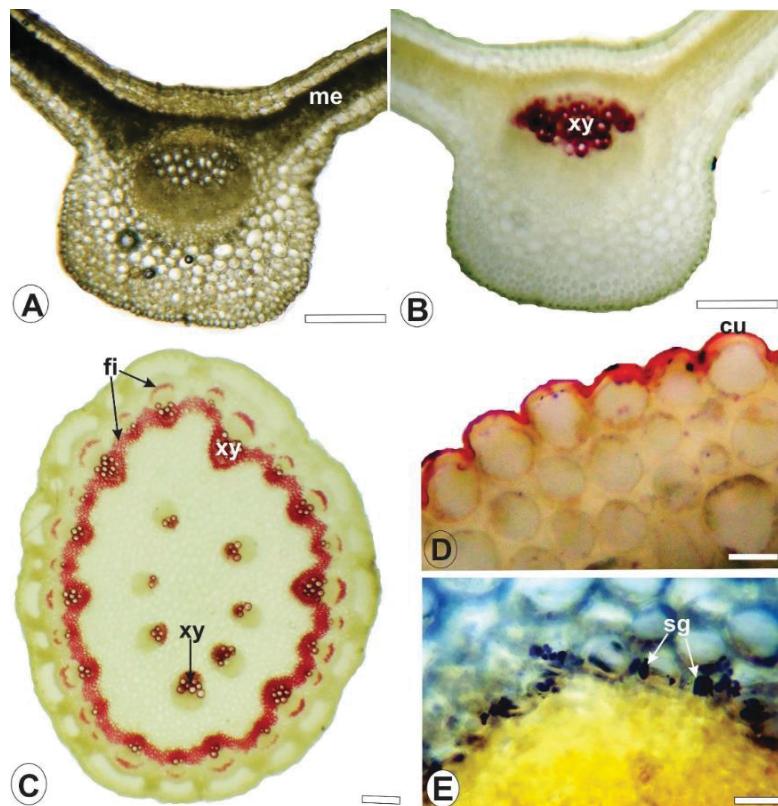
Caule em seção transversal. A. Aspecto geral. B. Detalhe da figura anterior. C. Detalhe do anel esclerenquimático, mostrando fibras. D. Epiderme e região do córtex. E. Medula mostrando grãos de amido. F. Detalhe dos grãos de amido. cu: cutícula, ep: epiderme, co: collenchyma, Fl: fibras, nt: tricomas não-glandular, ph: floema, pi: medula, sg: grãos de amido, xy: xilema. Barra = 200 µm (A, B), 50 µm (C, D, E).

No cilindro vascular, feixes vasculares colaterais estão dispostos em dois círculos. O círculo externo apresenta vários feixes vasculares colaterais, com calotas

esclerenquimáticas apostas ao floema (Fig. 4A - C). Os feixes vasculares do círculo interno, denominados de feixes medulares, aparecem em número de 9 (Fig. 4A e 4B). Tanto esses feixes medulares quanto os feixes vasculares mostram câmbio intrafascicular evidente (Fig. 4C). Na zona perimedular, ocorre uma bainha esclerenquimática sinuosa, formada de várias camadas de células lignificadas (Fig. 4A - C). Essas células são observadas através da reação com floroglucina clorídrica (Fig. 5C). A medula ocupa grande parte do volume caulinário e é formada por células parenquimáticas onde podem ser encontrados grãos de amido (Fig. 4E e 4F). Idioblastos oleíferos e cristais prismáticos de oxalato de cálcio estão presentes no caule.

No mesófilo, na nervura central, no pecíolo e no caule são encontrados idioblastos oleíferos e cristalíferos, grãos de amido, mucilagem e compostos fenólicos.

FIGURA 5. *Piper amalago* L. (PIPERACEAE). Análise Microquímica de Folha e Caule em Seção Transversal.



Fonte: Santos et al. (2015).

A. Mesófilo mostrando reação com cloreto férrico. B. Nervura mostrando reação de detecção de lignina por floroglucinol no xilema. C. Caule mostrando reação de floroglucinol, nas fibras e xilema. D. Pecíolo demonstrando cutícula em reação usando o Sudão III. E. Caule mostrando endoderme com grãos de amido usando iodo-iodeto. cu: cutícula, fi: fibras, me: mesófilo, sg: grãos de amido, xy: xilema. Barra = 200 µm

2.2 A PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo responsável pela proteção contra dessecação, atrito, radiação ultravioleta e invasão de microrganismos. É importante ainda nos processos de termorregulação e na percepção tátil (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

É composta por duas camadas, a epiderme formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e a derme por dois tipos de tecido conjuntivo. A derme papilar é formada por um conjuntivo frouxo e a derme reticular, por um conjunto denso não modelado. Tanto a epiderme como derme apresentam células especializadas e entre elas destacam-se os queratinócitos na epiderme e os fibroblastos e macrófagos na derme. Além de diferentes células, o tecido conjuntivo apresenta a matriz extracelular (MEC) formada por um conjunto fibrilar, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os fibroblastos compreendem uma população de células dinâmicas que exercem papel fundamental na fisiologia da pele. São capazes de sintetizar e secretar um conjunto de moléculas precursoras da matriz extracelular como fibras colágenas, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas, proteoglicanas e proteases, sendo também responsáveis pelo debridamento e remodelamento tecidual (HILDEBRAND et al., 2005; SORRELL, 2009).

O colágeno é a proteína mais abundante constituindo 80% do peso seco da derme sendo o principal componente da pele, a base de sua estrutura e resistência (LI et al., 2007).

Na matriz extracelular da derme são encontrados essencialmente dois tipos de colágeno: o tipo I que corresponde a cerca de 80-85% e o tipo III correspondendo 15-20% do total dessa proteína. Localizado principalmente na derme reticular está o colágeno do tipo I formado por duas cadeias α_1 e uma cadeia α_2 , com sequência de aminoácidos diferentes e com diâmetro total de 1 a 20 μm . O colágeno tipo III está em sua maioria na derme papilar, localizada mais superficialmente, constituído de três cadeias α_1 e com diâmetro de 0,5 a 2 μm (ISAAC et al., 2010; LIMA et al. 2020).

Conectando o epitélio ao tecido conjuntivo frouxo da derme encontra-se uma junção dermo-epidérmica (JDE) composta por uma complexa membrana basal, formada por macromoléculas sintetizados por queratinócitos basais e por fibras reticulares sintetizadas pelos fibroblastos da derme. A JDE desempenha papel fundamental na adesão mecânica dessas duas camadas, atuando também como um

facilitador na migração de vários tipos celulares durante processos como a cicatrização e reações imunológicas e/ou inflamatórias, entre outros (KANITAKIS, 2002).

2.2.1 O Processo de Cicatrização

A pele funciona como uma importante barreira física de proteção contra a perda excessiva de água, diversos estímulos ambientais e infecções. É um dos órgãos mais suscetíveis a lesões e que precisa ser reparada a fim de restabelecer sua estrutura e funções. Esse restabelecimento é feito através do processo de cicatrização (DELAVARY et al., 2011), que compreende fases: inflamatória; de proliferação ou granulação, e de remodelação ou maturação (CAMPOS et al., 2007; PENG et al., 2013; MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2016).

Esse processo envolve múltiplos eventos celulares e bioquímicos que agem para a regeneração do tecido lesionado. Dentre os mediadores bioquímicos, ressaltam-se diferentes fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (PENG et al., 2011; PENG et al., 2013; DE MASI et al., 2016). Já os eventos celulares envolvem a participação de plaquetas, neutrófilos e macrófagos (CAMPOS, 2007; ALMEIDA et al., 2008; ISAAC et al., 2010).

A fase inflamatória tem início logo após o surgimento da lesão e inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, que promove a quimiotaxia de células leucocitárias. Há um estímulo para que se inicie a cascata de coagulação visando a homeostasia no local onde o endotélio é lesado. Quando a cascata é iniciada são liberados diferentes fatores de crescimento pelas plaquetas que atraem neutrófilos para o local da lesão. Essas são as primeiras células a chegarem ao local e a produzirem radicais livres que ajudam na eliminação de bactérias (CAMPOS, 2007; ALMEIDA et al., 2008; ISAAC et al., 2010).

Os macrófagos também atuam na fase inflamatória. Essas células migram para o local lesionado e desempenham papel fundamental no final do debridamento iniciado pelos neutrófilos, secretando citocinas e fatores de crescimento importantes para proliferação celular e estimulação da re-epitelização; função mitogênica para fibroblastos e formação do tecido de granulação; quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e fibroblastos; produção de matriz extracelular; angiogênese e proliferação de células endoteliais (CAMPOS, 2007; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; REINKE; SORG, 2012).

A fase de proliferação é responsável pelo fechamento da lesão, nessa ocorre re-epitelização, angiogênese e fibroplasia (MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2016).

A re-epitelização ocorre precocemente se a membrana basal estiver intacta. As células epiteliais migram para a superfície superior da epiderme, ocorrendo reparo tecidual em três dias. Se houver lesão da membrana basal, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar tentando restabelecer a barreira protetora (CAMPOS et al., 2007).

A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), sintetizado principalmente por macrófagos e se caracteriza pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essenciais para a cicatrização. A formação do tecido de granulação é a parte final da fase proliferativa, sendo os fibroblastos e as células endoteliais, as principais células desse processo (CAMPOS et al., 2007).

A fibroplasia é a etapa onde ocorrem a produção de colágeno pelos fibroblastos, tornando a ferida mais resistente e forte, e a atração química de células especializadas para o sítio de inflamação. Nessa fase ocorre proliferação, biossíntese e secreção dos componentes da matriz extracelular (MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2016).

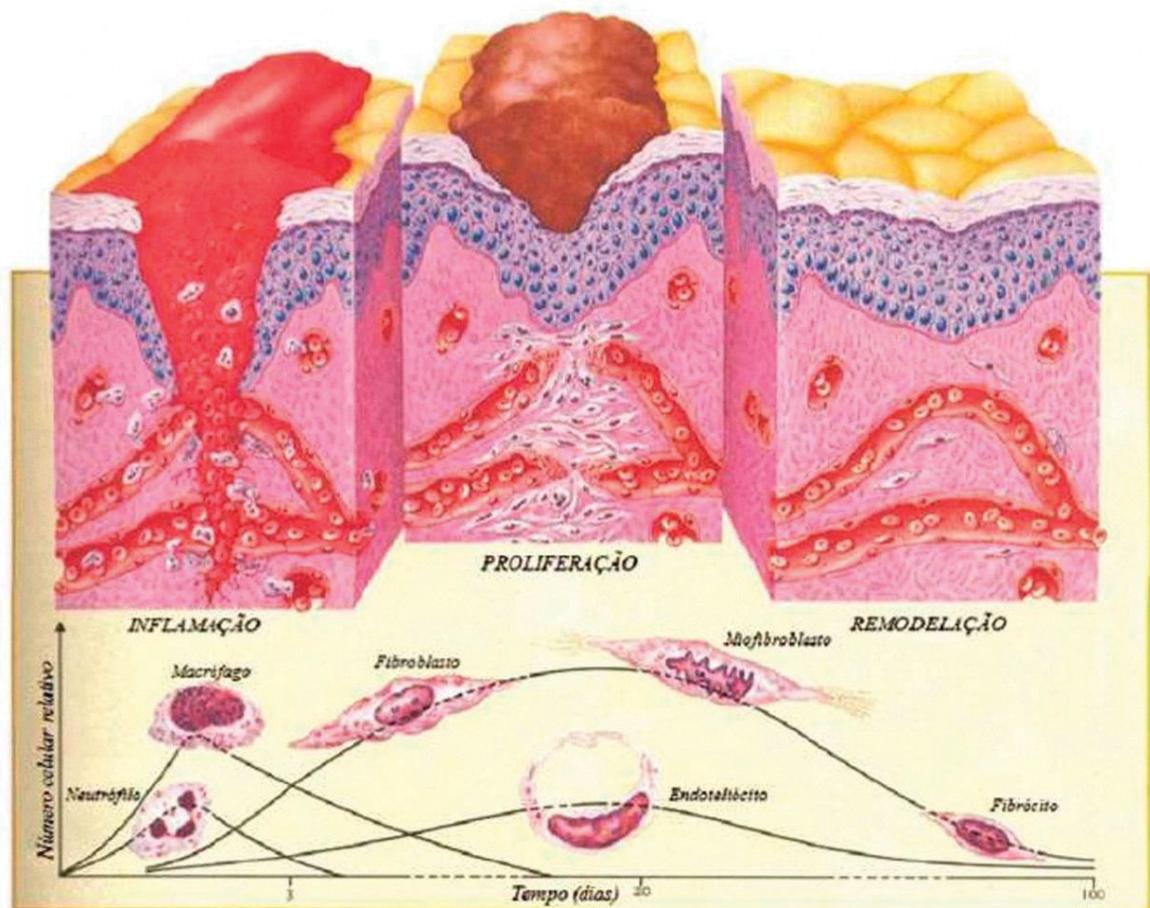
Os fibroblastos atuam na produção de colágeno e o depositam de maneira organizada. O colágeno produzido inicialmente é o colágeno tipo III, menos espesso do que o colágeno presente na pele normal e com posição paralela a pele (CAMPOS, 2007; ISAAC et al., 2010; PAGGIARO et al., 2010; ABRUCEZE, 2013). Progressivamente esse é substituído pelo colágeno tipo I, que é mais espesso, resistente e organizado ao longo das linhas de tensão, ocorrendo um aumento da força tênsil da área lesionada através dessa mudança (PENG et al., 2011; ABRUCEZE, 2013; PENG et al., 2013; CUNHA et al., 2015).

A matriz antiga é destruída e a sua lise é promovida por collagenases secretadas por fibroblastos e leucócitos (CAMPOS, 2007; VILLELA, 2007; ISAAC et al., 2010).

Os fibroblastos também produzem inibidores de metaloproteinases (TIMPs) que são enzimas que catalisam e degradam proteínas da matriz extracelular. Juntas, as MMPs e as TIMPs formam um sistema biológico complexo que mantêm a homeostase da matriz extracelular (MEC) (TRENGOVE et al., 1999; GILL; PARKS, 2008).

No processo de cicatrização de feridas, destaca-se a importância de princípios ativos presentes em extratos vegetais, que apresentam atividades biológicas, tais como: antimicrobiana, antioxidante, de proliferação celular, da angiogênese, bem como no aumento na produção de colágeno (BUDOVSKY et al., 2015).

FIGURA 6. Processo de Cicatrização da Pele.



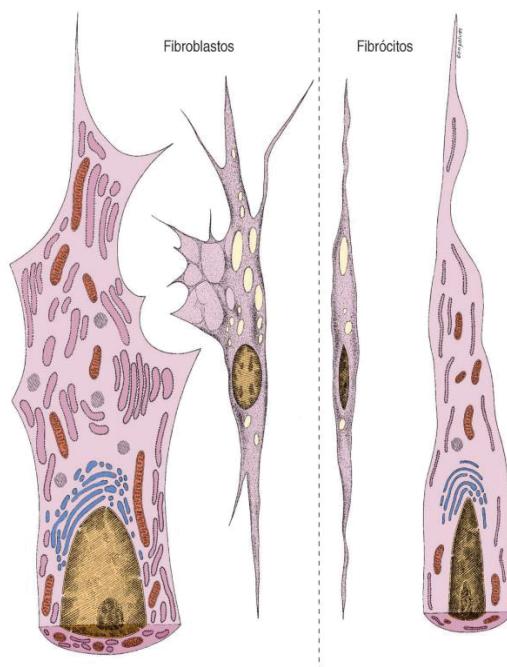
Fonte: Isaac et al. (2010) adaptado de Gray (1995). A figura mostra a representação da resposta normal da pele a feridas, mostrando as principais células durante as três fases do processo de cicatrização. A fase de inflamação se inicia no momento da lesão e pode durar até três dias. Nessa fase atuam os neutrófilos e os macrófagos. A partir do quarto até o vigésimo dia ocorre a fase de proliferação com a atuação de fibroblastos e células endoteliais. A fase de remodelação tem início após o vigésimo dia, com atuação dos miofibroblastos.

2.2.2 O Papel do Fibroblasto no Processo de Cicatrização

Os fibroblastos apresentam morfologia fusiforme com numerosos prolongamentos citoplasmáticos, com um núcleo central e arredondado, nucléolo evidente e cromatina fina (figura 7). No citoplasma apresentam retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi bem desenvolvidos (KANITAKIS, 2002; GARTNER; HIATT, 2007).

São células responsáveis pela síntese e degradação do tecido conjuntivo (fibroso e não fibroso), bem como geração de numerosos mediadores bioquímicos. Quando metabolicamente inativos ou quiescentes, são conhecidos como fibrócitos (figura 7). Fibroblastos proliferativos e em repouso são capazes de responder a diversos mediadores imunológicos (TOBIN, 2006).

FIGURA 7. Fibroblasto e fibrócito.



Fonte: Junqueira e Carneiro (2017). A figura mostra a diferença morfológica entre o fibroblasto (célula ativa) e os fibrócito (célula quiescente).

Na reparação de lesões, observam-se células conhecidas como miofibroblastos que estão envolvidas no processo cicatricial pela produção dos componentes da matriz extracelular, participação na síntese da matriz extracelular, resistência e na contração das feridas (GABBIANI, 2003). Os miofibroblastos estão envolvidos no processo de cicatrização, promovendo a formação do tecido de granulação, levando a re-epitelização, garantindo assim a manutenção da integridade do tecido conjuntivo (PAGNANO et al., 2008).

Os fibroblastos participam ainda em interações parácrinas na pele, respondendo a secreção de células vizinhas e autócrinas, exibindo receptores para os próprios fatores secretados. Essas interações são particularmente importantes nas diferentes fases do processo de cicatrização de feridas e na resposta inflamatória,

onde ocorre interatividade com células dendríticas e outras células do sistema imunitário (DARBY; HEWITSON, 2007; WERNER et al., 2007; SORRELL; CAPLAN, 2009).

Os fibroblastos possuem ainda, um papel relevante na angiogênese, pois na presença de lesões, são estimulados para produzir fatores de crescimento angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); o fator de crescimento de fibroblastos (FCFb); o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator transformador de crescimento β (TGF- β). Esses fatores atuam sobre as células endoteliais vasculares, estimulando a sua proliferação, migração e diferenciação para formarem novos vasos sanguíneos (NEWMAN et al., 2011).

2.2.3 O Papel das Metaloproteinases no Processo de Cicatrização

As metaloproteinases (MMP) são enzimas que degradam as proteínas da matriz extracelular. A família das MMPs inclui cerca de 25 proteínas, sendo a gelatinase B (MMP-9) e a gelatinase A (MMP-2) dois membros intimamente relacionados dessa família que degradam colágeno desnaturado ou gelatinas (VISSE; NAGASE, 2003).

As MMPs apresentam funções importantes em diversos processos biológicos, como a morfogênese, e em todos os estágios da cicatrização, incluindo a reparação tecidual e remodelação em resposta à injúria. Além dessas funções, vale ressaltar que as MMPs são importantes na manutenção estrutural e funcional dos tecidos, para que esses não percam sua arquitetura normal (ARAÚJO et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Botânico

A coleta do material vegetal ocorreu na região de Curitiba, Paraná ($24^{\circ} 18' S$ e $49^{\circ} 37' W$), em julho de 2012. O material vegetal foi submetido à confecção de exsicata, identificado por taxonomista e comparada com a exsicata depositada no Museu Botânico Municipal de Curitiba, sob o registro de número 71947.

O acesso ao material vegetal foi permitido e licenciado pelo Conselho de Administração do Patrimônio Genético (CGEN / SISGEN) e registrado sob o número A14F6AF.

A escolha das folhas de *P. amalago* foi em função da facilidade de sua coleta e por serem encontradas praticamente durante o ano todo (GONÇALVES et al., 2018; SILVA et al., 2018).

3.2 Obtenção do óleo de *Piper amalago* por L. hidrodestilação

A obtenção do óleo por hidrodestilação foi realizada em Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo de 1 L e manta de aquecimento. Ao balão foram adicionados 60 g de folhas secas trituradas e 500 mL de água. O tempo de extração foi de 4 horas. O óleo obtido foi conservado em geladeira em frasco de vidro âmbar (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

3.3 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

Os padrões do óleo e n-alcano foram examinados por GC/MS acoplados a um sistema Shimadzu CGMS-QP2010 equipado com um detector de quadrupolo usando um Rtx-5MS (Crossbond 5% de difenil/ 95% de dimetil polisiloxano) baixo bleeding da coluna (30 mx 0,25 mm x 0,25 mm), utilizando hélio como gás transportador, em um fluxo de 1,02 mL/min. A temperatura do forno foi inicialmente mantida a $60^{\circ}C$ durante 1 min e aumentado a uma taxa de $3^{\circ}C/min$ para $250^{\circ}C$. O espectrômetro de massa foi operado em modo de impacto de elétrons (70 eV) com uma gama de massa definida entre 40 e 350 m/z. As temperaturas de interface e da fonte foram ajustadas a $250^{\circ}C$ (ADANS, 2007).

3.4 Identificação dos Picos

O índice Kovats de retenção foi calculado para os compostos e os seus espectros de massa foram comparados com a literatura (ADAMS, 2007). O índice de Kovats (I) é calculado como $I = 100 [n + (N - n) \times (\log tr(\text{desconhecido}) - \log tr(n)) / \log tr(N) - \log tr(n)]$ onde n é igual ao número de carbono átomos no alcano menor, N é o número de átomos de carbono do alcano maior, tr é, em todos os casos, o tempo de retenção ajustado (calculado no tempo - tempo do composto pequeno não-amarelado).

3.5 Análise antibacteriana

Para a análise antimicrobiana, as bactérias selecionadas foram das espécies *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*, patógenos causadores de infecções cutâneas. A espécie *Salmonella typhimurium* um dos principais agentes de diarreias infecciosas e espécie *Escherichia coli* responsável por infecções intestinais e urinárias (BRASIL, 2013).

A análise da atividade antimicrobiana foi realizada por meio da utilização de discos de papel impregnados com óleo volátil obtido das folhas de *P. amalago* L. As cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, foram cultivadas em caldo BHI (infusão de cérebro-coração), incubadas a 35°C por 24 horas.

Em seguida, uma amostra foi inoculada em ágar Mueller-Hinton e incubada a 35°C por 24 horas. Cada cultura de bactéria foi diluída em solução salina estéril (5 mL) e a turbidez da escala MacFarland ajustada de 0,5. O cloranfenicol (30 µg) e a gentamicicina foram utilizados como controles positivos.

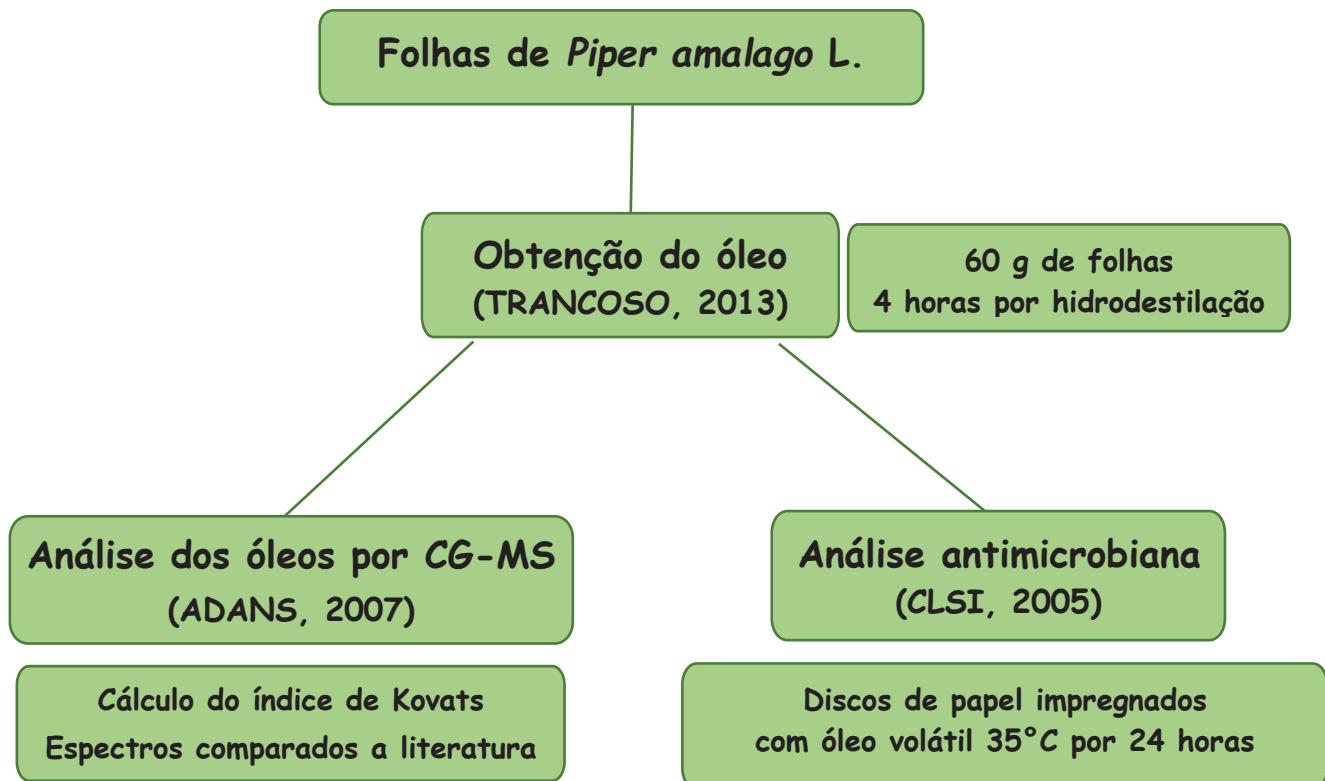
Os discos estéreis foram distribuídos em câmara de fluxo laminar nas placas e com auxílio de uma pipeta automática aplicou-se 10µL de óleo obtido das folhas de *P. amalago* sobre cada disco. Após, as placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas, para análise dos halos formados (CLSI, 2005).

O teste foi realizado em triplicata e os resultados foram submetidos e analisados pelo teste T de Student, com limite de confiança 95%.

Para diferenciar a atividade bacteriostática do bactericida, uma porção do ágar da zona de inibição formada foi retida e colocada em um tubo contendo o meio líquido BHI e incubado a 35°C durante 24 horas. Em seguida, uma amostra do caldo foi semeada em meio sólido BHI incubado a 35°C durante 24 horas. O crescimento das

colônias em meio sólido BHI indica que o óleo possui atividade bacteriostática, enquanto a falta de crescimento sugere que há atividade bactericida após um período de 24 horas.

FIGURA 8. Fluxograma dos procedimentos para a obtenção e análise antibacteriana do óleo de *P. amalago*.



Fonte: a autora (2021).

3.6 Obtenção do extrato aquoso

O extrato aquoso das folhas de *Piper amalago* L. foi obtido segundo metodologia descrita por Viana et al. (2006). As folhas secas foram trituradas durante 30 segundos. Em seguida, 75g de material triturado foi misturado em 500mL de água destilada por agitação por 60 segundos, para homogeneização. A mistura foi dividida em recipientes de vidro e colocada em repouso por 24 horas em temperatura de 5°C. Após o período de resfriamento, o extrato líquido foi filtrado em papel filtro para evitar a presença de resíduos de partículas no filtrado.

3.7 Obtenção do produto liofilizado

A liofilização é um processo de desidratação de produtos em condições de pressão e temperatura no qual a água é removida por meio de passagem direta do estado sólido para o gasoso (sublimação) (MACAN, 2017).

O extrato aquoso foi congelado a -65°C por um período de 48 horas e após foi submetido a uma pressão negativa (vácuo), fazendo com que a água dos produtos fosse retirada por sublimação, ou seja, passando diretamente do estado sólido para o estado gasoso. O resultado final foi um produto com uma estrutura porosa livre de umidade e capaz de ser reconstituída pela simples adição de água. O liofilizador utilizado foi da marca Virtis SP Scientífica, modelo BenchTop Pro 8L - XL70 (Reino Unido) (VIANA et al., 2006).

3.8 Cultivo Celular

Para os ensaios *in vitro*, empregou-se a linhagem de fibroblastos de camundongo 3t3 (ATCC® CRL-1658TM) cedidas pelo prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr. da Universidade de São Paulo (USP).

Os fibroblastos são células conjuntivas que atuam no processo de cicatrização nas fases proliferativa de remodelação (MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2016). A importância de se usar fibroblastos 3T3 deve-se à capacidade dessas células secretarem fatores de crescimento e proteínas de matriz extracelular no meio de cultura (GREEN, 1978; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2003).

As células foram mantidas rotineiramente em garrafas de cultivo contendo o meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 µg/mL de estreptomicina e 10 U/mL de penicilina, em atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Para manutenção das células o meio foi substituído a cada 48 h. No momento em que a monocamada celular se tornava subconfluente, as células foram incubadas com 1,5 mL de tripsina 0,25% durante 5 minutos a 37°C. Após o desprendimento do tapete celular, as células foram homogeneizadas com DMEM acrescido de 10% de SFB e a suspensão celular obtida foi dividida em várias garrafas para subcultivo (GEORGE et al., 2010).

3.9 Avaliação da Viabilidade Celular pelo Ensaio do Vermelho Neutro

Esse método permite avaliar mecanismos de endocitose onde o corante é internalizado ocorrendo o acúmulo do corante vermelho neutro nos lisossomos. Esse método permite mensurar a viabilidade das células através do índice endocítico do corante. Após, impõem-se a lise celular por solução de extração, o corante diluído pode ser quantificado por medida de absorbância e avaliada a capacidade endocítica das células que só realizam essa dinâmica quando viáveis (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Os fibroblastos de camundongo (3T3) foram plaqueados em placa de 96 poços ($0,14 \times 10^5$ células/poço, quantidade de células no dia da leitura). Após 24 horas, o meio de cultivo foi substituído por 200 μL de meio contendo diferentes concentrações do extrato bruto liofilizado (5 – 1500 $\mu\text{g/mL}$). Após as 24 horas de exposição, o meio foi retirado e os poços lavados com PBS estéril. Em seguida 200 μl de solução de vermelho neutro foi adicionada em cada poço e o material incubado por 3 horas para permitir a incorporação do corante nas células vivas. Após o tempo de incubação, foi removido o meio e cada poço foi lavado com uma mistura de CaCl_2 1% e de formaldeído 0,5% e após adicionado 200 μl de solução de ácido acético 1%/etanol 50%, incubado por 10 minutos à temperatura ambiente, homogeneizado lentamente até a completa dissolução e a seguir foi feita a leitura da absorbância em leitor de microplaca (*Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader*) a 540 nm.

3.10 Avaliação da Viabilidade Celular pelo ensaio de Thiazolyl Blue Tatrazoluimbromide (MTT)

Nesse método, as redutases mitocondriais reduzem o anel tetrazólio do MTT a cristais roxos de formazan púrpura, pelas mitocôndrias das células vivas, sendo possível avaliar a viabilidade celular pela capacidade das mitocôndrias em reduzir o anel a cristais. A solubilização dos cristais, por DMSO, gera uma solução a qual pode ser quantificada. O aumento da intensidade da cor (absorbância) é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; REILLY et al., 1998).

Os fibroblastos de camundongo (3T3) foram semeados em placa de 96 poços ($0,14 \times 10^5$ células/poço, quantidade de células no dia da leitura) com 200 μL de DMEM completo. Após 24 horas, o meio foi removido e os poços lavados 2 vezes com PBS estéril. Em seguida foi adicionado 200 μL de meio contendo diferentes concentrações do extrato bruto liofilizado (0,5; 1,5; 5,0; 15; 50; 150; 500 e 1500

µg/mL). Após 24 horas de exposição foi adicionado 200 µL da solução de MTT em cada poço e incubado por 3 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida o MTT foi retirado e adicionado 200 µL de álcool P.A. e homogeneizado lentamente até a completa dissolução e feita a leitura da absorbância em leitor de microplaca (*Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader*) a 570 nm.

3.11 Determinação de Proliferação Celular pelo ensaio do Cristal de Violeta

O cristal violeta (cloreto de pararosanilina), corante também conhecido como violeta de Genciana é capaz de ser absorvido pelas células em cultura. Trata-se de um corante básico que cora o núcleo das células, de forma que a taxa de crescimento celular é refletida pela determinação colorimétrica das células coradas (GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986; VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011).

Os fibroblastos de camundongo (3T3) foram semeados em placa de 96 poços (0,14 x 10⁵ células/poço, quantidade de células no dia da leitura com 200 µL de DMEM completo. Após 24 horas, o meio de cultivo foi substituído por 200 µL de meio contendo diferentes concentrações do extrato liofilizado (0,5; 1,5; 5,0; 15; 50; 150; 500 e 1500 µg/mL) ou meio de cultivo contendo 0,2 % de DMSO, utilizado como veículo de dissolução do extrato. Após o tempo de tratamento, o meio de cultivo foi retirado e os poços foram lavados com 200 µL de PBS não estéril à 37°C. A seguir, adicionou-se 50 µL de paraformaldeído 2% em cada poço e incubado a 4°C em geladeira por 30 minutos para a fixação das células. Após a remoção do fixador foram adicionados 100 µL da solução do corante cristal violeta e a placa incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o corante foi removido e cada poço lavado com 120 µL de água destilada. Foram então adicionados 100 µL de ácido acético 33% e homogeneizado lentamente até a completa dissolução e feita a leitura da absorbância em leitor de microplaca (*Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader*) a 540 nm.

3.12 Avaliação da Adesão Celular e Grau de Espraiamento

Para avaliação da adesão celular e grau de espraiamento foram utilizadas as proteínas de matriz extracelular, como a fibronectina e o colágeno do tipo I. A fibronectina é uma glicoproteína importante para a adesão celular e que regula a morfologia, a migração, a diferenciação celular e a organização do citoesqueleto (HYNES, 1989; MAURER, et al., 2010) e o colágeno I é um dos componentes do tecido de granulação (GUIDUGLI-NETO, 1992).

Os fibroblastos de camundongo foram mantidos em garrafas grandes de cultivo, em incubadora de CO₂ *overnight* e após, foram tratados por 24 horas com o extrato bruto liofilizado de *P. amalago*.

Simultaneamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas ou não com 100µL de coats de diferentes proteínas de matriz extracelular, nos seguintes grupos: FN (fibronectina), Col. I (colágeno I), PLA (plástico da própria placa sem tratamento) e BSA (controle negativo).

Todas as soluções foram diluídas em PBS. As placas sensibilizadas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 60 minutos, e o conteúdo foi aspirado e os poços lavados com PBS. Posteriormente, 200 µL de BSA 1% inativado foi adicionado as placas, procedendo-se mais uma incubação a 5% de CO₂ a 37°C por 60 minutos, seguidos de duas lavagens com PBS.

Após o período de tratamento com o extrato bruto liofilizado ou não (células controle), as células foram desaderidas quimicamente das garrafas com tripsina e contadas em câmara de Neubauer. Um total de 100.000 células foram então plaqueadas nas placas previamente contendo os *coats* das moléculas de MEC ou BSA 1%, incubadas por 120 minutos a 37°C e 5% de CO₂. As células não aderidas foram então aspiradas e os poços lavados três vezes com PBS.

As células que se mantiveram aderidas foram fixadas com metanol por 10 minutos, lavadas duas vezes com PBS e coradas com 60µL de cristal violeta a 0,2% em etanol por 5 minutos e lavadas com PBS.

As células foram fotografadas em microscópio invertido. O grau de espraiamento foi determinado com base nas imagens, utilizando o programa Imaje J, tendo como parâmetro a relação área do núcleo x área do citoplasma (proporção corpo celular).

Após a captura das imagens, o corante foi eluído com solução de citrato de sódio e etanol na proporção 1:1. Em seguida foi feita a leitura de absorbância em leitor de microplacas.

3.13 Análise Morfológica através de Microscopia Óptica ou de Luz (MO)

Os fibroblastos de camundongo (10.000 células por poço) foram plaqueados em placas de 24 poços, sobre lamínulas circulares, mantidas em incubadora de CO₂ *overnight* e após expostas ou não a 15 e 150 µg/mL do extrato bruto liofilizado, por 24 horas.

Lamínulas contendo células controle e tratadas foram fixadas em paraformaldeído a 2% (Electron Microscopy Sciences, Washington, NY, USA) por 30 minutos, a 22°C, lavadas com PBS e desidratadas em soluções crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, duas vezes 100%, durante 10 minutos cada etapa) e em xilol (50% de etanol + 50% de xilol, três vezes com xilol 100%).

Em seguida, foram coradas com hematoxilina de Harris (Merck), por 50 segundos, lavados em água corrente por 10 minutos, duas vezes com água destilada e corados com eosina (Merck) durante 60 segundos. Após a coloração, foram lavadas com água destilada, desidratadas em soluções crescentes de etanol (70 a 100%, durante 5 minutos cada etapa), com xilol (2 etapas de 100%, durante 5 minutos cada) e montados com Entelan (Merck). As células foram analisadas através de microscópio óptico e em seguida fotografadas nos aumentos de 40, 100 e 400X (BISCAIA et al., 2017).

3.14 Análise Morfológica e Ultraestrutural através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os fibroblastos de camundongo (10.000 células) foram plaqueados em placas de 24 poços, sobre lamínulas circulares, mantidas em incubadora de CO₂ *overnight* e após, tratadas (ou não) com o extrato bruto lyophilizado nas concentrações de 15 e 150 µg/mL por 24 horas.

Após o tratamento, essas foram fixadas em solução de Karnovski (glutaraldeído 2,0% (Electron Microscopy Sciences, Washington, NY, USA), paraformaldeído 4,0%, CaCl₂ 1mM em tampão cacodilato 0,1M (Merck) por 60 segundos. A seguir, essas foram novamente lavadas em tampão cacodilato, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (Electron Microscopy Sciences, Washington, NY, USA) por 60 segundos. Após, as células foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M por 60 segundos (no escuro em temperatura ambiente). Posteriormente foram desidratadas por concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, duas vezes 100%), por um período de 10 minutos cada etapa. Submetidas ao ponto crítico no aparelho (CPD 010 (Critical Point Dryer) 030 - Balzers), metalizadas com ouro no aparelho (SCD 030 - Balzers), sendo então analisadas no microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA3 LMU do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR (BISCAIA et al., 2017).

3.15 Ensaios de citoquímica de fluorescência para detecção de microfilamentos de actina (MMP2-MMP9)

A detecção de carboidratos específicos da superfície celular foi realizada usando Lectina WGA conjugada a FITC (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para detectar os microfilamentos de actina, foi usada a sonda de faloidina conjugada com Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

A marcação fluorescente da actina, utilizando fluorescentes derivadas de falotoxinas, permite a identificação de cultura de células inteiras com o mínimo de rompimento celular (DEVOD et al., 2001).

A imunodetecção de carboidratos pela lectina WGA mostra a presença de N-acetil-glucosamina no glicocálice (BISCAIA et al, 2017).

Os fibroblastos de camundongo (10.000 células) foram plaqueados sobre lamínulas circulares dentro de placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) e foram expostas ou não (controle negativo) por 24 horas com 15 e 150 µg/mL de extrato aquoso de *P. amalago*. As células foram então lavadas rapidamente com PBS e fixadas com paraformaldeído a 2% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) em PBS por 30 minutos a 22°C. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes em PBS, uma vez com PBS contendo glicina 0,1M (para bloquear os radicais aldeídos) e duas vezes com PBS.

Para a marcação de carboidratos da superfície celular por microscopia confocal, as células foram incubadas por 1 hora com Lectina WGA conjugada a FITC (4 mg/L) na presença de BSA a 1% em PBS à temperatura ambiente.

O citoesqueleto da célula foi marcado com Alexa Fluor® 546 Faloidina- (1: 500 em 0,01% de saponina-PBS) por 30 minutos a 22°C. Após, as células foram lavadas três vezes com PBS.

O núcleo celular foi evidenciado através do DAPI (3 ng/ml - 4',6-diamidino-2-fenilindole, dihidrocloride (Electron Microscopy Sciences, Cat. 17984-24, Hatfield, PA, EUA). Após 30 minutos de incubação, as células foram lavadas 5 vezes em PBS, e as lamínulas foram então montadas em lâminas histológicas, com meio de montagem Fluoromount-G® (Thermo Fisher Scientific, EUA) e seladas com esmalte incolor isento de formol.

As imagens foram adquiridas usando o microscópio eletrônico confocal de varredura a laser A1R MP + microscópio (Nikon Instruments Inc, Tóquio, Japão) (BISCAIA et al., 2017).

3.16 Determinação da concentração de hidroxiprolina

A quantificação de hidroxiprolina permite uma determinação indireta de colágeno presente no tecido. A hidroxiprolina e hidroxilisina são aminoácidos característicos dos diferentes tipos de colágeno produzidos pelos fibroblastos (MIENALTOWSKI; BIRK, 2014; SOLEY et al., 2016).

Neste ensaio, fibroblastos de camundongo (3T3) (10.000 células) foram plaqueados em placas de 24 poços, sobre lamínulas circulares e tratados (ou não) com 15, 50 e 150 µg/mL do extrato aquoso bruto de *P. amalago* por 96 horas. A seguir o sobrenadante foi removido e as células foram submetidas a hidrólise alcalina com NaOH (10M) a 80°C por 20 minutos e, em seguida, o hidrolisado foi oxidado com cloramina T. Finalmente, foram adicionados reagentes de Ehrlich, que complexam a hidroxiprolina em uma reação colorimétrica, a intensidade da coloração é proporcional à quantidade de hidroxiprolina tecidual. A absorvância foi medida a 550 nm (SOLEY et al., 2016).

3.17 Quantificação e atividade da metaloproteinase MMP2

A quantificação e a avaliação da atividade proteolítica da metaloproteinase (MMP2) foi realizada através do ensaio de zimografia, nas etapas descritas abaixo.

3.17.1 Concentração de proteína

O sobrenadante da cultura celular foi concentrado de 6 mL a 100 µL de volume em um SavantTM SPD1010 SpeedVac. A este volume, foram adicionados 400 uL de metanol, homogeneizado e centrifugado a 11.000 rpm por 15 segundos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de clorofórmio e 300 µL de água ultrapura, cada etapa com homogeneização e centrifugação conforme descrito acima. Três fases são formadas, a fase superior foi descartada e adicionados 300 µL de metanol, seguido por homogeneização e centrifugação a 11.000 rpm por 2 minutos. O pellet de proteína foi seco ao ar e ressuspenso com tampão RIPA (150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% desoxicolato de sódio, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) para ser submetido a zimografia.

3.17.2 Zimografia

As amostras foram submetidas à dosagem de proteína total pelo método de Bradford e adicionadas em tampão de amostra (2% SDS, 30% glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 60 mM Tris pH 6,8). As amostras foram carregadas em gel de

poliacrilamida a 12% contendo 0,1% de gelatina. Após a eletroforese, o gel foi lavado em solução de Tris 10 mM (pH 8,0) contendo Triton X-100 2,5% para remoção de SDS e renaturação de proteína. Em seguida, o gel foi incubado em uma solução contendo 5 mM de CaCl₂, 150 mM de NaCl e 1 mM de ZnSO₄ por 48 horas a 37° C. Em seguida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 e descolorado (40% metanol, 10% ácido acético). As bandas resultantes da degradação da gelatina foram analisadas por densitometria usando o software Image J.

3.17.3 Immunoblotting

As células 3T3 numa concentração de 1X10⁴ foram cultivadas em placas de 100 mm² até atingirem 80% de confluência e tratadas nas condições descritas acima. As células foram lavadas com PBS gelado e lisadas com tampão RIPA, com inibidor de protease (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher (EUA) e EDTA 1 mM. O lisado celular foi centrifugado a 10.000 g a 4°C, e o sobrenadante foi submetido à determinação de proteínas totais pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Quantidades iguais de proteína foram adicionadas ao tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% de β-mercaptoetanol) e aquecido a 100° C por 10 minutos. As amostras foram carregadas no gel de eletroforese e, em seguida, transferidas para membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Hybond ECL-GE Healthcare, Merck, Alemanha). Depois disso, a membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% em solução salina tamponada com tris (TBS; tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) com tween 20 a 0,1% por 60 minutos à temperatura ambiente. A membrana foi incubada com anticorpos anti-MMP-2 (Thermo Fischer Scientific Inc. 2C1-1D12; 1: 500) na solução de bloco durante 18 horas a 4°C. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo HRP (Sigma) de concentração 1 mg/mL (1: 5000). As lavagens entre as etapas foram feitas com TBS contendo 0,05% de tween 20 e TBS. A revelação foi realizada por quimioluminescência com substrato Luminata Forte Western HRP reagente (Millipore) (Merck, Alemanha) utilizando filme de raios-X. A intensidade das bandas foi analisada com o software ImageJ.

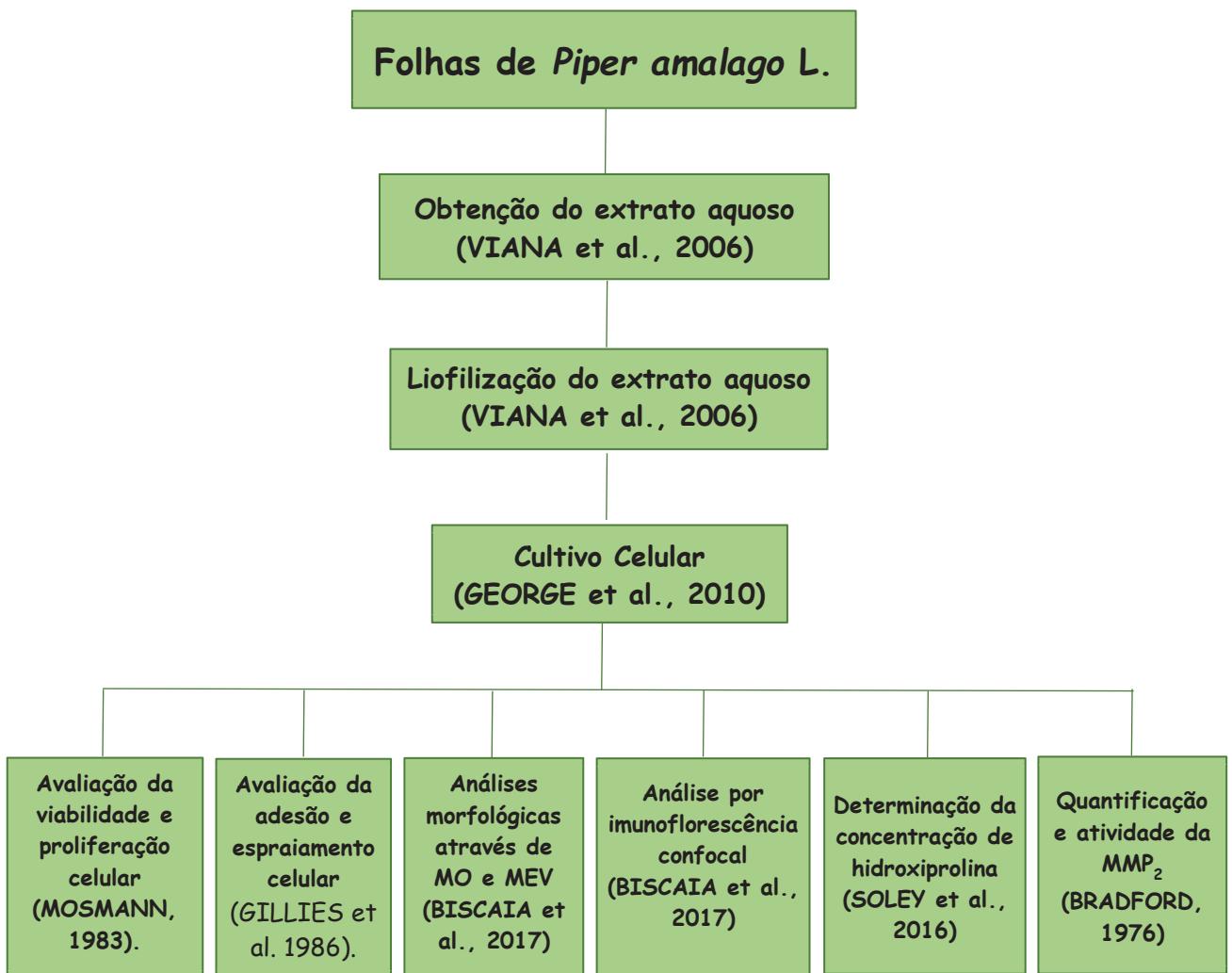
3.17 Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas por análise de variância (ANOVA: fator único) e do teste de Tukey. O intervalo de confiança adotado foi de 95% e o valor-p < 0,05.

A Análise de Variância (ANOVA - Analisys of Variance) é uma ferramenta para comparação de vários grupos ou estratos de interesse e que permite investigar a existência de diferenças significativas entre os grupos estudados (MONTGOMERY, 2008).

Baseado na amplitude “studentized range”, o teste de Tukey é utilizado para comparar todo e qualquer contraste entre duas médias de tratamentos. O teste é exato e de uso muito simples quando o número de repetições é o mesmo para todos os tratamentos (PIMENTEL GOMES, 2000).

FIGURA 9. Fluxograma dos procedimentos para a obtenção do extrato aquoso liofilizado obtido de folhas de *P. amalago* e análise em fibroblastos de camundongos (3T3).



Fonte: a autora (2021).

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos levaram a produção de dois artigos que responderam aos objetivos geral e específicos.

4.1 O primeiro artigo intitulado “Chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of *Piper amalago* L.”

O objetivo deste estudo foi determinar por CG-EM os compostos do óleo volátil obtido das folhas de *P. amalago* e avaliar sua atividade antimicrobiana. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação e a análise da atividade antimicrobiana foi realizada em discos de papel filtro impregnados com óleo volátil contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. Uma série de vinte e oito substâncias foi identificada e os principais compostos foram: β-felandreno (13,64%), E-nerolidol (8,08%), α-muuruleno (7,85%), δ-elemeno (6,42%), Germacreno D -4-ol (5,54%), β-cedro (5,15%) e α-cadinol (4,96%). Em relação à atividade microbiológica, o óleo volátil apresentou inibição de crescimento bacteriano para as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2 O segundo artigo intitulado “*In vitro* study after exposure to the aqueous extract of *Piper amalago* L. shows changes of morphology, proliferation, cytoskeleton and molecules of the extracellular matrix”.

O objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos do extrato bruto aquoso obtido das folhas de *P. amalago*, em diferentes concentrações e em diferentes tempos de incubação, utilizando o modelo *in vitro* de fibroblastos de camundongo (3T3). O extrato foi testado em diferentes concentrações no tempo de incubação de 24 horas para análise de viabilidade celular, citotoxicidade, proliferação, morfologia celular, imunomarcação, adesão e ensaios de propagação celular, bem como para determinar a concentração de hidroxiprolina e atividade da metaloproteinase MMP2. O extrato não induziu perda de viabilidade celular até a concentração de 150 µg/mL. Após exposição às concentrações de 15 e 150 µg/mL, as células avaliadas mantiveram a morfologia quando observadas através de microscopia de luz e de microscopia eletrônica de varredura. No entanto foi observado um número maior de células com mais expansões do corpo celular e maiores que as células controle. A cultura celular tratada também apresentou aumento da proliferação celular, aumento de tamanho,

maior expansão do corpo celular, células aderidas espalhadas pelo substrato e núcleo mais justaposto, central e esférico. O tratamento induziu maior adesão celular ao polímero, fibronectina e colágeno I. Os resultados bioquímicos mostraram um aumento significativo no aminoácido hidroxiprolina após exposição das células ao extrato aquoso obtido de folhas de *P. amalago* por 96 horas.

Em apêndice 1 encontram-se mais dois artigos oriundos do tema deste trabalho e publicados em revistas indexadas:

- Artigo intitulado “The wound healing effect of aqueous extract from *Piper amalago* L. in diabetic” publicado na revista EXPLORE: The Journal of Science & Healing - Qualis: A2, Factor impact: 1.775
- Artigo intitulado “Review of *Piper* species growing in the Brazilian State of Paraná with emphasize on the vegetative anatomy and biological activities” publicado na revista The Botanical Review - Qualis: A3, Factor impact: 3.083 (2020).

Latin American Journal of Pharmacy
 (formerly *Acta Farmacéutica Bonaerense*)
Lat. Am. J. Pharm. 35 (8): 1883-9 (2016)
 Qualis: C
 JCR Impact Factor 2019: 0.249

Chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of *Piper amalago* L.

Vera L.P. SANTOS * ¹, Cristina P. LIMA ¹, Ranieri CAMPOS ¹, Camila S.R. RIBEIRO ¹, Francisco A. MARQUES ², Jane M. BUDEL ³ & Iara J. MESSIAS-REASON ⁴

¹ Escola de Saúde, Centro Universitário Autônomo do Brasil – UNIBRASIL, R. Konrad Adenauer, 442, Tarumã, 82820-540, Curitiba, PR, Brasil.

² Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná – UFPR, R. Coronel Francisco Heraclito dos Santos, 100 - Jardim das Américas, 81531-980, Curitiba, PR, Brasil

³ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84040-030, Ponta Grossa, PR, Brasil.

⁴ Departamento de Patologia Médica, Universidade Federal do Paraná UFPR, Rua Padre Camargo, 280, 80060-240, Curitiba, PR, Brasil

SUMMARY. Some species of *Piper* are used in popular medicine and they have aroused interest for commercial reasons, especially because the presence of volatile oils. The species *Piper amalago* L., popularly known as “jaborandi-manso”, has been traditionally used to treat digestive problems, heart disease and burns. The aim of this study was to determine the compounds of the volatile oil by CG-MS techniques obtained from the leaves of *P. amalago* and assess their antimicrobial activity. The essential oil was obtained by hydrodistillation and the analysis of antimicrobial activity was carried out in filter paper discs impregnated with volatile oil against strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. A number of twenty-eight substances were identified and the major compounds were β -phellandrene (13.64%), E-nerolidol (8.08%), α -muurulene (7.85%), δ -elemene (6.42%), germacrene D-4-ol (5.54%), β -cedrene (5.15%), and α -cadinol (4.96%). With regard to the microbiological activity, the volatile oil showed inhibition for all the strains analyzed.

RESUMEN. Algunas especies de *Piper* se utilizan en medicina popular y han despertado el interés por razones comerciales, sobre todo debido a la presencia de aceites volátiles. *Piper amalago* L., conocido popularmente como “jaborandi-manso”, se ha utilizado tradicionalmente para tratar problemas digestivos, enfermedades del corazón y quemaduras. El objetivo de este estudio fue determinar por CG-EM los compuestos del aceite volátil obtenido a partir de las hojas de *P. amalago* y evaluar su actividad antimicrobiana. El aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación y el análisis de la actividad antimicrobiana se realizó en discos de papel de filtro impregnado con aceite volátil contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*. Se identificó una serie de veintiocho sustancias y los compuestos principales fueron β -felandreno (13,64%), E-nerolidol (8,08%), α -muuruleno (7,85%), δ -elemeno (6,42%), germacreno D-4-ol (5,54%), β -cedreno (5,15%) y α -cadinol (4,96%). Con respecto a la actividad microbiológica, el aceite volátil mostró inhibición para todas las cepas analizadas.

KEYWORDS: chemical composition, essential oils, jaborandi-manso, microbiological activity, *Piper amalago*.

INTRODUCTION

When analysing the chemical constitution of volatile oils of some genus that belong to Piperaceae family there is the remarkable presence of monoterpenes, sesquiterpenes and arylpropanoids, which are compounds that have important biological properties ^{1,2}.

Piper includes a wide range of species that produce volatile oils with importance as spice, insecticide and pharmaceutical industries ^{3,4}. Some studies that were carried out with the volatile oils extracted from *Piper* species have showed antifungal activity ⁵ an allelopathic effect on plants ⁶, insecticidal activity ⁷, acaricide activity ⁸, and antimicrobial activity ⁹.

Among the species of *Piper*, *Piper amalago* L. can be highlighted. This species is commonly known as “jaborandi-manso”, a shrub that measures 2 up to 7m in height and grows in an area that stretches from Central America to the State of Rio Grande do Sul ¹⁰. This species has volatile oils into oily cells that are present in the stem and in the leaves ¹¹. *P. amalago* is used in folk medicine for the treatment of cardiac and digestive problems, in burns, as a diuretic and in the treatment of urinary stones ¹². Some studies have provided evidence that, due to the presence of amides in their leaves and stem, this species acts during the healing wound process ¹⁰. Moreover, it has anti-inflammatory and antimicrobial activities ¹³, and antileishamianal activity ¹⁴. In addition, a phytochemical analysis has revealed the presence of vitexin and lupeol, which shows antioxidant potential ¹⁵. The aim of this study is to analyze the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oil extracted from the leaves of *P. amalago*.

MATERIALS AND METHODS

Botanical Material

Aerial vegetative parts of *Piper amalago* L., Piperaceae, were collected at Curitiba, Paraná (24°18' S and 49°37' W) in July 2012. The vegetal material was identified by a taxonomist and compared with the voucher specimens deposited in the Municipal Botanical Museum of Curitiba, under register number 71947. The leaves were collected, dried at room temperature and sheltered from light and humidity when stored.

Volatile oil extraction

Dried leaves from *P. amalago* (60 g) were fragmented and submitted to hydrodistillation in a Clevenger apparatus for 4 h. The analysis of the volatile oil obtained was carried out in the Chemistry Department of the Federal University of Paraná.

GC-MS analysis

The samples of the oil and n-alkane standards were analyzed by coupled GC/MS with a Shimadzu CGMS-QP2010 Plus system equipped with a quadrupole detector using a Rtx-5MS (Crossbond 5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane) low bleeding column (30 × 0.25 mm, 0.25 µm), using helium as the carrier gas, at a flow of 1.02 mL/min. Oven temperature was initially kept at 60 °C for 1 min and increased at a rate of 3 °C/min to 250°C. The mass spectrometer operated in electron impact mode (70 eV) with a mass range set from 40 to 350 m/z. The interface and source temperatures were set at 250°C. The Kovats retention index was calculated for the compounds and their mass spectra were compared with the literature¹⁶.

Antimicrobial activity

The analysis of antimicrobial activity was conducted by the use of paper discs impregnated with volatile oil obtained from the leaves of *P. amalago*. The strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, were grown in BHI (brain-heart infusion) broth, incubated at 35 °C for 24 h. Then a sample was inoculated on Mueller-Hinton agar and incubated at 35 °C for 24 h. Each bacteria culture was diluted in sterile saline (5 mL) and adjusted 0.5 MacFarland scale's turbidity. The Chloramphenicol (30 µg) was used as positive control. The inoculated plates with disperse disks were incubated at 35 °C for 24 h and inhibition halos were measured, the final result corresponded to the halos average found in the test's triplicate. In order to differentiate bacteriostatic activity from bactericide, a portion of the agar from the formed inhibition zone was retained and placed in a tube containing the BHI liquid medium. This was incubated at 35 °C for 24 h. After this, a sample of the broth was sown in the BHI solid medium, which was incubated at 35 °C. The growth of the colonies in the BHI solid medium indicates that the oil has bacteriostatic activity, while the lack of growth suggests that there is bactericide activity after a period of 24 h.

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of the volatile oil

The CG/MS analysis of the samples of the volatile oils obtained from the leaves of *P. amalago* reveals the presence of 28 substances that represent 99.35% of the constituents of the oil. The identity of the substances was accessed by means of comparison with the literature, and the results are shown in Table 1.

Compound	Icala ^a	Hit b	Área (%)
α-thujene	932	930	4,1
β-phelandren	1030	1030	13,64
Camphor	1099	1099	1,2
Crypton	1186	1186	0,77
Piperidone	1266	1260	1,93
(E) methyl geranate	1327	1325	1,31
δ-elemene	1338	1339	6,42
Sativen	1392	1392	2,76
β-cedrene	1421	1421	5,15
β-cariofyllene	1429	1426	0,39
β-gurjunene	1433	1434	0,85
α-humulene	1455	1455	1,36
γ-himachalene	1482	1483	2,91
(trans) Muurola-4(14),5-diene	1495	1496	2,11
α-muurulene	1499	1499	7,85
β-bisabolene	1508	1506	2,9
γ-cadinene	1515	1512	2,49
Eugenol acetate	1524	1524	4,34
Elemol	1550	1550	1,32
E-nerolidol	1565	1563	8,08
Germacreno D 4-ol	1579	1576	5,54
β-oxide cariophyllene	1582	1581	4,36
Caryophyllene oxide	1587	1581	2,36
Guaiol	1599	1601	1,43
γ-eudesmol	1632	1631	3,13
α- Muurolol	1645	1645	4,59
α-cadinol	1658	1654	4,96
β-bisabolol	1670	1666	1,1

Table 1. Percentage of the constituents of volatile oil in the leaves of *Piper amalago* L.

^a Index of calculated retention ^b Index of the retention from the literature.

Among the identified substances, β-phelandrene (13.64%) is the major compound. Other substances which show the highest percentages are as follows: β-phelandrene (13.64%), Enerolidol (8.08%), α-muurulene (7.85%), δ-elemene (6.42%), germacreno D 4-ol (5.54%), βcedrene (5.15%), and α-cadinol (4.96%).

Out of the total number of substances that are found, 20 are sesquiterpenes, in which the most importants are E-nerolidol, α-muurulene, δ-elemene, D-4-ol germacene, β-cedrene and αcadinol, along with 8 monoterpenes, in particular. The β-phelandrene is a monoterpenene that is found as a major compound of volatile oils of

different plants, and it presents insecticide, repellent¹⁷, bactericide and fungicide, activities¹⁸. By means of CG-EM analysis of the volatile oil of *P. amalago*, which were found in large amounts by Ferraz et al.⁸, there was a mixture of monoterpenes, limonene and β-phelandrene (20.52%).

E-nerolidol is a sesquiterpene found in the volatile oils of a wide range of medicinal plants¹⁹. It is a natural fixing agent used: in the cosmetics and food industry²⁰, as a potentializing agent for the penetration of therapeutic drugs in a transdermal form²¹ and because it has antioxidant potential²². The α-thujene can be found in volatile oils of many different plants and it provides a spicy flavor to some plants²³.

Another substance is piperitone that is employed as a reagent for the synthesis of thimol and menthol, and as an additive in preparations for medical purposes. In addition, it has use as flavorizant and for the production of antifungal agents²⁴, as well as it has insecticide properties²⁵.

The β-caryophyllene presents anti-inflammatory, antinociceptive, neuroprotective and anxiolytic effects, acting as antidepressant²⁶. In addition, its oxide presents anti-bacterial activity²⁷. The β-bisabolol presents anti-inflammatory activity, antispasmodic, antibacterial and antifungal effects²⁸. The eugenol acetate is an ester that has, in some cases, a bactericidal effect superior than eugenol's²⁹.

The α-cadinol presents antifungal activity and hepatoprotecting action³⁰. Moreover, camphor is absorbed by the skin quickly, producing a sensation of warmth and cold at the same time, acts as local anesthetic and possess antimicrobial action³¹.

The α-muurulene is a sesquiterpene that has shown antimicrobial activity³² and antifungal activity³³. The δ-elemene is a sesquiterpene that presents: antitumor activity³⁴; a cytotoxic effect in leukemia cells³⁵ and an anti-proliferative effect of glioma cells³⁶.

The β-cedrene can be described as possessing antiseptic, anti-inflammatory, tonic, astringents, diuretic, sedative, insecticide, and antifungal effects³⁷.

The α-humulene presents anti-inflammatory property and reduces the formation of edema after injections of histamine³⁸. In addition it inhibites the tumor necrosis factor (TNF-α) and interleukin-1 (IL1-β) in rats in carrageenan model³⁹.

Previous studies with volatile oil of *P. amalago* have revealed the predominance of the following: E-cariophyllene, caryophyllene oxide, α-pinene, germacrene D and

biciclogermacrene ⁴⁰, α-pinene, camphene, limonene, borneol, δ-cadinene and spathulenol ⁴¹.

Compound majorities like γ-muurolene, germacrene D, biciclogermacrene, spatuolenol and α-cadinol were described in *P. amalago* by Morandim-Giannetti et al. ⁴² and γ-patchoulene and the (cis) cadine-1,4-diene were described by Souza et al. ⁴³.

Studies carried out with oil extracted from the leaves of *P. amalago* that were collected in the State of Mato Grosso do Sul, showed a seasonal variation in their composition, with the main constituents being (Z)-β-ocimene in the collection undertaken in the winter and iso-3-tujanol in the collection conducted in the autumn and spring ⁴⁴.

The identification of volatile oils found in different parts of *P. amalago* collected in Dourados-MS [State of Minas Gerais], showed the presence of α-amorphene, p-cymene and (E)-methyl geranate in their leaves; α-amorphene (14.4%), α-muurolol (6.3%) and α-gurjunene in the roots; α-amorphene, α-muurolol and longifolene in the stems and germacrene D, silphiperphol-6- eno and limonene in the flowers ⁴⁵.

The production of essential oils by the plants can be attributed to secondary metabolism. The secondary metabolites may undergo qualitative and quantitative alterations since there are some factors that can influence what they contain. Among these, it is worth noting genetic factors, climatic conditions (both seasonal and daily) and edaphic conditions ⁴⁶.

In the biosynthesis of terpenes three molecules of acetyl CoA are bounded, in several steps to form mevalonic acid that is than pyrophosphorilated, decarboxilated and dehydrated to produce isopentenyl diphosphate (IPP). Initially the IPP and dimetilalil diphosphate (DMAPP) react to produce geranyl diphosphate (GPP), a molecule with 10 carbon atoms, from that monoterpenes are formed. The GPP may, then, connect to another molecule of IPP to produce a compound of 15 carbon atoms, farnesil diphosphate (FPP) that is the precursor of most sesquiterpenes ⁴⁷.

A study carried out with *Piper obliquum* Ruiz & Pav. ⁴⁸ showed that the chemical variations observed in the different months of collection can be attributed to the influence of the environment on the variation of the compounds of the secondary metabolism of the plants. The period between February and May was when there was the greatest concentration of the three majority compounds; these were limonene, which had an average to high presence and displayed a lower concentration in these periods. The greatest amount of substances was obtained in the month of August.

In the case of *Piper aduncum* L., the greatest yields of volatile oils obtained from the leaves in the period being studies occurred in the months that were hottest and had the most rainfall. The plants seem to flourish in these months ⁴⁹.

Analysis of antimicrobial properties

The results from the assessment of the antimicrobial activity are shown in Table 2. The positive controls of inhibition, the gentamicin antibiotics and chloramphenicol, produced an antibacterial action in five of the microorganisms employed.

Micro-organisms	Essential oils Zone Diameter (mm)	Gentamicin Zone Diameter (mm)	Cloramphenicol Zone Diameter (mm)
<i>Enterococcus faecalis</i>	13 a	17 a	25 b
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 a	22 b	30 c

Table 2. Antibacterial activity of volatile oil in the leaves of *Piper amalago*. Different letters on the same line indicate results that were statistically different from each other.

The volatile oil obtained from the leaves of *Piper amalago* shows zones of inhibition for the strains of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*.

By employing the Broth Microdilution Technique, Lima et al. ⁵⁰ found evidence of the inhibitory power of the volatile oil of *P. amalago* in concentrations of 5% (10 µg/mL) and 10% (20 µg/mL). That evidence showed that in lower concentrations (10 µg/mL), the oil was more effective in about 50% over the gram-positive bacteria.

The volatile oils extracted from stems and leaves of *P. aduncum* L. showed antibacterial activity over different strains of *Staphylococcus* spp. ⁹ and it seems to play a role, in an inhibitory way, when tested over the growth of *S. aureus* ⁵¹.

The extract obtained from the stem and leaves of *P. aduncum* showed antibacterial activity ⁵² and the extract obtained from the roots, stems, leaves and fruit of *P. caldense* is described like having activity against different species of bacteria ⁵³ and the extract that was only obtained from the leaves also showed antibacterial activities ⁵⁴.

The volatile oils extracted from the leaves of *Piper callosum* Ruiz & Pav. showed microbial activity for *S. aureus* ⁵⁵. For the volatile oil obtained from leaves of *Piper malacophyllum* (C. Presl) C.DC., is described ample antimicrobial activity for the following gram-positive bacteria 7. In the case of *Piper mollicomum* (Kunth) Kunth ex Steud., the volatile oils obtained from the leaves showed inhibition of the bacterial

growth 55 and the volatile oils obtained from the stems and leaves of *Piper regnelli* var. *pallescens* (C.DC.) Yunck. evidenced activity against *S. aureus*⁵⁶.

The volatile oil of *P. nigrum* L. (black pepper) showed a significant antimicrobial activity against the gram-positive bacteria⁵⁷. These results obtained by Stoyanova et al.⁵⁷ were not the same as those found by Trajano et al.⁵⁸, which showed that the volatile oil of black pepper was only not active against gram-positive bacteria.

In Table 3 are described some species of *Piper* with their respective antimicrobial activities.

Spécies	Bactéria	Pharmaceutical Form	Parts Used	Author
<i>Piper aduncum</i>	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. pyogenes</i> <i>S. saprophyticus</i>	Essential oil	Stems and leaves	Brazão 9
<i>P. aduncum</i>	<i>S. saprophyticus</i>	Extract	Stems and leaves	Muller ⁵²
<i>P. aduncum</i>	<i>S. aureus</i>	Essential oil	-----	Gomes et al. ⁵¹
<i>P. caldense</i>	<i>S. aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Micrococcus luteus</i>	Extract	Roots, stems, leaves and fruit	Freitas et al. ⁵³
<i>P. caldense</i>	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	Extract	Leaves	Justen & Magina ⁵⁴
<i>P. callosum</i>	<i>S. aureus</i>	Essential oil	Leaves	Calderari ⁵⁵
<i>P. malacophyllum</i>	<i>S. aureus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter baumanii</i>	Essential oil	Leaves	Santos et al. ⁵
<i>P. mollicomum</i>	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Essential oil	Leaves	Calderari ⁵⁵
<i>P. nigrum</i>	<i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i>	Resin oil	Dried fruits	Stoyanova et al. ⁵⁷
<i>P. regnelli</i> var. <i>pallescens</i>	<i>S. aureus</i>	Extract	Stems and leaves	Lemos et al. ⁵⁶

Table 3. Description of some of the *Piper* species and respective antimicrobial activities.

CONCLUSION

The results of this study show that the volatile oils obtained from the leaves of *Piper amalago* L. through the process of hydrodistillation, showed 28 substances after

to be analyzed by CG-MS, and these compounds represent 99.35% of the constituents of volatile oil. In the analysis of antimicrobial activity, the volatile oils obtained from the leaves of *P. amalago* evidenced zone of inhibition for the strains of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*.

REFERENCES

1. Cremasco, M.A. & N.P. Braga (2010) Acta Amaz. 40: 737-40.
2. Silva, A.L., F.C.M. Chaves, R.C. Lameira & H.R. Bizzo (2013) Ver. Bras. Plantas Med. 15: 670-4.
3. Souza, V.C. (2005) Botânica sistemática, Nova Odessa: Plantarum.
4. Souza, L.A., A.L.M. Albiero, O.J.G. Almeida, W.A.L. Lopes, K.S.M. Mourão & I.S. Moscheta (2009) Lat. Am. J. Pharm. 28: 103-7.
5. Santos, T.G., R.A. Rebelo, E.M. Dalmarco, A. Guedes, A.L. Gasper, A.B. Cruz, et al. (2012) Quím. Nova 35: 477-81.
6. Souza Filho, A.P.S., M.A.M. Vasconcelos, M.G.B. Zoghbi & R.L. Cunha (2009) Acta Amaz. 39: 389-96.
7. Soares, C.S.A., M. Silva, M.B. Costa, C.E.S. Bezerra, L.M. Carvalho & A.H.V. Soares (2012) Rev. Bras. Agroecol. 7: 169-75.
8. Ferraz, A.B.F., J.M. Balbino, C.A. Zini, V.L.S. Ribeiro, S.A.L. Bordignon & G. Poser (2010) Parasitol. Res. 107: 243-48.
9. Brazão, M.A.B. (2012) Dissertação, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém.
10. Guimarães, E.F. & M.C. Valente (2001) Piperaceae - *Piper*, Itajaí: REITZ.
11. Santos, V.L.P., C.R.C. Franco, E. Amano, I.J. Messias-Reason & J.M. Budel (2015) Rev. Bras. Farmacogn. 25: 85-91.
12. Novaes, A.S., J.S. Mota, A. Barison, C.L. Veber, F.J. Negrão, C.A.L. Kassuya, et al. (2014) Phytomedicine 21: 523-8.
13. Carrara, V.S., L.Z. Serra, L. Cardozo-Filho, E.F. Cunha-Júnior, E.C. Torres-Santos & D.A.G. Cortez (2012) Molecules 17: 15-33.
14. Carrara, V.S., E.F. Cunha-Júnior, E.C. Torres-Santos, A.G. Corrêa, J.L. Monteiro, I.G Demarchi, et al. (2013) Rev. Bras. Farmacogn. 23: 447-54.

15. Rovani, G., V.L.P. Santos, O.G. Miguel, J.M. Budel & R. Campos (2013) Cad. Esc. Saúde Unibrasil 2: 164-77.
16. Adams, R.P. (2007) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Illinois: Allured Publishing Corporation.
17. Tsoukatou, M., C. Tsitsimpikou, C. Vagias & V. Roussis (2001) Z. Naturforsch. 56: 211-5.
18. Vila, R., L. Valenzuela, H. Bello, S. Canigueral, M. Montes & T. Adzet (1999) Planta Med. 5: 178-9.
19. Budel, J.M., M.R. Duarte, M.W. DollBoscardin, P.V. Farago, N.I. Matzenbacher, A. Sartoratto, et al. (2012) J. Essent. Oil Res. 24: 19-24.
20. Frizzo, C.D., Dallacasa, E., Sarafini, L.A. & E. Cassef (2000) XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. I Brazilian Congress of Phase Equilibrium and Fluid Properties for Chemical Process Design, Água de São Pedro, Minas Gerais.
21. Koudou, J., A.A. Abena, P. Ngaissoma & J.M. Bessiére (2004) Fitoterapia 76: 700-3.
22. Nogueira Neto, J.D., D.P. Souza & R.M. Freitas (2013) Rev. Ciênc. Farm. Bás. Apl. 34: 125-30.
23. Gruenwald J. (2004) Economics, Medical, Montvale: Thomson Healthcare.
24. Ferreira, M. & P.E.T. Santos (1997) IUFRO Conference on Silviculture ans Improvement of Eucalyptus, Salvador, Bahia.
25. Vidal, J., A. Carbajal, M. Sisniegas & M. Bobadilla (2008) Rev. Peru. Biol. 15: 103-09.
26. Bahi, A., S. Al Mansouri, E. Al Memari, M. Al Ameri, S.M Nurulain & S. Ojha (2014) Physiol. Behav. 135: 119-24.
27. Magiatis, P., A.L. Skaltsounis, I. Chinou & S.A. Haroutounian (2002) Z. Naturforsch. C. 57: 287-90.
28. Derwich, E., C. Benziane, A. Boukir & L. Benaabidate (2009) Chem. Bull. Politehnica Univ. Timisoara 54: 85-8.
29. Chiaradia, V., V. Detofol, T. Orlando, S. Piazza, M.S.P. Bruna, R.L. Cansian, et al. (2012) XIX Encontro de Química da Região Sul, Tubarão, Santa Catarina, novembro de 2012.
30. Tung, Y.T, C.C. Huang, S.T. Ho, Y.H. Kuo, C.C. Lin, C.T. Lin, et al. (2011) J. Agric. Food Chem. 59: 8117-23.

31. Moqrish, A., S.W. Hwang, T.J. Earley, M.J. Petrus, A.N. Murray, N. Amber, et al. (2005) *Science* 307: 1468-72.
32. Porter, N.G. & A.L. Wilkins (1998) *Phytochemistry* 50: 407-15.
33. Edrada, R.A, V. Wray, D. Handayani, P. Schupp, M.B.O. Veros & P. Proksch (2000) *Stud. Nat. Prod. Chem.* 21: 291-2.
34. Yang, H, X. Wang & L. Yu (1996) *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 18: 169-72.
35. Zou, L., W. Liu & L. Yu (2001) *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 23: 196-8.
36. Zhou, H.Y., J.K. Shen, J.S. Hou & Y.M. Qiu (2003) *Ai Zheng* 22: 959-63.
37. Jeong, H.U., S.S Kwon, T.Y Kong, J.H Kim & H.S. Lee (2014) *J Toxicol Environ Health A*. 77: 1522-32.
38. Passos, G.F., E.S. Fernandes, F.M. Cunha, J. Ferreira, L.F. Pianowski, M.M. Campos, et al. (2007) *J. Ethnopharmacol.* 110: 323-33.
39. Fernandes E.S., G.F. Passos, R. Medeiros, F.M. Cunha, J. Ferreira J., M.M. Campos, et al. (2007) *Eur. J. Pharmacol.* 569: 228-36.
40. Mesquita, J.M.O., C. Cavaleiro, A.P. Cunha, J.A. Lombardi & A.B. Oliveira (2005) *Braz. J. Pharmacogn.* 15: 6-12.
41. Potzernheim, M., H.R. Bizzo, A.T.S. Costa, R.F. Vieira, C.M Carvalho & L.A.M.B. Gracindo (2006) *Rev. Bras. Plantas Med.* 8: 10-2.
42. Morandim-Giannetti, A.A., A.R. Pin, N.A.S Ietro, H.C. Oliveira, M.J.S. Mendes-Giannini, A.C Alécio, et al. (2010) *J. Med. Plant. Res.* 4: 1810-4.
43. Souza, D.S. & Mota, J.S. (2010) 33^a Reunião Anual da Sociedade B Águas de Lindóia.
44. Fernandes, C.V., G.T. Vitorino, C.A.L. Cardoso, E.B. Caramão & J.S. Mota (2012) 35^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, São Paulo.
45. Mota, J.S., D.S. Souza, C.V. Boone, L.C. Cardoso & E.B. Caramão (2013) *J. Essent. Oil Bear. Plants* 16: 11-6.
46. Morais, A.S. (2009) *Hortic. Bras.* 27: Suplemento - CD Rom.
47. Jakiemu, E.A.R. (2008) Dissertação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
48. Aizzo, J.R.S. (2013) Dissertação, Universidade Federal de Rondônia, Brasil.
49. Ming, L.C., F.C.M. Chaves, M.O. Marques, & M.A.A Meireles (2002) 42º Congresso LatinoAmericano de Horticultura, Uberlândia, Brasil.
50. Lima, V.T. (2012) Universidade Paranaense, Umuarama, Paraná.

51. Gomes, A.C., S.P. Canova & L.P.V. Mattos (2013) 13º CONIC-SEMESP, Faculdade Anhanguera de Campinas, São Paulo.
52. Muller, E.D (2011) Dissertação, Universidade do Vale do Itajaí.
53. Freitas L.A.B., J.M. Araújo & C.S. Ramos (2013) XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX, Recife.
54. Justen, M. & M.D.A. Magina (2007) Universidade Regional de Blumenau, Santa Catarina.
55. Calderari, M.T. (2002) Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
56. Lemos, C.O.T., V.A.S. Garcia, R.M. Gonçalves, I.C.R. Leal, V.L.D. Siqueira, L. Cardozo Filho, et al. (2012) J. Supercrit. Fluid. 71: 4-70.
57. Stoyanova, A., Z. Denkova, N. Nenov, A. Slavchev, L. Jirovetz, G. Buchbauer, et al. (2006) Elec. J. Env. Agricult. Food Chem. 5: 1615-23.
58. Trajano, V.N., E.O. Lima, E.L. Souza & A.E.R. Travassos (2009) Ciênc. Tecnol. Aliment. 29: 542-5.

In vitro study after exposure to the aqueous extract of *Piper amalago* L. shows changes of morphology, proliferation, cytoskeleton and molecules of the extracellular matrix

Vera Lucia Pereira dos Santos^{a,b}; Célia Regina Cavichiolo Franco^c; Ricardo Wagner^d, Caroline Dadalt Silva^e, Giane Favretto^f; Regiane Stafim da Cunha^f; Andréa Emilia Marques Stinghen^f; Luciane Mendes Monteiro^g; Julia Emília Bussade^h; Jane Manfron Budel^g; Iara José de Messias-Reason^b

- a. Escola Superior de Saúde, Biociências, Meio Ambiente e Humanidades, Centro Universitário Internacional Uninter, Campus 13 de Maio, Rua 13 de maio, 538, CEP: 80510-030, Curitiba, PR. * vera.s@uninter.com; 055 41 992517-9971
- b. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Universidade Federal do Paraná, Brasil, Rua XV de Novembro, 1299, Centro, CEP: 80060-000, Curitiba, PR, Brasil.
- c. Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, Centro Politécnico, CEP: 82590-30, Curitiba, PR, Brasil.
- d. Departamento de Análises Clínicas, Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Campus III, Sede Botânico, CEP: 80210-170, Campus III, Curitiba, PR, Brasil.
- e. Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, Centro Politécnico, CEP: 82590-30, Curitiba, PR, Brasil.
- f. Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, Centro Politécnico, CEP: 82590-30, Curitiba - PR, Brasil.
- g. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, CEP: 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brasil.
- h. Departamento de Línguas Modernas, Universidade do Mississípi, MS, USA.

Abstract

Piper amalago L. is a medicinal plant traditionally used as a healing agent for wounds, burns, abscesses, boils, and insect bites. The current study aimed to evaluate the possible effects of the aqueous crude extract obtained from *P. amalago* leaves, in different concentrations and in different incubation times, using the in vitro model of mouse fibroblasts (3T3). The extract was tested in different concentrations at the 24 h incubation time for analysis of cell viability, cytotoxicity, proliferation, cell morphology, immunostaining, adhesion and cell spreading assays, as well as to determine the hydroxyproline concentration and activity of the metalloproteinase MMP2. Morphologically, after exposure to the concentrations of 15 and 150 µg/mL, the cells maintained the morphology, yet a greater number of cells with more expansions of the cell body and larger than the control cells were observed. The treated cell culture also showed a greater number of cells, larger cells, a greater expansion of the cell body, adherent cells spread over the substrate, and a more juxtaposed, central and spherical nucleus. The treatment induced greater cell adhesion to the polymer, fibronectin, and collagen I. Biochemical results showed a significant increase in the hydroxyproline amino acid after exposure for 96 h. The extract did not induce loss of cell viability until

the concentration reached 150 µg/mL, positively modulating proliferation, morphology, adhesion, degree of spreading, and organization of microfilaments. The extract also promoted a significant increase in the hydroxyproline amino acid.

Keywords: Fibroblast; Jaborandi-manso; 3T3 Strain.

Resumo

Piper amalago L. é uma planta medicinal tradicionalmente usada como agente de cura para feridas, queimaduras, abscessos, furúnculos e picadas de insetos. O presente estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos do extrato bruto aquoso obtido das folhas de *P. amalago*, em diferentes concentrações e em diferentes tempos de incubação, utilizando o modelo *in vitro* de fibroblastos de camundongo (3T3). O extrato foi testado em diferentes concentrações no tempo de incubação de 24 horas para análise de viabilidade celular, citotoxicidade, proliferação, morfologia celular, imunomarcação, adesão e ensaios de propagação celular, bem como para determinar a concentração de hidroxiprolina e atividade da metaloproteinase MMP2. Morologicamente, após exposição às concentrações de 15 e 150 µg/mL, as células mantiveram a morfologia, porém foi observado um número maior de células com mais expansões do corpo celular e maiores que as células controle. A cultura celular tratada também apresentou maior número de células, células maiores, maior expansão do corpo celular, célulasaderidas espalhadas pelo substrato e núcleo mais justaposto, central e esférico. O tratamento induziu maior adesão celular ao polímero, fibronectina e colágeno I. Os resultados bioquímicos mostraram um aumento significativo no aminoácido hidroxiprolina após exposição por 96 h. O extrato não induziu perda de viabilidade celular até a concentração atingir 150 µg/mL, modulando positivamente a proliferação, morfologia, adesão, grau de disseminação e organização dos microfilamentos. O extrato também promoveu um aumento significativo no aminoácido hidroxiprolina.

Palavras-chave: Fibroblasto; Jaborandi-manso; Linhagem 3T3.

1. Introduction

Some plant species are popularly used in various regions of Brazil as healing agents (Piriz et al., 2014). Compounds and extracts from the aerial parts and roots of *Piper* species have been studied in order to elucidate their benefit in the healing process (Bastos et al., 2011; Jardim, 2011; Paco et al., 2016; Santos et al., 2020).

Piper amalago L., popularly known as jaborandi-manso, is a shrub that measures 2 to 7 m, native from Central America and Brazil (Parmar et al., 1997; Guimarães & Valente, 2001). It is an aromatic plant that produces essential oil (Santos et al., 2015). In Brazil, its leaves are used in traditional medicine as a healing agent for wounds, burns, abscesses, boils, and insect bites (SEMA, 2003; Alves et al., 2008; Bratti et al., 2013; Salehi et al., 2019). Additionally, *P. amalago* is an analgesic and digestive aid (Facundo et al., 2008), use to treat urinary stones and heart problems (Novaes et al., 2014). Furthermore, in Puerto Rico, the masticated leaves of *P.*

amalago are put on bleeding cuts; whereas in Mexico, the Huasteco-Maya tribes use *P. amalago* to treat edema, inflammations, and as an antipyretic agent (Durant-Archibald et al., 2018).

Pharmacological studies, performed with *P. amalago*, showed anti-inflammatory (Sosa et al., 2002; Novaes et al., 2014), antimicrobial (Carrara et al., 2012; Santos et al., 2016), schistosomicidal (Carrara et al., 2014), diuretic, anti-lithiasic, (Novaes et al., 2014), anxiolytic (Lopes et al., 2012), anti-Leishmania (Carrara et al., 2013), and healing activities (Guimarães & Valente, 2001). Recently, the topical application of the aqueous extract, produced from *P. amalago* leaves, aided in the healing of a lacerated wound in the left thumb of a patient with type 2 diabetes mellitus over a period of 15 days in study by Santos et al. (2020).

Phytochemical analysis of *P. amalago* leaves showed the presence of amides, alkaloids, condensed tannins, flavonoids, and triterpenes (Domínguez et al., 1985; Carrara et al., 2013; Lopes et al., 2012; Rovani et al., 2013; Novaes et al., 2014; Santos et al., 2020). Essential oils of *P. amalago* leaves evidenced the presence of monoterpenoids and sesquiterpenoids (Carrara et al., 2010; Salehi et al., 2019).

Healing involves numerous cellular and biochemical events that interact for the regeneration of injured tissue. The healing process has three phases: inflammatory; proliferation or granulation, and remodeling or maturation (Campos et al., 2007; Peng et al., 2013; Medeiros & Dantas Filho, 2016; Luciano et al., 2021). It is a complex process involving growth factors, cytokines and chemokines (Peng et al., 2011; Peng et al., 2013; De Mais et al., 2016). In a few hours after the injury, the inflammatory phase begins with increased vascular permeability, secretion of cytokines and growth factors, with activation of cell migration (Medeiros & Dantas Filho, 2016).

The proliferation phase is responsible for the closing of the injury, in which epithelialization, fibroplasia and angiogenesis occur. Fibroblasts and specialized cells attract chemically attracted cells to the inflammation site in fibroplasia, proliferation, biosynthesis and secretion of the extracellular matrix components occur (Medeiros & Dantas Filho, 2016).

The fibroblasts act in the remodeling phase producing collagen and depositing it in an organized way. The collagen produced initially is Type III collagen, and it is gradually replaced by Type I collagen (Peng et al., 2011; Peng et al., 2013; Cunha et al., 2015). Fibroblasts also produce metalloproteinase inhibitors (TIMPs). Metalloproteinases (MMPs) are enzymes that catalyze extracellular matrix proteins.

Together, MMPs and TIMPs form a complex biological system that maintain extracellular matrix homeostasis (MEC) (Trengove et al., 1999; Gill & Parks, 2008).

Metalloproteinases are enzymes that degrade proteins in the extracellular matrix. The MMP family includes approximately 25 proteins, being gelatinase B (MMP-9) and gelatinase A (MMP-2), two closely-related members of the MMP family that degrade collagen denatured or gelatins (Visse & Nagase, 2003). In addition, metalloproteinases have important functions in several biological processes, for example, in morphogenesis, and in all stages of healing, such as tissue repair and remodeling in response to injury. In addition to these important functions, it is noteworthy that metalloproteinases are very important in structural and functional tissue maintenance, so they do not lose their normal architecture (Araújo et al., 2011).

In wound healing, the main effects induced by the active principles present in plant extracts are those that have antimicrobial, and antioxidant activities, as well as those that induce cell proliferation, angiogenesis; in addition to those activities that contribute to the increase in collagen production (Budovsky et al., 2015).

Considering the traditional uses of leaves of *P. amalago* as a healing agent, the present study aimed to evaluate the possible effects of the aqueous crude extract obtained from *P. amalago* leaves on cell viability, cytotoxicity, proliferation, cell morphology, immunostaining, adhesion, and cell spreading assays. In addition, this study aimed to determine the hydroxyproline concentration and activity of the metalloproteinase MMP2, using an *in vitro* model of mouse fibroblasts (3T3) in different concentrations and incubation times, in order to indicate a possible validation of its popular use as a healing agent.

2. Methodology

To carry out this study, a quantitative methodology was used in an experimental model (Pereira et al., 2018).

2.1 Plant material

Aerial vegetative parts of *Piper amalago* L., Piperaceae, were collected in Curitiba, Paraná (24° 18' S and 49° 37' W), in May 2016. The vegetal material was identified by a taxonomist and compared with the voucher specimens deposited in the Municipal Botanical Museum of Curitiba, and was registered under number 71947.

The access to the plant material was permitted and licensed by Genetic Heritage Administration Council (CGEN/SISGEN) and was registered under number A14F6AF.

2.2 Obtaining the aqueous extract

The aqueous extract of the leaves of *P. amalago* was obtained according to the methodology described by Viana et al. (2006). The dried leaves were ground for 30 seconds; and then, 75 g of crushed material were mixed in 500 mL of distilled water for homogenization under agitation for 1 min. The mixture was stored in glass containers kept at rest for 24 h at 5°C. After the cooling period, the liquid extract was filtered to remove residues and particulate material.

2.3 Obtaining the lyophilized product

The aqueous extract was frozen at -65°C, after being subjected to negative pressure (vacuum), to remove the water by sublimation. The product obtained has a porous structure free of moisture, capable of being reconstituted in water. A Virtis SP Scientifica freeze dryer, BenchTop Pro 8L - XL70 model, was used (Viana et al., 2006).

2.4 Cell culture

3T3 mouse fibroblasts (ATCC® CRL-1658TM) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM, supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 10 mM Hepes, 0,25 µg/mL penicillin-streptomycin in 0,85% saline, 3.7 g/L sodium bicarbonate at 37°C in 5% CO₂ in humidified atmosphere (George et al., 2010).

2.5 Cell viability, cytotoxicity and proliferation assays

3T3 cells were exposed to the aqueous extract of *P. amalago*, in a time-dependent concentration. Cell viability, cytotoxicity and proliferation were measured using neutral red as described by Borenfreund & Puerner (1985), MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), as described by Mosmann (1983) and Crystal Violet, Crystal Violet Gillies et al. (1986) assays, respectively. All experiments were compared to cells in the absence of aqueous extract of *P. amalago* (control condition).

2.6 Cell morphology

Cell morphology was analyzed by light microscopy (LM) and scanning electronic microscopy (SEM). Cells (1×10^4) cultured in 24-well plates over glass coverslips (Corning), exposed or not for 24 h to 15 and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aqueous extract of *P. amalago*, were fixed in 2% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Washington, NY, USA), for 30 min, at 22°C, washed with PBS, dehydrated in an ethanol series and stained with hematoxylin and eosin. Coverslips were mounted in Entelan® and examined by LM. For SEM, cells were fixed for 1 h in Karnovski solution (2% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Washington, NY, USA), 4% paraformaldehyde, CaCl_2 1 mM in sodium cacodylate buffer 0.1 M (Merck). Washed and post-fixed in 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences, Washington, NY, USA). Washed in sodium cacodylate buffer 0.1M for 1 h (in the dark at room temperature) and then dehydrated using increasing ethanol concentrations. The samples were dried to critical point and metallized using gold. Images were acquired on TESCAN VEGA3 LMU microscope of UFPR Electronic Microscopy Center (Biscaia et al., 2017).

2.7 Fluorescence cytochemistry assays

Cells (1×10^4) were grown on 13-mm-diameter glass coverslips in 24-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) and were exposed or not (the negative control) for 24 h with 15 and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aqueous extract of *P. amalago*. Cells were then rapidly washed with PBS and fixed with 2% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) in PBS for 30 min at 22°C, subsequently washed with PBS. For confocal microscopy, marking of cell surface carbohydrates, cells were incubated for 1 h with Lectin WGA conjugated to FITC (4 mg/mL) in the presence of 1% BSA in PBS at room temperature. The cell's cytoskeleton was marked with Alexa Fluor® 546 Faloidina- (1:500 in 0,01% de saponin-PBS) for 30 min at 22°C. After, cells were washed three times with PBS. For all nuclear fluorescent using Fluoromount-G® mounting medium with DAPI (Electron Microscopy Sciences, Cat. 17984-24, Hatfield, PA, USA). Images were acquired using the laser scanning confocal electron microscopy A1R MP+ microscope (Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japan) (Biscaia et al., 2017).

2.8 Adhesion and cell spreading assay

Tissue culture plates (24 wells, Costar Corp., Cambridge, MA) were coated for 2 h with fibronectin and collagen Type I (10 µg/mL in PBS). Non-adhesive substrate was prepared by coating the wells with 1% BSA (Sigma) for 60 min at 37°C. Plates were washed with PBS and blocked with 1% BSA in PBS for 1 h. Cells exposed or not (the negative control) for 24 h with 15 and 150 µg/mL aqueous extract of *P. amalago* were suspended (5×10^5 cells in 0.5 mL medium) and allowed to attach to the substrate for 1 h at 37°C under 5% atmosphere CO₂. Following incubation, unattached cells were removed by washing with PBS. Attached cells were fixed in methanol for 20 min, stained with 0.8% crystal violet (Sigma) dissolved in 20% ethanol and washed five times in PBS. Cells were photographed with an inverted microscope (Nikon TE-300). The dye was eluted with 50% ethanol in 0.1 M sodium citrate, pH 4.2 and the optical density measured at 540 nm. The degree of spreading was determined based on the images, using the program Image J Fiji Software, taking as parameter the nucleus area x cytoplasmic area ratio (proportion of the cell body expansion) (Nowatzki et al., 2010).

2.9 Determination of hydroxyproline concentration

3T3 cells were plated on circular coverslips within 24 well-plates. Subsequently, 15, 50 and 150 µg/mL of the crude aqueous extract of *P. amalago* were treated for 96 h. The supernatant was removed and the cells were subjected to alkaline hydrolysis with NaOH (10M) at 80°C for 20 min, and then the hydrolysate was oxidized with chloramine T. Finally, Ehrlich's reagent was added, which complexed hydroxyproline in a colorimetric reaction, with the intensity of coloration being proportional to the amount of hydroxyproline tissue. Absorbance was measured at 550 nm (Soley et al., 2016).

2.10 Quantification and activity of MMP2 metalloproteinase

3T3 cells were plated on circular coverslips within 24-well-plates. Subsequently, 15, 50 and 150 µg/mL of the crude aqueous extract of *P. amalago* leaves were treated for 96 h. The supernatant was removed and used for the evaluation of MMP2 metalloproteinase quantification and activity.

2.11 Protein concentration

The cell culture supernatant was concentrated from 6 mL to 100 µL of volume in a SavantTM SPD1010 SpeedVac. To this volume, 400 µL of methanol was added,

followed by homogenization and centrifugation at 11,000 rpm for 15 s. Later, 100 µL of chloroform and 300 µL of ultra-pure water were added, each step with homogenization and centrifugation as described above. Three phases were formed: the upper phase, which was discarded and 300 µL of methanol was added; followed by homogenization; and centrifugation at 11,000 rpm for 2 min. The protein pellet was air-dried and re-suspended with RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) to be submitted to zymography (Bradford, 1976).

2.12 Zymography

The samples were subjected to dosage total protein by the Bradford method and added in a sample buffer (2% SDS, 30% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 60 mM Tris pH 6.8). The samples were loaded on 12% polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin. After electrophoresis, the gel was washed in a 10 mM Tris solution (pH 8.0) containing 2.5% Triton X-100 for SDS removal and protein renaturation. Later, the gel was incubated in a solution containing 5 mM CaCl₂, 150 mM NaCl and 1 mM ZnSO₄ for 48 h at 37°C. Afterwards, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and decolorized (40% methanol, 10% acetic acid). The bands resulting from gelatin degradation were analyzed by densitometry using the Image J software (Bradford, 1976).

2.13 Immunoblotting

3T3 cells were cultured in 100 mm² plates until reaching 80% confluence, and treated under the conditions described above. The cells were washed with ice-cold PBS and lysed with RIPA buffer, with protease inhibitor (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher), and 1 mM EDTA. The cell lysate was centrifuged at 10,000 g at 4°C, and the supernatant was subjected to the determination of total proteins by Bradford method (Bradford, 1976). Equal amounts of protein were added to sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 0.0625 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 5% β-mercaptoethanol), and heated at 100°C for 10 min. The samples were loaded to the electrophoresis gel and then transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Hybond ECL-GE Healthcare). After this, the membrane was blocked with 5% skim milk in tris-buffered saline (TBS; 20 mM tris, 150 mM NaCl, pH 7,6) with 0.1% tween 20 for 1 h at room temperature. The membrane was incubated

with anti-MMP-2 antibodies (Thermo Fischer Scientific Inc. 2C1-1D12; 1:500) in the block solution for 18 h at 4°C. Next, the membrane was incubated with the secondary anti-mouse IgG HRP antibody (Sigma) of concentration 1 mg/mL (1:5000). The washes between the steps were done with TBS containing 0.05% tween 20 and TBS. The revelation was performed by chemiluminescence with Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore) reagent using X-ray film. The intensity of the bands was analyzed with ImageJ software (Bradford, 1976).

2.14 Statistical analysis

Statistical analyses were performed by analysis of variance (ANOVA: single factor) of the data obtained. Tukey's test was also be used, allowing significant differences to be identified between groups. GraphPad software was used in these aspects.

3. Results

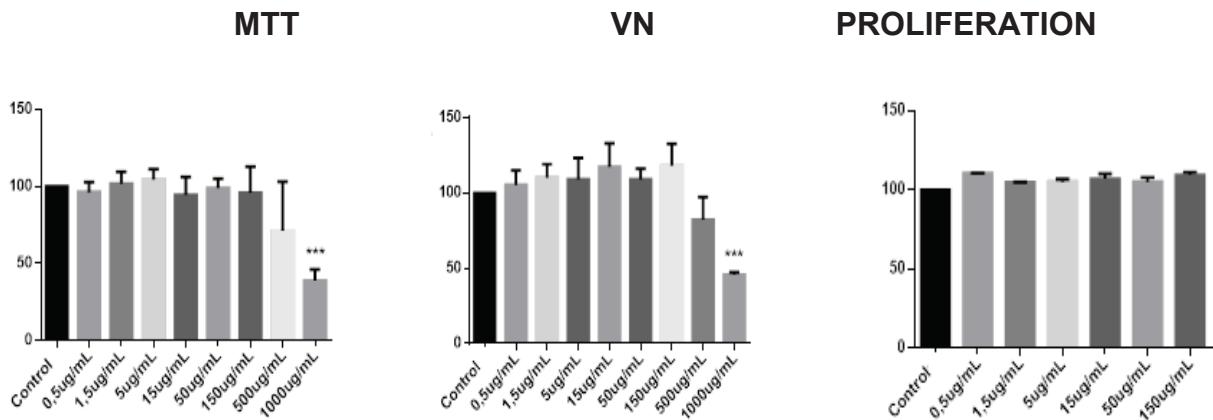
3.1 Aqueous extract up to a concentration of 150 µg/mL does not induce cytotoxic action, loss of viability and induces cell proliferation.

As shown in graph 1 for the cell cytotoxicity assay using the MTT method (A), and cell viability using the neutral red method (B), the results presented demonstrate that the aqueous extract neither induce cytotoxicity action nor loss of cell viability to a concentration of 150 µg/mL within 24 h of exposure. Using these methods, cytotoxicity and loss of viability were observed in the highest concentrations of 500 and 1000 µg/mL, being in this last concentration, performing significantly.

Compound induced cell proliferation can be seen in the graph on cell proliferation assay (C), at all concentrations tested, the largest being 150 µg/mL.

In the concentrations of 500 and 1000 µg/mL, the tests were not performed because the assess impairment of cell viability (MTT and VN) proved to be cytotoxic. Thus, the cell proliferation assay was performed only at concentrations that maintained cell viability.

Graph 1. Cytotoxicity, viability and proliferation assays



These tests were carried out in biological quadruplicates. Source: authors.

The 3T3 cells were exposed to the crude extract of *Piper amalago* in concentrations of 0.5, 1.5, 5, 15, 50, 150, 500 and 1000 µg/mL for a 24h treatment period. Letter A shows cell cytotoxicity assay, by the MTT method, letter B the cell viability assay, by the Neutral Red method and letter C the cell proliferation assay, using the Violet Crystal method.

3.2 Aqueous extract induces morphological and ultrastructural changes

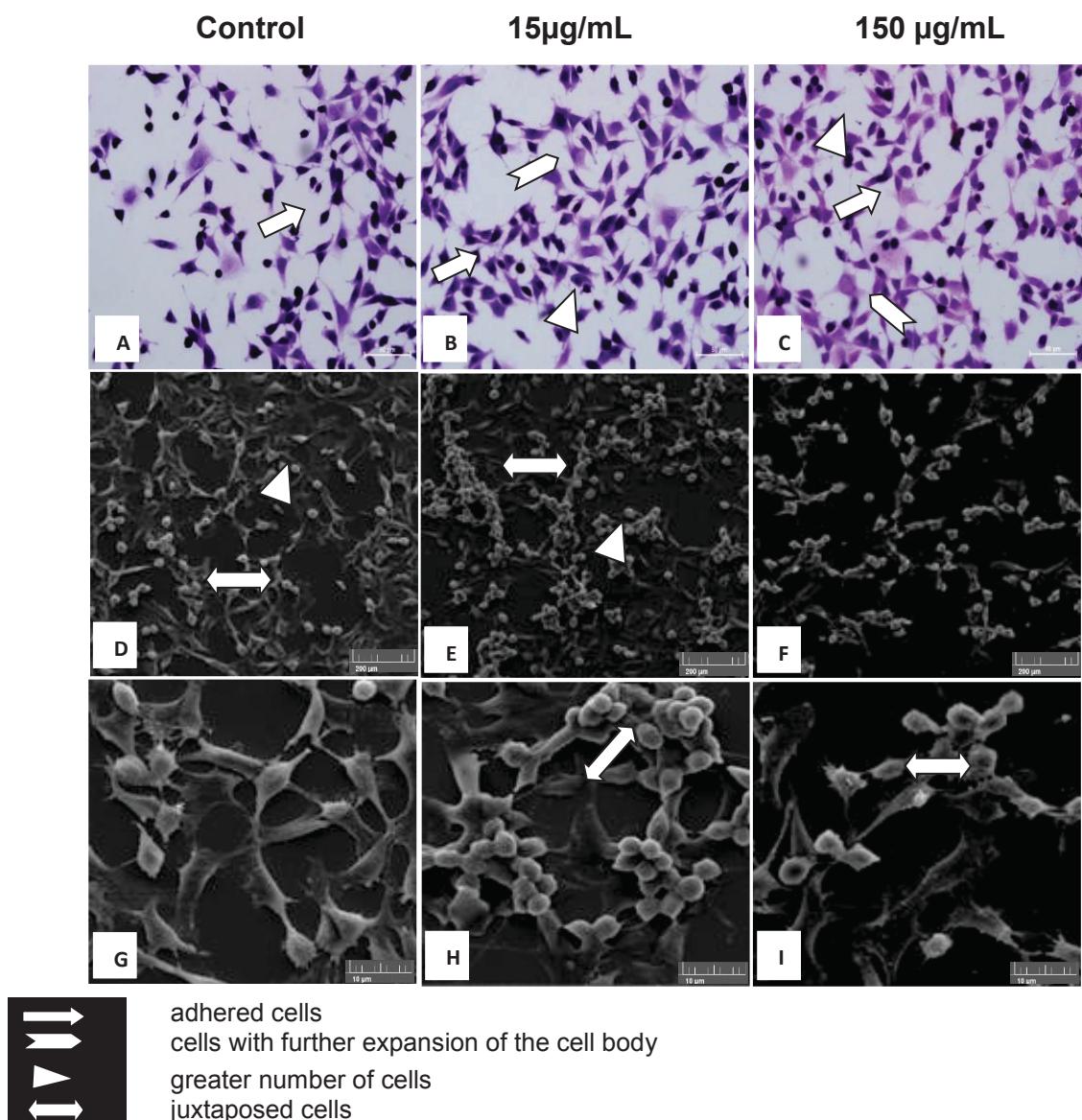
Since the cytotoxicity, cell viability and proliferation assays showed similar results in the lowest exposure concentrations 0.5 to 150 µg/mL, and that only in concentrations above 150 µg/mL, the previous assays demonstrated evident cytotoxicity with impaired cell viability. In order for the other tests to be analyzed, we only standardize the concentrations of 15 and 150 µg/mL, to be imposed for all other subsequent tests.

The morphological analysis of 3T3 control cells (CTR), cells treated with 15 µg/mL and with 150 µg/mL of crude *P. amalago* extract are shown in Figure 1 (A to I) for a period of 24 h of exposure.

It is noted that, in figure 1A, controls cells observed under an optical microscope comply with the standard established for that line. They are cells with different morphologies, with characteristic cell body expansions and membrane projections. Rounded and central nucleus show contact inhibition. It can also be noted that these cells are adhered to the substrate. There is a predominance of elongated cells with clear membrane extensions, central and spherical nucleus. Treated cells 15 µg/mL

(1B) and 150 µg/mL (1C) show a greater number of cells in cell culture. These treated cells are larger with greater expansion and degree of cell spread. Images (D to I) represent ultrastructural analysis in SEM: control cells (D and G), exposed to 15 µg/mL (E and H) and 150 µg/mL (F and I), with the same exposure time. SEM results showed a greater number of cells after treatment; these are greater due to the greater expansion of the cell body. Adhered cells, were more spread over the substrate. There is a predominance of rounded cells forming cellular structures in strands, and juxtaposed cells. The pattern of cell culture was positively modulated in both morphological analyses obtained through LM and SEM.

Figure 1. Morphological examination.



These tests were performed in quadruplicates, in two different tests. Source: authors.

The light microscope shows in (A) 3T3 control cells (maintenance of cell culture in the absence of crude *Piper amalago* extract), exposed to 15 µg/mL (B) and 150 µg/mL (C), for a period of 24 hours of exposure. 400x magnification images. These tests were performed in quadruplicates, in two different tests. The scanning electron microscopy shows the control cells (D and G), exposed to 15 µg/mL (E and H) and 150 µg/mL (F and I) for a period of 24 hours of exposure. The images D, E and F are at 300X magnification and G, H and I images at 6000X magnification.

3.3 Aqueous extract induces greater cell body expansion and intercellular adhesion

The detection of specific cell surface carbohydrates was performed using Lectin WGA conjugated to FITC. To detect the actin microfilaments, the phalloidin probe conjugated with Alexa Fluor 594 was used.

Image 2A shows 3T3 control cells not imposed on treatment with crude *P. amalago* extract. Image B shows cells exposed at a concentration of 15 µg/mL, and image C shows cells imposed at a concentration of 150 µg/mL. All of these images show glycocalyx through the immunodetection of carbohydrate (N-acetyl-glucosamine) by lectin WGA.

The (2D) image of control cells, (3E) of cells exposed to 15 µg/mL and (2F) of cells exposed to 150 µg/mL of the crude extract of *P. amalago* show the actin microfilaments of the cytoskeleton evidenced by phalloidin.

It can be observed in the immunofluorescence images that the control cells have a more elongated morphology when compared to the treated cells (2B and 2C). These cells presented with less expansion of the cell body volume (2A). In the detection for surface carbohydrates, less intensity of staining is observed for control cells. In these cells, when the nucleus/cell cytoplasm correlation is observed, they present the cell body (cytoplasm) with less expansion. Cells with different morphologies adhered to the substrate and smaller cells are observed.

Interestingly, the exposure of the cells to the aqueous extract of *P. amalago* (2B, 2C, 3E and 2F) 15 and 150 µg/mL respectively show, when compared with the control cells (2A), greater expansion of the cell body. In particular, cells after exposure to 15 µg/mL are typically rounded, juxtaposed, maintaining intercellular adhesion forming aggregates, by cellular juxtaposition. The marking for cell surface carbohydrates shows intense dispersed marking over the entire length of the cell surface. It can be

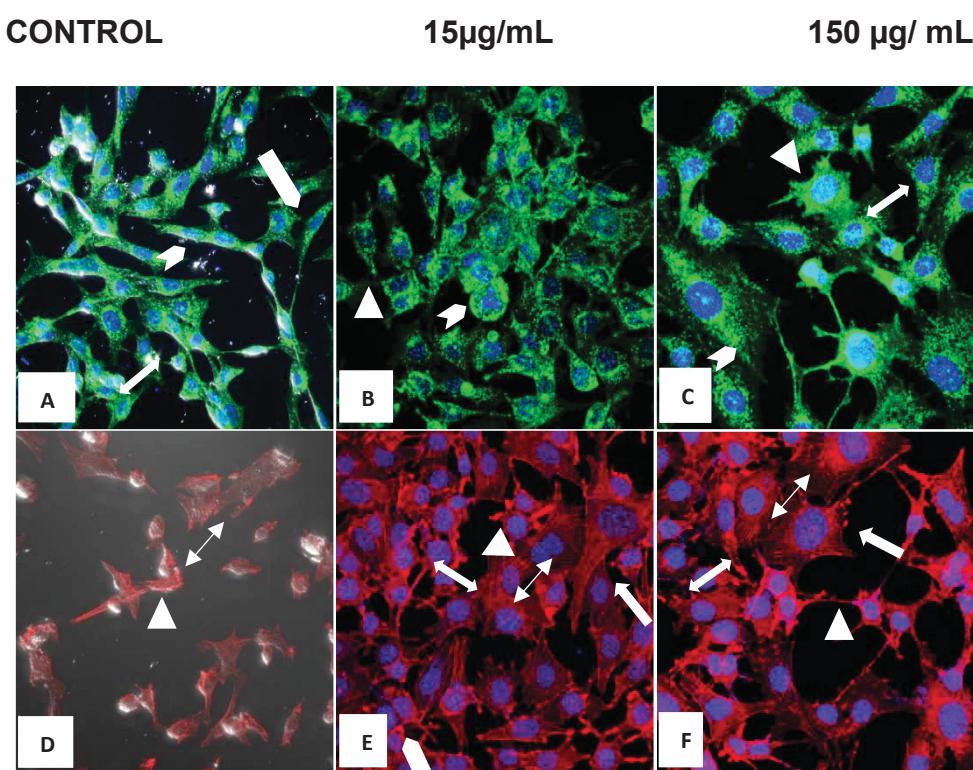
observed that treated cells showed morphological changes and the largest being juxtaposed in particular for the treatment with 15 $\mu\text{g/mL}$.

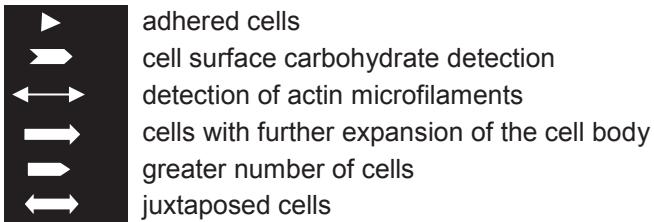
The detection images of the actin microfilaments of the cytoskeleton showed that the control cells (2D) organize the microfilaments keeping the cells adhered to the substrate by organizing them. Smaller cells with little organization of these constituents are observed, forming few stress fibers. These cells have different morphologies.

The images (2E and 2F), 15 and 150 $\mu\text{g/mL}$ respectively show a clear organization of the actin microfilaments, in stress fibers occupying the entire cell cytoplasm. It is observed with this detection that the nucleus/cytoplasm ratio becomes evident that the treatment increases when compared to the cells that control the expansion of the cell body.

Similar to what was observed with the other techniques (SEM and detection of surface carbohydrates), the treatment with 15 $\mu\text{g/mL}$ was the one that induced the greatest intercellular adhesion, being the cells more juxtaposed. In both treatments, these cells remained with a greater degree of adhesion to the substrate, spreading and an increase in the cell body.

Figure 2. Immunomarking analysis using confocal microscopy.





The experiments were carried out in triplicate in three independent experiments. The images are at 600X magnification. Source: authors.

The images A and D represent control cells maintained in culture only in the middle presence. Images B and E are of cells exposed to 15 µg/mL of crude *P. amalago* extract and images C and F, cells exposed to 150 µg/mL of extract. Exposure time of 24 hours. The images A, B and C show N-acetyl-glucosamine carbohydrates on the cell surface of the control and treated cells. Images D, E and F show detection of actin microfilaments.

3.4 Aqueous extract induces greater cell adhesion

Control 3T3 cells, treated with 15 and 150 µg/mL after 24 h of exposure, were imposed on the cell adhesion assay. Different MEC fibronectin (FN) was purified from fresh human plasma (obtained at the General Hospital, Federal University of Parana, Brazil) by gelatin–Sepharose affinity chromatography (Sigma, St Louis, MO, USA) as described by Engvall and Ruoslahti (1977) and Collagen I (Col. I) commercially purchased from Sigma, as well as adhesion to the polymer (substrate of the cell culture plate). For negative control of cell adhesion, bovine albumin (BSA 1%) was used.

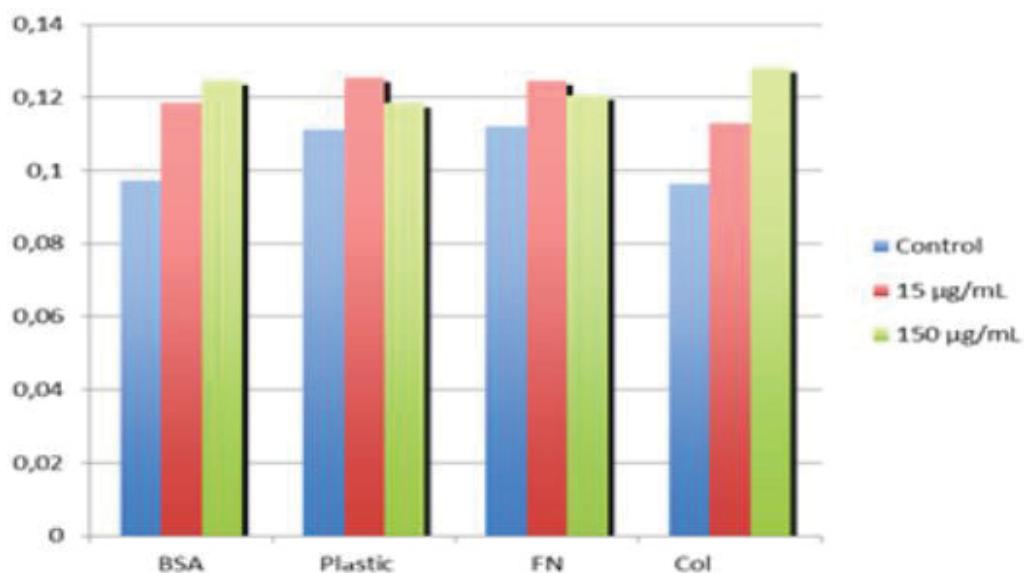
Graph 2 shows that in all analyzed substrates there was an increase in cell adhesion after treatment. For the treatment with the concentration of 15 µg/mL, can be observed that there was a percentage increase of 113% adhesion to plastic and 111% adhesion to fibronectin when compared to the control. With this concentration on, both the substrates had a stimulus higher than that found for the concentration of 150 µg/mL (adhesion to plastic with an increase in adhesion of 106% and fibronectin of 107.5% in relation to the control).

It was also observed that for the concentration of 150 µg/mL, the collagen I substrate, was the one that induced 133% greater adherence compared to the control. It is also noticed that the control cells adhere similarly to BSA and to Col. I. This result shows that the cells have less affinity for the referred substrates. Adhesion similarity of control cells was also observed for the plastic substrate and for fibronectin.

Light microscopy images of control cells (3A, 3D and 3G), treated with 15 µg/mL (3B, 3E and 3H) and 150 µg/mL (3C, 3F and 3I), after the cells were imposed on the cell adhesion assay (Figure 3), show that in all analyzed substrates fibronectin, (3D, 3E and 3F) collagen I (3G, 3H and 3I) and BSA 1% negative control (3A, 3B and 3 C), after treatment the cells increased the expansion of the cell body, the cells are bigger, more adhered and spread by on the substrate.

Among all the analyzed substrates, it is observed that fibronectin is the substrate of greatest affinity for this cell line. Especially the FN substrate, both for control cells (3D), for cells treated with 15 µg/mL (3E) or for cells treated with 150 µg/mL (3F), this matrix protein induced not only adhesion of cells to this substrate as well as a higher degree of spreading that can be observed for both treatment concentrations.

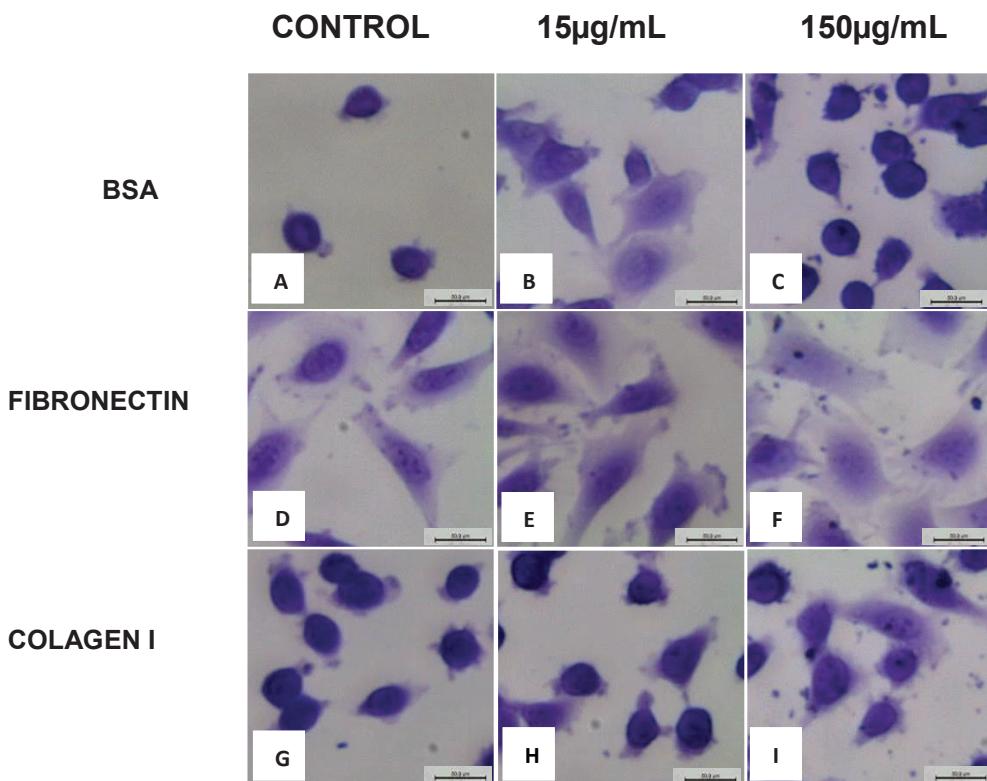
Graph 2. Cell adhesion assay of 3T3 cells on different MEC proteins.



These tests were performed in quadruplicates in two independent tests. Source: authors.

The cell adhesion of control cells and treated with crude *P. amalago* extract at concentrations of 15 and 150 µg/mL for a 24h treatment period, in 24-well plates. A concentration of 10 µg/mL was used for the fibronectin and collagen I substrates. As a negative control, 1% BSA was used.

Figure 3. Light microscopy analysis of cells imposed to the cell adhesion assay on different MEC proteins.



All images are in 400X magnification. Crystal Violet dye was used. These tests were performed in triplicates in two independent tests. Source: authors.

The image A represents control cells adhered to the BSA (negative control); B cells treated with 15 μ g / ml adhered to BSA and C, cells treated with 150 μ g/mL adhered to BSA. Image D represents control cells adhered to the fibronectin (FN) substrate, E cells treated with 15 μ g/mL adhered to FN and F, cells treated with 150 μ g/mL adhered to FN. Image G shows control cells adhered to the substrate Collagen I (Col. I), H, the cells treated with 15 μ g/mL adhered to Col. I and I, cells treated with 150 μ g/mL adhered to Col. I.

3.5 Aqueous extract induced an increase in hydroxyproline concentration

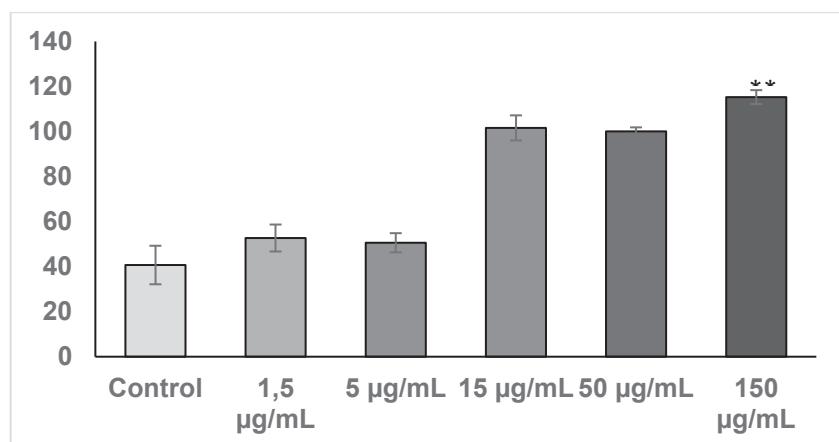
The hydroxyproline concentration is used as an indirect indicator to determine the collagen content (Reddy & Enwemeka, 1996). For the quantification of hydroxyproline, a standard curve comprising concentrations between 1.5 to 150 μ g/mL was constructed. 99% N-acetyl hydroxyproline (Sigma 01192) was used as standard.

The results obtained correspond to the average of samples from analyzes performed in quadruplicate in two independent tests (Reddy & Enwemeka, 1996).

As shown in Graph 3, the crude extract of *P. amalago* promotes a statistically significant increase in the hydroxyproline content in the concentrations of 15, 50 and 150 µg/mL, when compared to the control. A smaller increase was observed at concentrations of 1.5 and 5.0 µg/mL.

Biochemical results, obtained for the determination of hydroxyproline concentration after 48 and 72 h of exposure, were not significant. However, after exposure for 96 h, there was a significant increase in the hydroxyproline amino acid, showing greater collagen biosynthesis by the cells after treatment.

Graph 3. Evaluation of hydroxyproline concentration.



These tests were performed in quadruplicate in two independent tests. Source: authors.

The evaluation of hydroxyproline concentration in control cells and treated with crude extract of *P. amalago* in concentrations of 1.5; 5.0; 15 and 150 µg/mL for a 96-hour treatment period. These tests were performed in quadruplicate in two independent tests.

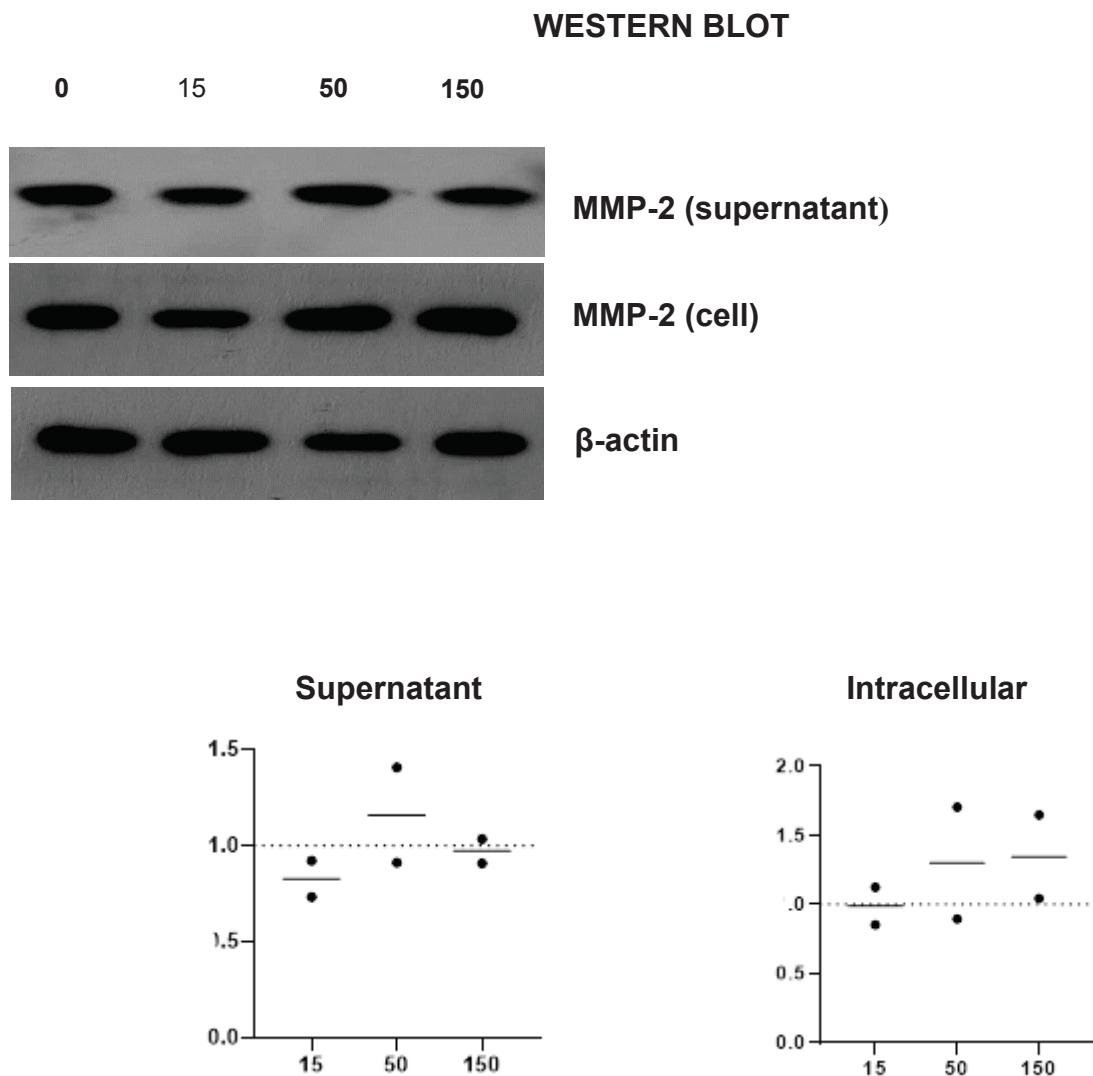
3.6 Quantification and metalloproteinase activity (MMP2)

Western blotting showed no modulation of MMP2 after 96 h of exposure to the aqueous extract of *P. amalago* at the concentrations employed.

As shown in graph 4, when the concentration of 15 µg/mL of *P. amalago* extract is used, it has a tendency to reduce the activity of metalloprotease (MMP-2) in the supernatant secreted by the cells. The concentration of 50 µg/mL tends to increase in

both the supernatant and intracellular. The concentration of 50 µg/mL suggests only intracellular growth.

Graph 4. Quantification and metalloproteinase activity (MMP2).



These tests were performed in quadruplicate in two independent tests. Source: authors.

The evaluation of the quantification and activity of MMP2 in control cells and treated with crude extract of *P. amalago* at concentrations of 15, 50 and 150 µg/mL for a treatment period of 96 hours.

4. Discussion

To the best of our knowledge, there is no *in vitro* study in the literature with *P. amalago*, using the *in vitro* model of mouse fibroblasts (3T3).

In wound healing, the main effects of the chemical compounds present in plant extracts are antimicrobial and antioxidant activities, as well as active components that promote mitotic activity. These active compounds contribute to cell proliferation, angiogenesis and increased collagen production and DNA synthesis (Budovsky et al., 2015).

Bioactive compounds, such as alkaloids, flavonoids, essential oils and terpenoids, have several activities, such as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and healing (Budovsky et al., 2015; Thakur et al., 2011; Tsala et al., 2013; Nascimento Júnior et al., 2020). The antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and mitogenic activities of phytochemicals are essential in healing, and can positively favor one or more phases of the tissue restructuring process (Ghosh & Gaba, 2013). As they increase the rate of wound contraction, the number of fibroblasts and the disposition of collagen fibers also increase as well as reduce the number of inflammatory cells (Nayak et al., 2013; Dogoury et al., 2015). Additionally, natural chemical compounds also influence the level of cytokines and levels of hydroxyproline and hexosamine (Roy et al., 2012), as well as angiogenesis (Parente et al., 2012).

Several chemical studies have been performed with *P. amalago* leaves and indicated the presence of alkaloids, condensed tannins, flavonoids and triterpenes. Piperidine, pyrrolidine amides, isobutylamides, chalcones, flavonols and phenolic compounds were also found in *P. amalago* (Domínguez et al., 1985; Carrara et al., 2013; Lopes et al., 2012; Novaes et al., 2014; Santos et al., 2020). In addition, Rovani et al. (2013) analyzed the crude ethanolic extract by high performance liquid chromatography (HPLC) and found the presence of vitexin and lupeol; while Carrara et al. (2012) evidenced pyrrolidine alkaloid in the leaves of *P. amalago*, using HPLC analysis of supercritical carbon dioxide and compressed propane extracts.

With regards to biological activities, vitexin and its derivatives have already been reported as potent antioxidants with anticarcinogenic and antimutagenic potential (Deladino et al., 2017). Lupeol is a triterpene found in several medicinal species and has antidiabetic, anti-inflammatory and antioxidant activities (Geetha & Varalakshmi, 2001; Prasad et al., 2008). The treatment of wounds with lupeol-based cream effectively improved the healing process in hyperglycemic rats induced with streptozotocin with modulating effects on inflammation, oxidative stress and angiogenesis (Harish et al., 2008). In a study carried out with rat melanoma cells, lupeol inhibited cell proliferation by inducing cell differentiation (Hata et al., 2010). A

pyrrolidine alkaloid showed antileishmanial activity with strong activity on promastigotes and selective action against intracellular amastigotes (Carrara et al., 2012). Amides present in the ethanol extract of *P. amalago* showed anti-hyperalgesic, antinociceptive and anti-arthritis activities in models of acute and chronic pain in rodents (Arrigo et al., 2016).

In general, tannins are used to treat wounds, burns and inflammations (Funari & Ferro, 2005). They have the ability to promote the proliferation of epithelial cells and their migration from the periphery of the lesions, a phenomenon regulated by genes, growth factors, integrins, and matrix metalloproteinase-type enzymes (MMPs) (Hernandes et al., 2010), in addition to having high antioxidant activity (Batista et al., 2010).

In addition to stimulating healing, flavonoids have microbial and immune-modulating, anti-inflammatory, analgesic activities (Vieira et al., 2008; Coutinho et al., 2009; Gazola et al., 2014). Flavonoids also have antioxidant activity (Rovani et al., 2013; Torres et al., 2018) and antimicrobial activity (Santos et al., 2019). In antioxidant activity, flavonoids regulate the production of superoxide anions and the blood flow of the injured region, promoting angiogenesis, thus reducing free radicals in the wound (Mittal et al., 2013).

Additionally, the majority of analyses of essential oil of *P. amalago* leaves showed the prevalence of sesquiterpene hydrocarbons such as bicyclogermacrene, β -phellandrene and germacrene D, with substantial amounts of monoterpene hydrocarbons, such as α -pinene, and some sesquiterpenoids such as spathulenol (Salehi et al., 2019). The essential oil played important biological roles, such as antimicrobial (Moqrish et al., 2005; Santos et al., 2016) anti-inflammatory (Jeong et al., 2014; Bahi et al., 2014; Passos et al., 2014; Carneiro et al., 2017) antioxidant (Nogueira Neto et al., 2013; Santos et al., 2016; Oliveira et al., 2016), and antihyperalgesic (Carneiro et al., 2017).

Fractions obtained from stems and roots of *Piper hayneanum* C.DC were tested for healing activity in rats, with dorsal lesions infected with *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, and showed better wound healing compared to those treated with gentamicin (*S. aureus*) and miconazole (*C. albicans*) (Bastos et al., 2011).

Bacterial contamination can increase the inflammatory phase, causing prolonged production of pro-inflammatory cytokines; if this condition persists and bacterial elimination is not achieved, the wound becomes chronic and does not heal.

Therefore, the elimination of bacterial contamination in the wound microenvironment is essential for optimal wound repair (Edwards & Harding, 2004; Guo & DiPietro, 2010).

The aqueous extract of *P. amalago* in concentrations ranging from 0.5 to 150 µg/mL did not cause damage to 3T3 cells and induced cell proliferation (Graphs 1 A and B).

In the case of mitosis and fibroblast migration, it is necessary to have a solid substrate that serves as a support base for the cells. The construction of this substrate is done by the lysis of inert constituents of the extracellular matrix followed by its replacement with new characteristics. Any lack of control in the lithic process, instead of benefits, can result in damage to the evolution towards repair (Balbino et al., 2005).

Since fibroblasts are the main targets in the design of therapeutic drugs, bioactive compounds that can stimulate the proliferation of fibroblasts may be able to stimulate the healing process (Singh et al., 2014), as observed in the present study. Also, the results indicated that none of the extracts exhibited cytotoxic activity in 3T3 fibroblasts. In that sense, ethnopharmacological studies have indicated that extracts obtained from species of *Piper* presented the ability to promote the proliferation of fibroblasts during the healing process (Panah et al., 2014; Varga et al., 2015). Khosravitarabar et al. (2017) have suggested that the effects of flavonoids on fibroblast proliferation depend on their structure and concentration, and confirm that flavonoids stimulate fibroblast proliferation, especially at lower concentrations (Khosravitarabar et al., 2017).

The ethanolic extract and the dichloromethane and hexane fractions obtained from the leaves of *Piper arboreum* Aubl. showed high toxicity at concentrations of 100 and 500 µg/mL, with fibroblast mortality between 79% and 100% (Figueiredo et al., 2014).

The hydroethanolic extract obtained from the leaves of the species *Piper aduncum* L. increased the proliferation and migration of human fibroblasts (HDFA), and in addition, increased the expression of growth factors (FGF, EGF and PDGF), important in the healing process. The concentrations used were 103.5 µg/mL after 24 h of treatment and 39.54 µg/mL after 48 h of treatment (Paco et al., 2016).

3T3 fibroblasts treated with 125 µg/mL of the methanolic fraction obtained from the leaves of *Jatropha gossypiifolia* L. exhibited an increase in migration, at 12 h and 24 h, when compared to cells treated with culture media (Silva et al., 2018).

Study carried out with a fraction composed of long-chain hydrocarbons (LCHCs) obtained from the crude methanolic extract of *P. cubeba* L. fruit showed cytotoxic activity against breast cancer cells (IC_{50} of $2.69 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$) and low toxicity against fibroblasts (IC_{50} of $2.69 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$) (Graidist et al., 2015).

The morphological analysis of the cells suggests that the treatment with the aqueous extract in the concentrations of 15 and 150 $\mu\text{g/mL}$ after 24 h of exposure, did not cause cytotoxic effects on the cells when compared to the control cells (Figures 1 A and B).

Fibroblasts have fusiform morphology with numerous cytoplasmic extensions, with a central and rounded nucleus, evident nucleolus and fine chromatin. They are the cells responsible for the synthesis and degradation of connective tissue (fibrous and non-fibrous) and synthesis of numerous mediators (Kanitakis, 2002; Tobin, 2006; Gartner & Hiatt, 2017).

The fibroblast motion also shows stress fibers and lamellipodia, and changes a cell body from extended to fan-shaped or elongated (Vallenius, 2013). Filopodia and lamellipodia form immature adhesions within the substrate of the extracellular matrix, as they contain integrins and signaling molecules (Czuchra et al., 2005; Pankov et al., 2005).

These cells *in vitro* are linked by communicating and adhesion junctions, an indication that these cells are metabolically associated (Arenas & Zurbarán, 2002). In the substrate adhesion tests, Graph 4 shows that for both control cells and cells treated with the crude extract of *P. amalago*, there was an increase in adhesion to fibronectin, collagen I and BSA proteins.

Through the cell adhesion assay by optical microscopy analysis, it is noted that the FN substrate was the one with the highest affinity for both control and treated cells (Figures 2 D, E and F).

Since the $\alpha 5\beta 1$ integrin membrane receptor modulates adhesion to this substrate, possibly the treatment may be making an expressive modulation of this substrate. Integrins are responsible for many of the interactions between cells and the extracellular matrix (ECM), in addition to serving as a union between ECM and the cytoskeleton (Arenas & Zurbarán, 2002; Savino et al., 2003). One ECM component is fibronectin (FN), an important molecule in migration and cell adhesion processes (Anjos & Alvares-Silva, 2000; Kunz-Schughart et al., 2001).

Fibronectin and hyaluronic acid are the predominant components of the matrix during the early stages of wound repair (Suzuki et al., 2005).

Activated inflammatory cells are producers of reactive oxygen and nitrogen species with known lytic potential on cell membranes. Some of the inflammatory mediators, such as TNFs and TGF- β , can induce apoptosis of cells by death receptors (Moore et al., 2001).

In the present study, the results of scanning electron microscopy, optical microscopy and immunostaining show cells with cellular integrity, greater expansion of the cell body adhered to the substrate, juxtaposed, and high number of cells. These cells increased the adhesive capacity of extracellular matrix molecules, especially fibronectin, showing that the crude *P. amalago* extract does not induce loss of viability or changes in cell integrity or in cell adhesion dynamics at the evaluated times and concentrations.

The results of the carbohydrate detection assay suggest the presence of surface glycosaminoglycan scattered throughout the cell body. When compared to control cells, the treated cells show greater distribution of these glycoconjugates containing residues of N-acetyl-glucosamine (detected using WGA) (Figures 3 A, B and C). N-acetyl glucosamine regulates cellular responses to hormones, such as insulin; initiates a protective stress response; modulates growth and cell division capacity; and regulates gene transcription (Liu et al., 2004).

An important tool for the investigation of the cytoskeleton dynamics is the fluorescent marking of actin, using fluorescents derived from phallotoxins, as they allow the identification of whole cell culture with minimal cell disruption (Devod et al., 2001).

In the results obtained, the treated fibroblasts show a clear organization of the actin microfilaments compared to control cells. Stress fibers occupy the entire cell cytoplasm with a greater degree of adhesion to the substrate and spreading of the cell body. The treatment with 15 $\mu\text{g/mL}$ was the one that induced the greatest intercellular adhesion (Figures 3 D, E and F).

The strength of a scar is given by the amount of collagen deposited and the way the fibers are organized. In the fiber ripening process, lysines, hydroxylysines and glycosylated lysines, constituents of the tropocollagen molecule, are oxidized (Frazier et al., 1996). In healing, when the lesion space is filled with granulation tissue, the margins move towards each other, due to the differentiation of some fibroblasts from

the wound margins to myofibroblasts that have contractile capacity (Peacock Jr., 1984). In that case, the immunostaining results for the constituents of the cytoskeleton, specifically the actin microfilaments marked with the phalloidin probe, showed a clear increase in the quantity and organization of these constituents after exposure to the crude extract of *P. amalago*.

Important steps in the new phase of tissue formation are the migration and proliferation of keratinocytes and fibroblasts (Gurtner et al., 2008). The cells move, rearranging their actin framework. In order for cells to migrate, the long chain of actin must be deranged, thus being able to change shape and then migrate to other sites (Natérica, 2005). A change in shape of the actin cytoskeleton is a prerequisite for cell migration (Friedl & Wolf, 2010).

The hydroxyproline quantification method shows that the cells treated with the aqueous extract of *P. amalago* produced a greater amount of this amino acid when compared to the control cells, with the concentration of 150 µg/mL being the most statistically significant ($p < 0.05$) (Graph 3).

Collagen is the most abundant protein in the body, comprising 30% of the mass of all proteins. It is an important structural protein of connective tissues (Sandhu et al., 2012). Among the types of collagen, collagen I is the most abundant, being found mainly in the skin. This type of collagen has about 20% proline (Pro) and 4- or 3-hydroxyproline (Krane, 2008; Gordon & Hahn, 2010; Mienaltowski & Birk, 2014).

The collagen protein is directly involved in the reconstitution of the extracellular matrix and in the healing of wounds. Its deposition and collagen remodeling contribute to increase the tensile strength of the injured tissue (Vancheri et al., 2005; Sandhu et al., 2012).

Human dermal fibroblasts treated with extracts of *Piper cambodianum* P. Fourn. showed an increase in the expression of extracellular matrix genes, such as collagen and elastin; decreased expression of the metalloproteinase-3 gene; a dose-dependent increase in RNA expression levels of collagen, elastin and hyaluronic acid synthase-2 (hyaluronan synthase-2); and decreased levels of expression of the metalloproteinase-1 gene. The extract also showed positive effects on wound healing in mice (Lee et al., 2016).

As shown by the results obtained in the evaluation of MMP-2 secretion by treated 3T3 fibroblasts and the gelatinolytic activity of this metalloprotease, there was no difference between the treated cells when compared to the control cells (Graph 4).

After analyzing the antitumor effects of the aqueous extracts of *Aloe vera* (L.) Burm.f., *Annona muricata* L. and black tea in three serial dilutions on the gelatinolytic activity of MMPs 2 and 9, the results suggest that the antitumor effects can be partially explained by their ability to inhibit the proteolytic activity of MMPs (Ribeiro et al., 2010).

The results obtained with the cell adhesion and spreading tests on extracellular matrix molecules showed an increase in both the degree of adhesion and the spread of these 3T3 cells after exposure to the crude extract of *P. amalago*.

Fibroblasts are cells that undergo phenotypic changes; the cytoplasm becomes bulky and has an abundant rough endoplasmic reticulum. Thus, fibroblasts secrete large amounts of collagen (Balbino et al., 2005). In the present study, the results of biochemical tests to assess hydroxyproline biosynthesis reveals an increase in the production of this molecule after treatment with *P. amalago* extract. Subtle modulation of MMPs can also be assessed.

5. Conclusion

According to the results found in the present study, the aqueous extract obtained from the leaves of *P. amalago* on the 3T3 line did not prove to be cytotoxic until the concentration reached 150 µg/mL after 24 h of exposure. The cells after treatment showed greater expansion of the cell body, more juxtaposed; there is a greater number of cells with greater adhesion and spreading. The extract induced increased cell adhesion and spreading especially in fibronectin and type I collagen. The extract also induced a significant increase in the concentration of hydroxyproline (collagen production) and subtle modulation of metalloproteinase (MMP2) activity. Thus, the results revealed positive modulation in the degree of cell spreading, number of cells, adhesion, intercellular cohesion, and collagen production with promising results of the action of this compound in the healing model, in the times and concentrations studied in the 3T3 fibroblast lineage.

These results endorse the ethnopharmacological use of *P. amalago* as a healing agent for wounds and burns by Central American and Brazilian communities, and may be important in the development of new healing phytomedicines.

References

- Alves, E.O., Mota, J.H., Soares, T.S., Vieira, M.C. & Silva, C.B. (2008). Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. *Ciência e Agrotecnologia*, 32 (2), 651-658.
- Anjos, A.R. & Alvares-Silva, M. (2000). Matriz Extracelular e Leucemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 22 (3), 404-412.
- Araújo, R.V.S., Silva, F.O., Melo-Júnior, M.R & Porto, A.L.F. (2011). Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. *Revista de Ciencias Médicas e Biológicas*, 10 (1), 82-89.
- Arenas, L.A.S. & Zurbarán, C.B. (2002). La matriz extracelular: el ecosistema de la célula. *Salud Uninorte*, 16, 9-18. <https://pdfs.semanticscholar.org/741e/7f66234e264ceca49d31df6a53c18e53fc7.pdf?ga=2.148705079.1606144272.1597841991-2138360975.1597841991>
- Arrigo, J.S., Balen, E., Lanza Junior, U., Mota, J.S., Iwamoto, R.D., Barison, A., Sugizaki, M.M. & Kassuya, C.A.L. (2016). Antinociceptive, anti-hyperalgesic and anti-arthritis activity of amides and extract obtained from *Piper amalago* in rodents, *Journal of Ethnopharmacology*, 179(17), 101-109.
- Bahi, A., AL Mansouri, S., AL Memari, E., AL Ameri, M., Nurulain, S.M. & Ojha, S. (2014). β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiology & Behavior*, 135, 119-24.
- Balbino, C.A., Pereira, L.M. & Curi, R. (2005). Mechanisms involved in wound healing: a revision. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(1), 614-20.
- Bastos, M.L.A, Houly, R.L.S., Conserva, L.M., Andrade, V.S., Rocha, E.M.M. & Lemos, RPL. (2011). Antimicrobial and wound healing activities of *Piper hayneanum*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3 (4), 213-222.
- Batista, J.S., Silva, A.E., Rodrigues, C.M.F, Costa, K.M.F.M., Oliveira, A.F., Paiva, E.S., Nunes, F.V.A. & Olinda, R.G. (2010). Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 77 (3), 441-447.
- Biscaia, S.M.P., Carbonero, E.R., Bellan, D.L., Borges, B.S., Costa, C.R., Rossi, G.R., Gonçalves, J.P., Melo, C.M., Lívero, F.A.R., Ruthes, A.C., Zott, R., Oliveira, C.C., Acco, A., Nader, H.B., Chammas, R., Iacomini, M., Franco, C.R.C. & Trindade, E.S. (2017). Safe therapeutics of murine melanoma model using a novel antineoplastic, the partially methylated mannogalactan from *Pleurotus eryngii*. *Carbohydrate Polymers*, 178, 95-104.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

- Bratti, C., Vieira, M.C., Zárate, N.A.H., Oliveira, A.P.A., Marafiga, B.G. & Fernandes, S.S.L. (2013). Levantamento de plantas medicinais nativas da Fazenda Azulão em Dourados-MS. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 15 (4), 675-683.
- Budovsky, A., Yarmolinsky, L. & Ben-Shabat, S. (2015). Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 23 (2), 171–183.
- Campos, A.C.L., Borges-Banco, A. & Groth, A.K. (2007). Cicatrização de feridas. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 20, 51-8.
- Carneiro, N.S., Alves, C.C.F., Alves, J.M., Egea, M.B., Martins, C.H.G., Silva, T.S., Bretanha, L.C., Balleste, M.P., Micke, G.A., Silveira, E.V. & Miranda, M.L.D. (2017). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89 (3), 1907–1915.
- Carrara, V.S., Souza, A., Dias Filho, B.P. & Nakanura, C.V. (2010). Chemical composition and antifungal activity of the essential oil from *Piper amalago*. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29 (8), 1459-1462.
- Carrara, V.S., Serra, L.Z., Cardozo-Filho, L., Cunha-Júnior, E.F., Torres-Santos, E.C. & Cortez, D.A.G. (2012). HPLC analysis of supercritical carbon dioxide and compressed propane extracts from *Piper amalago* L. with antileishmanial activity. *Molecules*, 17, 15-33.
- Carrara, V.S., Cunha-Júnior, E.F., Torres-Santos, E.C., Corrêa, A.G. & Monteiro, J.L., Demarchi, I.G., Lonardoni, M.V.C., Cortez, D.A.G. (2013). Antileishmanial activity of amides from *Piper amalago* and synthetic analogs. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23 (3), 447-454.
- Carrara, V.S., Vieira, S.C.H., De Paula, R.G. & Rodrigues, V. (2013). *In vitro* schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of piper species and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (piperaceae). *Journal of Helminthology*, 88 (3), 1-6.
- Coutinho, M.A.S., Muzitano, M.F. & Costa, S.S. (2009). Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual Química*, 1 (3), 241-256.
- Cunha, M., Paravic, F. & Machado, C. (2015). Alterações histológicas dos tipos de colágeno após diferentes modalidades de tratamento para remodelamento dérmico: uma revisão bibliográfica. *Surgical and Cosmetic Dermatology*, 7 (4), 85-292.
- Czuchra, A., Wu, X., Meyer, H., Van Hengel, J., Schroeder, T., Geffers, R., Rottner, K. & Brakebusch, C. (2005). Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Journal of Cellular and Molecular Biology*, 16 (10), 4473-84.
- Deladino, L., Alvarez, I., De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Molina-García, A.D. & Schneider Teixeira, A. (2017). Betalains and phenolic compounds of leaves and stems

of *Alternanthera brasiliensis* and *Alternanthera tenella*. *Food Research International*, 97, 240–249.

De Mais, E.C.D.J., Campos, A.C.L., De Mais, F.D.J., Ratti, M.A.S., Ike, I.S. & De Mais, R.D.J. (2016). The influence of growth factors on skin wound healing in rats. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngol*, 2 (5), 512-521.

Devod, V.N., Cox, G.C. & Roufogalis, B.D. (2001). Visualization of mitochondria in living neurons with single and two photon-fluorescence laser microscopy. *Micron*, 32 (7), 653-60.

Dogoury, H.G., Farahpour, M.R. & Amniattalab, A. (2015). Comparision effect of chamomile (*Chamomilla recutita*) hydroethanolic extract and flaxseed oil (*Linum usitatissimum*) alone and simultaneous administration with nitrofurazone in wound healing process. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Science*, 5 (1), 216-223.

Domínguez, X.A., Verde, J., Sugar, S. & Trevino, R. (1986). Two amides from *Piper amalago*. *Phytochemistry*, 25:239-240.

Durant-Archibald, A.A., Santana, A.I. & Gupta, M.P. (2018). Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 217, 63–82.

Edwards, R. & Harding, K.G., 2004. Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 7 (2), 91-6.

Engvall, E. & Ruoslahti, E. (1977). Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *International Journal of Cancer*, 20 (1), -5. 10.

Figueredo, F.G., Tintino, S.R., Brito, D.I.V., Braga, M.F.B.M., Leite, N.F., Lucena, B.F.F., Sobral-Souza, C.E., Gomez, M.C.V. & Coutinho, H.D.M. (2014). Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 35 (1), 149-154.

Facundo, V.A., Pollli, A.R., Rodrigues, R.V., Militão, J.S.L.T., Stabelli, R.G. & Cardoso, C.T. (2008). Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H.B.K. *Acta Amazonica*, 38 (4), 743-748.

Frazier, K., Williams, S., Kothapalli, D., Klapper, H. &, Grotendorst, G.R. (1996). Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *Journal of Investigative Dermatology*, 107, 404-41.

Friedl, P. & Wolf, K.J. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *Journal of Cell Biology*, 188 (1), 11–19.

Funari, C.S. & Ferro, V.O. (2005). Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 5 (2), 178-182.

- Gartner, L.P. & Hiatt, J.L., 2017. Tratado de Histologia em cores. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Gazola, A., Freitas, G. & Evangelista-Coimbra, C.C.B. (2014). O uso da *Calendula officinalis* no tratamento da reepitelização e regeneração tecidual. *Revista Uningá Review*, 20 (3), 54-59.
- Geetha, T. & Varalakshmi, P. (2001). Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 77-80.
- George, S.E., Anderson, R.J., Cunningham, A., Donaldson, M. & Groundwater, P.W. (2010). Evaluation of a range of anti-proliferative assays for the preclinical screening of anti-psoriatic drugs: a comparison of colorimetric and fluorimetric assays with the thymidine incorporation assay. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 8 (3), 389-400.
- Ghosh, P.K. & Gaba, A. (2013). Phyto-extracts in wound healing. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 16 (5), 760 - 820.
- Gill, S.E. & Parks, W.C. (2008). Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40 (6-7), 1334-47.
- Gillies, R.J., Didier, N. & Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry*, 159 (1), 109-13.
- Gordon, M.K. & Hahn, R.A. (2010). Collagens. *Cell and Tissue Research*, 339 (1), 247–257.
- Graidist, P., Mratla, M. & Sukpondm, Y. (2015). Cytotoxic activity of *Piper cubeba* extract in breast cancer cell lines. *Nutrients*, 7, 2707-18.
- Guimarães, E.F. & Valente, M.C. (2001). Piperaceae – *Piper*. In: Reitz, R. (ed.). Flora ilustrada catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.
- Guo, S. & DiPietro, L.A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal Dental Research*, 89, 219-229.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453, 314–321.
- Harish, B.G., Krishna, V., Kumar, H.S.S., Khadeer, A., Sharath, R. & Kumaraswamy, H.M. (2008). Wound healing activity and docking of glycogen-synthase-kinase-3-beta-protein with isolated triterpenoid lupeol in rats. *Phytomedicine*, 15, 763–767.
- Hata, K., Ogihara, K., Takahashi, S., Tsuka, T., Minami, S. & Okamoto, Y. (2010). Effects of lupeol on melanoma in vitro and in vivo: fundamental and clinical trials. *Animal Cell Technology*, 16, 339-44.

- Hernandes, L., Pereira, L.M.S., Palazzo, F. & Mello, J.C.P. (2010). Woundhealing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) in rat skin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46 (3), 431- 436.
- Jardim, I.M. (2011). Reparação de feridas cutâneas de camundongos tratadas com óleo de pimenta longa, *Piper hispidinervum* C.DC. *Revista da Universidade do Vale do Rio Verde*, 9 (1), 258-276.
- Jeong, H.U., Kwon, S.S., Kong, T.Y., Kim, J.H. & Lee, H.S. (2014). Inhibitory effects of cedrol, β -cedrene, and thujopsene on cytochrome P450 enzyme activities in human liver microsomes. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 77, 1522-1532.
- Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*, 12 (4), 390-399.
- Khosravatbar F., Abrishamchi P., Bahrami AR, Matin MM, Ejtehadi H. & Varasteh-Kojourian M. (2017). Enhanced cutaneous wound healing by the leaf extract of *Achillea eriophora* D.C. using the *in vitro* scratch assay. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 28 (4), 305-312.
- Krane, S.M. (2008). A importância dos resíduos de prolina na estrutura, estabilidade e suscetibilidade à degradação proteolítica dos colágenos. *Aminoácidos*, 35 (4), 703-710.
- Kunz-Schughart, L.A., Heyder, P., Schröder, J. & Knurchel, R. (2001). A heterologous 3 D coculture model of breast tumor cells and fibroblast to study tumor associated fibroblast differentiation. *Experimental Cell Research*, 66, 74-86.
- Lee, H., Hong, Y., Kwon, S.H., Park, J. & Park, J. (2016). Anti-aging effects of *Piper cambodianum* P. Fourn. extract on normal human dermal fibroblast cells and a wound-healing model in mice. *Clinical Interventions in Aging*, 29 (11), 1017-1026.
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbali, I., Hart, G.W. & Gong, C-X. (2004). O-GlcNAcylation regulares phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (29), 10804-9.
- Lopes, J.J., Marx, C., Ingrassia, R., Picada, J. N., Pereira, P. & Ferraz, A.D.B.F. (2012). Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNS-acting medicinal plants of *Piper* genus. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64 (1-2), 9-14.
- Luciano, L.L., Sores, E.A., Garcia, J.A.D., Pereira, A.A., Miranda, A.P., Silva, D.B., Fernandes, A., Silva, T.D., Lima, S.J.F., Garcia, E.K.I. & Lima, C.C. Utilização de óleo de moringa na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 1, e23710110981, 2021.
- Medeiros, A.C. & Dantas Filho, A.M. (2016). Cicatrização das feridas cirúrgicas. *Journal of Surgical Research*, 7 (2), 87-102.
- Mienaltowski, M.J. & Birk, D.E. (2014). Structure, physiology, and biochemistry of collagens. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 802, 5-29.

- Mittal, A., Sardana, S. & Pandey, A. (2013). Herbal boon for wounds. *Int. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5 (2), 1-12.
- Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S.R., Andahazy, M., Story, G.M. & Patapoutian, A. (2005). Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*, 307, 1468-1472.
- Moore, K.W., De Waal Malefyt, R., Coffman, RL. & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, 19, 683-765.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1-2), 55-63.
- Natérica, F. (2005). Ausência de proteína altera migração de células no embrião. *Ciência e Cultura*, 57 (2), 1.
- Nascimento Júnior, C.S., Cavalcanti, E.B.V.S, Sousa, A.P., Silva, D.F. & Ferreira, M.D.L. Análise qualitativa do perfil químico de plantas medicinais do horto das Faculdades Nova Esperança. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 9, e816998033, 2020.
- Nayak, S.B., Rodrigues, V., Maharaj, S. & Bhogadi, V.S. (2013). Wound healing activity of the fruit skin of *Punica granatum*. *Journal of Medicinal Food*, 16 (9), 857-861, 2013.
- Novaes, A.S., Mota, J.S., Barison, A., Veber, C.L., Negrão, F.J., Kassuya, C.A. & Barros, M.E. (2014). Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). *Phytomedicine*, 21, 523-528.
- Nowatzki, J., Sene, R.V., Paludo, K.S., Veiga, S.S., Oliver, C., Jamur, M.C., Nader, H.B., Trindade, E.S. & Franco, C.R.C. (2010). Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. *Toxicon*, 56 (4), 535-543.
- Paco, K., Ponce-Soto, L.A., Lopez-Illasaca, M. & Aguilar, J.L. (2016). Determinación del efecto cicatrizante de *Piper aduncum* (mático) en fibroblastos humanos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 33 (3), 438-47.
- Panah, K.G., Hesaraki, S. & Farahpour, M.R. (2014). Histopathological evaluation of *Thymus vulgaris* on wound healing. *Indian Journal of Life Sciences*, 4, 3538-3544.
- Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Clark, K., Cukierman, E., Matsumoto, K. & Yamada, K.M. (2005). A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *Journal of Cell Biology*, 170 (5), 793-802.
- Parente, L.M.L., Lino Junior, R.S., Tresvenzol, L.M.F., Vinaud, M.C., De Paula, J.R. & Paulo, N.M. (2012). Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 11, 1-7.

- Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, S.K., Jain, R., Taneja, P. & Tyagi, O.D. (1997). Phitochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46, 591-673.
- Passos, F.B., Lopes, C.M., Aquino, F.G. & Ribeiro, J.F. (2014). Nurse plant effect of *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. in area of brazilian savanna undergoing a process of restoration. *Brazilian Journal of Botany*, 37 (3), 251-259.
- Peacock Jr., E.E. The wound repair. Philadelphia: W B Saunders, 1984. p. 76-85.
- Peng, L.H., Fung, K.P., Leung, P.C. & Gao, J.Q. (2011). Genetically manipulated adult stem cells for wound healing. *Drug Discovery Today*, 16 (21-22), 957-66.
- Peng, L.H., Mao, Z.Y., Qi, X.T., Chen, X., Li, N., Tabata, Y. & Gao, J.Q. (2013). Transplantation of bone-marrow-derived mesenchymal and epidermal stem cells contribute to wound healing with different regenerative features. *Cell and Tissue Research*, 352 (3), 573-83.
- Pereira, A.S., Shitsuka, D.M., Parreira, F.J. & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. Ed. UAB/NTE/UFSM. Recuperado de https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1
- Piriz, M.A., Lima, C.A.B., Jardim, V.M.R., Mesquita, M.K., Souza, A.D.Z. & Heck, R.M. (2014). Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 16 (3), 628-636.
- Prasad, S., Kalra, N., Singh, M. & Shukla, Y. (2008). Protective effects of lupeol and mango extract against androgen induced oxidative stress in swiss albino mice. *Asian Journal of Andrology*, 10, 313-8.
- Reddy, G.K. & Enwemeka, C.S. (1996). A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clinical Biochemistry*, 29 (3), 225-229.
- Ribeiro, R.I.M.A., Kuribayashi, J.S., Borges Júnior, P.C., Beletti, M.E., Espindola, F.S., Cassali, G.D. & Loyola, A.M. (2010). Inhibition of metalloproteinases by *Aloe vera*, *Annona muricata*, and black tea aqueous extracts. *Journal of Biosciences*, 26 (1), 121-127.
- Rovani, G., Santos, V.L.P., Miguel, O.G., Budel, J.M. & Campos, R. (2013). Investigação fitoquímica e antioxidante de partes vegetativas aéreas de *Piper amalago* L. *Caderno da Escola de Saúde*, 2, 164-177.
- Roy, P., Amdekar, S., Kumar, A., Singh, R., Sharma, P. & Singh, V. (2012). In vivo antioxidant property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. *Journal of Ethnopharmacology*, 140 (1), 186-192.
- Salehi, B., Zakaria, Z.A., Ibrahim, S.A., Rajkovic, J., Shinwari, Z.K., Khan, T., Sharifi-Rad, J., Ozleyen, A., Turkdonmez, E., Valussi, M., Tumer, T.B., Fidalgo, L.M.,

- Martorell, M. & Setzer, W.N. (2019). *Piper* species: a comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. *Molecules*, 24 (7), 1364.
- Sandhu, S.V., Gupta, S., Bansal, H. & Singla, K. (2012). Collagen in health and disease. *Journal of Orofacial Sciences*, 2, 153-159.
- Santos, V.L.P., Franco, C.R.C., Amano, E., Messias-Reason, I.J. & Budel, J.M. (2015). Anatomical investigations of *Piper amalago* (jaborandi-manso) for the quality control. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25 (2), 85-91.
- Santos, V.L.P., Lima, C.P., Campos, R., Ribeiro, C.S.R., Marques, F.A., Budel, J.M. & Messias-Reason, I.J. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of *Piper amalago* L. *Latin American Journal of Pharmacy*, 35, 1883-1889.
- Santos, V.L.P., Lima, C.P., Campos, R., Budel, J.M. & Messias-Reason, I.J. (2019). Determination of flavonoids and the antimicrobial activity of leaves of *Piper amalago* L., Piperaceae. *World Journal of Pharmaceutical Science*, 8, 1635-1644.
- Santos, V.L.P., Lima, C.P., Franco, C.R.C., Monteiro, L.M., Budel, J.M. & Messias-Reason, I.J. (2020). Determination on the chemical groups in the lyophilized aqueous extract obtained from the leaves of *Piper amalago* L. *World Journal of Pharmaceutical Science*, 9 (5), 109-120.
- Savino, W., Ayres Martins, S. & Neves-dos-Santos, S. (2003). Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 1015-1025.
- SEMA. Secretaria Estadual do Meio Ambiente. Departamento de Florestas e áreas Protegidas do Estado do Rio Grande do Sul e Departamentos de Ciências Florestais, Engenharia Rural e Geociências da Universidade Federal de Santa Maria. Relatório Final do Inventário Florestal Contínuo do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 2003.
- Silva, P.S.G., Lopes, R.F., Silva, J.C., Santos, W.B., Veríssimo, R.C.S.S. & Bastos, M.L.A. (2018). Atividade citotóxica, antimicrobiana e cicatrizante do extrato da *Jatropha gossypiifolia* L. *Revista de Enfermagem UFPE*, 12 (2), 465-74.
- Singh, D., Singh, D., Choi, S.M., Zo, S.M., Painuli, R.M., Kwon, S.W. & Han, S.S. (2014). Effect of extracts of *Terminalia chebula* on proliferation of keratinocytes and fibroblasts cells: an alternative approach for wound healing. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1-13.
- Soley, B.S., Morais, R.L., Pesquero, J.B., Baderc, M., Otukia, M.F. & Cabrinia, D.A. (2016). Kinin receptors in skin wound healing. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 82 (2), 95-105.
- Sosa, S., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Pizza, C., Altinier, G. & Tubaro, A. (2002). Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 211-5.

- Suzuki, A., Angulo, P., Lymp J., Li, D., Satomura, S. & Lindor, K. (2005). Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International*, 25, 779-786.
- Thakur, R., Jain, N., Pathak, R. & Sandhu, S.S. (2011). Practices in wound healing studies of plants. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-17.
- Tobin, D.J. (2006). Biochemistry of human skin-our brain on the outside. *Chemical Society Reviews*, 35, 52-67.
- Torres, L.R.O., Santana, F.C., Shinagawa, F.B. & Mancini Filho, J. (2018). Bioactive compounds and functional potential of pequi (*Caryocar spp.*), a native brazilian fruit: a review. *Grasas y Aceites*, 69, 1-16.
- Trengove, N.J., Stacey, M.C., Macauley, S., Bennett, N., Gibson, J., Burslem, F., Murphy, G. & Schultz, G. (1999). Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair and Regeneration*, 7 (6), 442-52.
- Tsala, D.E., Amadou, D. & Habtemariam, S. (2013). Natural wound healing and bioactive natural products. *Phytopharmacology*, 4 (3), 532-60.
- Varga, E., Bardocz, A., Belak A., Maraz, A., Boros, B., Felinger, A., Böszörmenyi, A. & Horvath, G. (2015). Antimicrobial activity and chemical composition of thyme essential oils and the polyphenolic content of different Thymus extracts. *Farmacia*, 63 (3), 357–361.
- Vallenius, T. (2013). Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. *Biology Open*, 3 (6), 1-10.
- Vancheri, C., Gili, E. & Failla, M. (2005). Bradykinin differentiates human lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the B2 receptor. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116, 1242–1248.
- Viana, P.A., Prates, H.T. & Ribeiro, P.E.A. (2006). Uso do extrato aquoso de folhas de nim para o controle de Spodoptera frugiperda no milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo.
- Vieira, A.P., Santos, N.R., Borges, J.H.S., Vincenzi, M.P.A. & Schmitz, W.O. (2008). Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 29 (1), 65-74.
- Visse, R. & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circulation Research*, 92 (8), 827-839.

5. CONCLUSÕES

Levando-se em consideração o objetivo geral e os objetivos específicos apresentados no presente trabalho, abaixo serão destacadas as conclusões a cerca dos resultados obtidos.

5.1. Análise do óleo essencial das folhas de *Piper amalago* L.

- Na amostra de óleo essencial analisada por CG-EM foram identificadas 28 substâncias, representando 99,35% dos constituintes em relação aos picos totais do cromatograma.
- Entre as substâncias encontradas, 20 são sesquiterpenos, destacando-se *E*-nerolidol, α -muuruleno, δ -elemeno, D-4-ol germaceno, β -cedreno e o α -cadinol e 8 monoterpenos, com destaque para o β -felandreno.

5.2 Análise antibacteriana

- Na análise antibacteriana, o óleo de *P. amalago* apresentou atividade para as cepas de *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. A espécie *S. aureus* é isolada com frequência em feridas cirúrgicas infectadas, podem representar focos para desenvolvimento de infecções sistêmicas e apresentar capacidade de desenvolver rapidamente resistência a agentes antimicrobianos.

5.3 Ensaios de viabilidade celular, citotoxicidade e proliferação

- Através do ensaio de citotoxicidade celular pelo método MTT e da viabilidade celular pelo método do vermelho neutro, verificou-se que o extrato aquoso não induziu citotoxicidade nem perda de viabilidade celular em concentração de até 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ após 24 horas de exposição.
- Até a concentração de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ após 24 horas de exposição foi verificada a proliferação celular induzida pelo extrato aquoso.
- Houve comprometimento da viabilidade celular (MTT e VN) mostrou-se citotóxica nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e os testes de proliferação celular nessas concentrações não foram realizados.

5.4 Morfologia celular através de microscopia de luz e microscópio eletrônico de varredura (MEV)

- As células controles observadas ao microscópio de luz e ao microscópio eletrônico de varredura atendem ao padrão estabelecido para a linhagem com células alongadas aderidas ao substrato, com expansão do corpo celular e núcleo central e esférico.
- Os resultados obtidos através da microscopia óptica e da microscopia eletrônica de varredura das células tratadas com 15 µg/mL e 150 µg/ mL de extrato bruto de *P. amalago* por um período de 24 horas de exposição mostra um elevado número de células, maiores que as células controle, com integridade celular, maior expansão do corpo celular, aderidas ao substrato e justapostas.

5.5 Ensaio de citoquímica de fluorescência

- Os resultados do ensaio de detecção de carboidratos sugerem a presença de glicosaminoglicanos de superfície espalhados por todo o corpo celular. Quando comparadas às células de controle, as células tratadas apresentam maior distribuição desses glicoconjungados contendo resíduos de N-acetil-glucosamina.
- Para a detecção de microfilamentos de actina, as células tratadas apresentaram uma organização clara desses microfilamentos em relação às células controle. As fibras de estresse ocupam todo o citoplasma da célula com maior grau de adesão ao substrato e disseminação do corpo celular. O tratamento com 15 µg/ mL foi o que induziu a maior adesão intercelular.

5.6 Ensaio de adesão e disseminação celular

- O extrato bruto de *P. amalago* nas concentrações de 15 µg/mL e 150 µg/ mL por 24 horas, não induziu perda de viabilidade ou alterações na integridade celular ou na dinâmica de adesão celular através de análise por microscopia óptica. Foi verificado que o substrato fibronectina (FN) foi o que apresentou maior afinidade tanto para as células controle quanto para as tratadas.

5.7 Determinação da concentração de hidroxiprolina

- O extrato aquoso de *P. amalago* induziu aumento da produção do aminoácido hidroxiprolina pelas células 3T3, sendo que a concentração de 150 µg/mL foi a mais estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

5.8 Quantificação e atividade da metaloproteinase MMP-2

- A secreção de metaloproteinase MMP-2 por células 3T3 após 96 horas de exposição ao extrato aquoso de *P. amalago* nas concentrações de 15 µg/mL e 150 µg/ mL, mostrou que não houve diferença entre as células tratadas quando comparadas às células controle.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas medicinais são utilizadas desde a antiguidade despertando muito interesse na cura de inúmeras doenças. Muitas espécies botânicas são utilizadas popularmente e entre elas destaca-se a espécie *Piper amalago* L.

P. amalago é utilizada popularmente como agente cicatrizante de feridas, queimaduras, abcessos, furúnculos, picadas de insetos, analgésico, auxiliar digestivo; para tratar cálculos urinários, problemas cardíacos, edema, inflamações e como agente antipirético.

Estudos prévios mostraram a presença de amidas, alcaloides, triterpenos, taninos condensados, flavonoides e óleos essenciais e o potencial farmacológico de suas folhas demonstrou sua importância como anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante e como cicatrizante.

Diante dos fatos apresentados houve interesse do estudo da composição química e de atividades biológicas dos óleos essenciais e do extrato aquoso obtidos de folhas de *P. amalago*.

O estudo dos óleos essenciais obtidos de folhas de *Piper amalago* apresentou de 28 compostos que representam 99,35% dos constituintes desse óleo. A análise da atividade antimicrobiana evidenciou atividade inibitória para as cepas de *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*.

O extrato aquoso obtido de folhas de *P. amalago* em linhagem de fibroblastos (3T3), apresentou modulação positiva no grau de disseminação celular, proliferação celular, adesão, coesão intercelular e produção de colágeno.

A ação antibacteriana dos óleos essenciais frente a duas espécies de bactérias envolvidas em infecções cutâneas; a modulação positiva do extrato aquoso liofilizado em fibroblastos 3T3 e o efeito cicatrizante da aplicação tópica do extrato aquoso de folhas de *P. amalago* em ferimento de paciente com diabetes mellitus tipo 2 endossam o uso etnofarmacológico dessa espécie pelas comunidades da América Central e do

Brasil, como agente cicatrizante de feridas e de queimaduras, podendo ser importante agente no desenvolvimento de novos fitomedicamentos.

7. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

O artigo publicado pela nossa equipe e intitulado “The wound healing effect of aqueous extract from *Piper amalago* L. in diabetic patient”, descreve um relato de caso, onde a aplicação tópica do extrato aquoso obtido das folhas de *P. amalago* auxiliou na cicatrização de uma ferida lacerada em um paciente com diabetes mellitus tipo 2, após 15 dias de aplicação. O resultado obtido mostrou efeito cicatrizante sugerindo que o extrato de folhas de *P. amalago* poderia ser utilizado em estudos futuros através de modelo de cicatrização com análise de mediadores envolvidos no processo, incluindo citocinas, uma vez que os fibroblastos produzem essas substâncias fundamentais para a cicatrização.

O artigo intitulado “Review of *Piper* species growing in the Brazilian State of Paraná with emphasize on the vegetative anatomy and biological activities”, cujo objetivo foi reunir informações-chave, por meio de bancos de dados eletrônicos, sobre a morfoanatomia e atividades biológicas de espécies de *Piper* encontradas no Estado do Paraná abre um caminho para que mais pesquisas e atualizações a respeito desse importante gênero sejam realizadas.

8. REFERÊNCIAS

- ABRUCEZE, L.H.B. Avaliação da eficácia dos biocurativos em ratos Wistar com lesões de pele causadas por queimaduras. 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), - Faculdade de Medicina de Botucatu, 2013.
- ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Espectrometry**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ACHENBACH, H.; FIETZ, W.; WORTH, J.; WAIBEL, R.; PORTECOP, J. Constituents of Tropical Medicinal-Plants.19. Gc Ms-Investigations of the Constituents of *Piper amalago* - 30 New Amides of the Piperine-Type. **Planta Médica**, n. 1, p. 12-18, 1986.
- ALMEIDA, A.R.H.; MENEZES, J.A.; ARAÚJO, G.K.M.; MAFRA, A.V.C. Utilização de plasma rico em plaquetas plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: análise de casos clínicos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. v. 23, n. p. 82-8, 2008.
- ALVAREZ, C.; LABARCA, J.; SALLES, M. Estratégias de prevenção de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) na América Latina. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 14, n. 2, p.108-120, 2010.
- ALVES, E.O.; MOTA, J.H.; SOARES, T.S.; VIEIRA, M.C.; SILVA, C.B. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 651-658, 2008.
- ALVES, H.S.; SOUZA, M.F.V; CHAVES, M.C.O. Three new compounds from *Piper montealegreanu* Yuncker (Piperaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**. v. 22, p. 1610-1615, 2011.
- ALVES, E.; KUBOTA, E.H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.
- ALVES, H.S.; OLIVEIRA, G.E.; ZOGHBI, M.G.; CHAVES, M.C.O. Flavonoides de *Piper carniconnectivum* C.D.C. Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 160-164, 2010.
- ALVES, H.S.; ROCHA, W.R.V.; FERNANDES, A.F.C.; NUNES, L.E.; PINTO, D.S.; COSTA, J.I.V.; CHAVES, M.C.O.; CATÃO, R.M.R. Atividade antimicrobiana de produtos obtidos de espécies de *Piper* (Piperaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 21, n. 2, p. 1-12, 2016.
- ANJOS, A.R.; ALVARES-SILVA, M. Matriz Extracelular e Leucemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 3, p. 404-412, 2000.
- ARAÚJO, R.V.S.; SILVA, F.O.; MELO-JÚNIOR, M.R.; PORTO, A.L.F. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciencias Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 82-89, 2011.

ARENAS, L.A.S.; ZURBARÁN, C.B. La matriz extracelular: el ecosistema de la célula. **Salud Uninorte**, v. 16, p. 9-18, 2002.

ARRIGO, J.S.; BALEN, E.; LANZA JUNIOR, U.; MOTA, J.S.; IWAMOTO, R.D.; BARISON, A.; SUGIZAKI, M.M.; KASSUYA, C.A.L. Antinociceptive, anti-hyperalgesic and anti-arthritis activity of amides and extract obtained from *Piper amalago* in rodents, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, n. 17, p. 101-109, 2016.

BAHI, A.; AL MANSOURI, S.; AL MEMARI, E.; AL AMERI, M.; NURULAIN, S.M.; OJHA, S. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & Behavior**, v. 135, p. 119-24, 2014.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mechanisms involved in wound healing: a revision. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 614-20, 2005.

BALDOQUI, D.C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1107-1109, 2009.

BASTOS, M.L.A.; HOULY, R.L.S.; CONSERVA, L.M.; ANDRADE, V.S., ROCHA, E.M.M.; LEMOS, RPL. Antimicrobial and wound healing activities of *Piper hayneanum*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 213-222, 2011.

BATISTA, J.S.; SILVA, A.E.; RODRIGUES, C.M.F.; COSTA, K.M.F.M.; OLIVEIRA, A.F.; PAIVA, E.S.; NUNES, F.V.A.; OLINDA, R.G. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 441-447, 2010.

BEKTAS, N.; ENEL, B.S.; YENILMEZ, E.; ÖZATIK, O.; ARSLAN, R. Evaluation of wound healing effect of chitosan-based gel formulation containing vitexin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, p. 87–94, 2020.

BEZERRA, J.A. Estudo químico de *Piper peltatum* L. (Piperaceae) e *Commelina erecta* L. (Commelinaceae). 2014. 272 f. Tese (Doutorado - Área de Concentração em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

BHATTACHARYA, S.; MULA, S.; GAMRE, S.; KAMAT, J.P.; BANDYOPADHYAY, S.K.; CHATTOPADHYAY, S. Inhibitory property of *Piper betel* extract against photosensitizationinduced damages to lipids and proteins. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1474–1480, 2007.

BIERING-SORENSEN, F.; SCHRÖDER, A.K.; WILHELMSEN, M.; LOMBERG, B.; NIELSON, H.; HØIBY, H. Bacterial contamination of bath-water from spinal cord lesioned patients with pressure ulcers exercising in the water. **Spinal Cord**, v. 38, n. 2, p. 100-5, 2000.

BISCAIA, S.M.P.; CARBONERO, E.R.; BELLAN, D.L.; BORGES, B.S.; COSTA, C.R.; ROSSI, G.R.; GONÇALVES, J.P.; MELO, C.M.; LÍVERO, F.A.R.; RUTHES, A.C.;

ZOTZ, R.; OLIVEIRA, C.C.; ACCO, A.; NADER, H.B.; CHAMMAS, R.; IACOMINI, M.; FRANCO, C.R.C.; TRINDADE, E.S. Safe therapeutics of murine melanoma model using a novel antineoplastic, the partially methylated mannogalactan from *Pleurotus eryngii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, p. 95-104, 2017.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 3: Principais Síndromes Infecciosas/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2013.

BRATTI, C.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H.; OLIVEIRA, A.P.A.; MARAFIGA, B.G.; FERNANDES, S.S.L. Levantamento de plantas medicinais nativas da Fazenda Azulão em Dourados-MS. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 4, p. 675-683, 2013.

BRAZÃO, M.A.B. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* L. e seu componente, dilapiol, frente a *Staphylococcus spp.* multirresistentes. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, 82p.

BUDOVSKY, A.; YARMOLINSKY, L.; BEN-SHABAT, S. Effect of medicinal plants on wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 2, p. 171–183, 2015.

CAMPOS, A.C.L.; BORGES-BANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, p. 51-8, 2007.

CARDOZO JÚNIOR, E. L.; CHAVES, M. C. O. Caldensin, A New Natural N-Methylaristolactam from *Piper caldense*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 216-218, 2003.

CARNEIRO, N.S.; ALVES, C.C.F.; ALVES, J.M.; EGEA, M.B.; MARTINS, C.H.G.; SILVA, T.S.; BRETANHA, L.C.; BALLESTE, M.P.; MICKE, G.A.; SILVEIRA, E.V.; MIRANDA, M.L.D. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1907-1915, 2017.

CARRARA, V.D.; DE SOUZA, A.; DIAS, B.P.; NAKAMURA, C.V.; DE PAULO, L.F.; YOUNG, M.C.M.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CORTEZ, D.A.G. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil from *Piper amalgo* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 8, p.1459-1462, 2010.

CARRARA, V.S.; SERRA, L.Z.; CARDOZO-FILHO, L.; CUNHA-JÚNIOR, E.F.; TORRES-SANTOS, E.C.; CORTEZ, D.A.G. HPLC analysis of supercritical carbon dioxide and compressed propane extracts from *Piper amalgo* L. with antileishmanial activity. **Molecules**, v. 17, p. 15-33, 2012.

CARRARA, V.S.; CUNHA-JÚNIOR, E.F.; TORRES-SANTOS, E.C.; CORRÊA, A.G.; MONTEIRO, J.L.; DEMARCHI, I.G.; LONARDONI, M.V.C.; CORTEZ, D.A.G. Antileishmanial activity of amides from *Piper amalago* and synthetic analogs. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 447-454, 2013.

CARRARA, V.S.; VIEIRA, S.C.H.; DE PAULA, R.G.; RODRIGUES, V. *In vitro* schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of piper species and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae). **Journal of Helminthology**, v. 88 (3), p. 1-6, 2014.

CHAVES, M.C.O.; SANTOS, B.V. Constituents from *Piper marginatum* fruits. **Fitoterapia**. v. 73: p. 547-548, 2002.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institut. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada. 8. ed. M2-A8. v. 23, n. 1. Substitui a Norma M2-A7, v. 20, n. 1, 2005.

COELHO, J.M.; ANTONIOLLI, A.B.; NUNES E SILVA, D.; CARVALHO, T.M.M.B.; PONTES, E.R.J.C.; ODASHIRO, N.A. 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 Cirurgiões**, v. 37(1): p. 45-51, 2010.

CONDE-HERNÁNDEZ, L.A.; GUERRERO-BELTRÁN, J.A. Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. **Food Chemistry**, v. 42, n. 2014, p. 455–460, 2014.

CONSTANTIN, M.B.; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A.T.; STEPPE, M.; FERREIRA, M.J.; OHARA, M.T.; EMERENCIANO, V.P.; KATO, M.J. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by GC/MS and 13 C-NMR. **Planta Médica**. v. 67, p. 771-773, 2001.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

COSTA, G.M.; ENDO, E.H.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, T.U.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Antimicrobial effects of *Piper hispidum* extract, fractions and chalcones against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Mycology**. v. 26, n. 3, p. 217-226, 2016.

CREMASCO, M.A.; BRAGA, N.P. Isomerização do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC) para a obtenção de isosafrol. **Acta Amazonica**. v. 40, n. 4, p. 737– 740, 2010.

CRUZ, S.M.; CÁCERES, A; ÁLVAREZ, L.E.; APEL, M.A.; HENRIQUES, A.T. Chemical diversity of essential oils of 15 *Piper* species from Guatemala. **Acta Horticulturae**, v. 964, p. 39-46, 2012.

CUNHA, M.; PARAVIC, F.; MACHADO, C. Alterações histológicas dos tipos de colágeno após diferentes modalidades de tratamento para remodelamento dérmico:

uma revisão bibliográfica. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, n. 7 n. 4, p. 85-292, 2015.

CUNICO, M.M.; CARVALHO, J.L.S.; KERBER, V.A.; HIGASKINO, C.E.K.; CRUZ ALMEIDA, S.C.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p.97-103, 2004.

CZUCHRA, A.; WU, X.; MEYER, H.; VAN HENGEL, J.; SCHROEDER, T.; GEFFERS, R.; ROTTNER, K.; BRAKEBUSCH, C. Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. **Journal of Cellular and Molecular Biology**, v. 16, n. 10, p. 4473-84, 2005.

DARBY, I.A.; HEWITSON, T.D. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. International review of cell and molecular biology. **International Review of Cytology**. v. 257, p. 143-179, 2007.

DE MASI, E.C.D.J.; CAMPOS, A.C.L.; DE MAIS, F.D.J.; RATTI, M.A.S.; IKE, I.S.; DE MASI, R.D.J. The influence of growth factors on skin wound healing in rats. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngol**, v. 2, n. 5, p. 512-521, 2016.

DELADINO, L.; ALVAREZ, I.; DE ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; MOLINA-GARCÍA, A.D.; SCHNEIDER TEIXEIRA, A. Betalains and phenolic compounds of leaves and stems of *Alternanthera brasiliiana* and *Alternanthera tenella*. **Food Research International**, v. 97, 240-249, 2017.

DELAVARY, B.M.; VAN DER VEER, W.M.; VAN EGMOND, M.; NIJESSEN, F.B.; BEELEN, R.H.J. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**. v. 216, n. 7, p. 753–762, 2011.

DEVOD, V.N.; COX, G.C.; ROUFOGALIS, B.D. Visualization of mitochondria in living neurons with single and two photon-fluorescence laser microscopy. **Micron**, v. 32, n. 7, p. 653-60, 2001.

DOGOURY, H.G.; FARAHPOUR, M.R.; AMNIATTALAB, A. Comparision effect of chamomile (*Chamomilla recutita*) hydroethanolic extract and flaxseed oil (*Linum usitatissimum*) alone and simultaneous administration with nitrofurazone in wound healing process. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Science**, v. 5, n. 1, 216-223, 2015.

DOMÍNGUEZ, X.A.; VERDE, J.; SUGAR, S.; TREVINO, R. Two amides from *Piper amalago*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 239-240, 1986.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciênciac**, n.7, 2006.

DURANT-ARCHIBOLD, A.A.; SANTANA, A.I.; GUPTA, M.P. Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 63-82, 2018.

EDWARDS, R.; HARDING, K.G. Bacteria and wound healing. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, 91-6, 2004.

ENGVALL, E.; RUOSLAHTI, E. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. **International Journal of Cancer**, v. 20, n. 1, p. 5-10, 1977.

ESTRELA, J.L.V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, n. 2, p. 217-222, 2006.

FACUNDO, V.A.; POLLINI, A.R.; RODRIGUES, R.V.; MILITÃO, J.S.L.T.; STABELLI, R.G.; CARDOSO, C.T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H.B.K. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 4, p. 743-748, 2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed., Brasília: Anvisa, 2010, 546p.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; LIMA, M. S.; ALECIOS, M. R. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**. v. 34, n. 3, p. 485-489, 2005.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitos* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.

FERRAZ, A.B.F.; BALBINO, J.M; ZINI, C.A; RIBEIRO, V.L.; BORDIGNON, S.A.; POSER, G. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* Species. **Parasitology Research**. v. 107, n. 1, p. 243-248, 2010.

FIGUEREDO, F.G.; TINTINO, S.R.; BRITO, D.I.V.; BRAGA, M.F.B.M.; LEITE, N.F.; LUCENA, B.F.F.; SOBRAL-SOUZA, C.E.; GOMEZ, M.C.V.; COUTINHO, H.D.M. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35 (1), p. 149-154, 2014.

FLORA DO BRASIL 2020. Piperaceae. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 10 mar. 2021.

FRAZIER, K.; WILLIAMS, S.; KOTHAPALLI, D.; KLAPPER, H.; GROTENDORST, G.R. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. **Journal of Investigative Dermatology**, v.107, p. 404-41, 1996.

FRIEDL, P.; WOLF, K.J. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. **Journal of Cell Biology**, v.188, n. 1, p. 11-19, 2010.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.J.B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e

tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, p. 178-182, 2005.

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **The Journal of Pathology**, v. 200, n.4, p.500-503, 2003.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em Cores**. 3. ed. Filadélfia: Elsevier, 2007.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em cores**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

GAZOLA, A.; FREITAS, G.; EVANGELISTA-COIMBRA, C.C.B. O uso da *Calendula officinalis* no tratamento da reepitelização e regeneração tecidual. **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 3, p. 54-59, 2014.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 77-80, 2001.

GEORGE, S.E.; ANDERSON, R.J.; CUNNINGHAM, A.; DONALDSON, M.; GROUNDWATER, P.W. Evaluation of a range of anti-proliferative assays for the preclinical screening of anti-psoriatic drugs: a comparison of colorimetric and fluorimetric assays with the thymidine incorporation assay. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 8, n. 3, p. 389-400, 2010.

GHOSH, P.K.; GABA, A. Phyto-extracts in wound healing. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.16, n. 5, p. 760-820, 2013.

GILBERT B.; FAVORETO, R. *Piper umbellatum* L. = *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. **Revista Fitos**, 2010; v. 5, n. 2, p. 35-44.

GILL, S.E.; PARKS, W.C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 6-7, p. 1334-47, 2008.

GILLIES, R.J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 159, n. 1, p. 109-13, 1986.

GONÇALVES, M.M.M.; CAJAIBA, R.L.; SANTOS, W.B.; SOUSA, E.S.; MARTINS, J.S.C.; PEREIRA, K.S. et al. Estudo etnobotânico do conhecimento e uso de plantas medicinais em Santa Luzia, Maranhão, Brasil. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**. v. 9, n. 5, p. 12-21, 2018.

GORDON, M.K.; HAHN, R.A. Collagens. **Cell and Tissue Research**, v. 339, n. 1, 247-257, 2010.

GOGOSZ, A.M.; BOEGER, M.R.T.; NEGRELLE, R.R.B.; BERGO, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 63, n. 2, p. 405-417, 2012.

GOUVÊA, C.M.C.P. Oxidações biológicas e atividade vegetal. In: **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Carvalho, J.C.T. (coord.). Ribeirão Preto: Tecmedd, p. 101-124, 2004.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sproutsonal superficial loops of granulation tissue II: ultrastructural aspects. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 6, p. 66-71, 1992.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**. vol. 159, cap.1, p.109–113, 1986.

GUIMARÃES, E.F.; GIORDANO, L.C.S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: Estado do Ceará. **Rodriguésia**. v. 55, p. 21-46, 2004.

GUIMARÃES, E.F.; VALENTE, M.C. Piperaceae – *Piper*. In: Reitz, R. (ed.). Flora ilustrada catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2001.

GUO, S.; DIPIETRO, L.A. Factors affecting wound healing. **Journal Dental Research**, v. 89, p. 219-229, 2010.

GURTNER, G.C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M.T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, p. 314–321, 2008.

GRAIDIST, P.; MRATLA, M.; SUKPOND, Y. Cytotoxic activity of *Piper cubeba* extract in breast cancer cell lines. **Nutrients**, v. 7, p. 2707-18, 2015.

GRAY, H. **Gray Anatomia**. 37. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

GREEN, H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. **Cell**. V. 15, n. 3, p. 801-11, 1978.

HARISH, B.G.; KRISHNA, V.; KUMAR, H.S.S.; KHADDEER, A.; SHARATH, R.; KUMARASWAMY, H.M. Wound healing activity and docking of glycogen-synthase-kinase-3-beta-protein with isolated triterpenoid lupeol in rats. **Phytomedicine**, v. 15, p. 763–767, 2008.

HATA, K.; OGIHARA, K.; TAKAHASHI, S.; TSUKA, T.; MINAMI, S.; OKAMOTO, Y. Effects of lupeol on melanoma in vitro and in vivo: fundamental and clinical trials. **Animal Cell Technology**, v. 16, p. 339-44, 2010.

HE, M.; MIN, J.W.; KONG, W.L.; HE, X.H.; LI, J.X.; PENG B.W. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, v. 115, p. 74-85, 2016.

HERMOSO, A.; JIMÉNEZ, I.A.; MAMANI, Z.A.; BAZZOCCHI, I.L.; PIÑERO, J.E.; RAVELO, A.G.; VALLADARES, B. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from

Piper elongatum and synthetic related compounds structural requirements for activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 3975-3980, 2003.

HERNANDES, L.; PEREIRA, L.M.S.; PALAZZO, F.; MELLO, J.C.P. Wound healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) in rat skin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 431-436, 2010.

HILDEBRAND, K.A.; GALLANT-BEHM, C.L.; KYDD, A.S.R.; HART, D.A. The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. **Sports Medicine Arthroscopy**, v.13, n. 3, p. 136-144, 2005.

HUBER; L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.19, n.1, p. 97-108, 2008.

HYNES, R.O. **Fibronectins**. New York: Springer-Verlag, 1989.

HWANG, L.S.; WANG, C.; SHEU, M.; KAO, L. Phenolic Compounds of *Piper betle* flower as flavoring and Neuronal activity modulating agents. **ACS Symposium Series**, v. 506, n. 1, p. 2000-2013, 1992.

ISAAC, C.; LADEIRA, P.R.S.; RÊGO, F.M.P.; ALDUNATE, J.C.B.; FEREIRA, M.C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista Médica**, v. 89, n. 3/4, p. 125-31, 2010.

JANNING, D.; ALBUQUERQUE, C.A.C.; BARAUNA, S.C. Avaliação preliminar do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos (*Rattus norvegicus*). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 8, n. 3, p. 53-64, 2011.

JARDIM, I.M. Reparação de feridas cutâneas de camundongos tratadas com óleo de pimenta longa, *Piper hispidinervum* C.DC. **Revista da Universidade do Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 1, p. 258-276, 2011.

JEONG, H.U.; KWON, S.S.; KONG, T.Y., KIM, J.H.; LEE, H.S. Inhibitory effects of cedrol, β -cedrene, and thujopsene on cytochrome P450 enzyme activities in human liver microsomes. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 77, p. 1522-1532, 2014.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Basic Histology**. The McGraw-Hill Campanies Inc., New York, 2016.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**: texto e atlas. 12. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2013.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**: texto e atlas. 13. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2017.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European Journal of Dermatology**, v. 12, n. 4, p. 390-399, 2002.

KAUR, I.P.; GEETHA, T. Screening methods for antioxidants-a review. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 6, p. 305-312, 2006.

KHOSRAVITABAR, F.; ABRISHAMCHI, P.; BAHRAMI, A.R.; MATIN, M.M.; EJTEHADI H.; VARASTEH-KOJOURIAN, M. Enhanced cutaneous wound healing by the leaf extract of *Achillea eriophora* D.C. using the *in vitro* scratch assay. **Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran**, v. 28, n. 4, p. 305-312, 2017.

KRANE, S.M. A importância dos resíduos de prolina na estrutura, estabilidade e suscetibilidade à degradação proteolítica dos colágenos. **Aminoácidos**, v. 35, n. 4, p. 703-710, 2008.

KUNZ-SCHUGHART, L.A.; HEYDER, P.; SCHROLDER, J.; KNURCHEL, R. A heterologous 3 D coculture model of breast tumor cells and fibroblast to study tumor associated fibroblast differentiation. **Experimental Cell Research**, v. 66, p. 74-86, 2001.

LABARCA, J. L. Nuevos conceptos en farmacodinamia, debemos repensar cómo administramos antimicrobianos? **Revista Chilena de Infectología**. v. 19, supl. 1, p. S33-S37, 2002.

LEE, H.; HONG, Y.; KWON, S.H.; PARK. J.; PARK, J. Anti-aging effects of *Piper cambodianum* P. Fourn. extract on normal human dermal fibroblast cells and a wound-healing model in mice. **Clinical Interventions in Aging**, v. 29, n. 11, p. 1017-1026, 2016.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, p. 288- 306, 2011.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics and Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9-18, 2007.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; CARVALHO, S.M.; MELO, B.A.; VIEIRA, S.S. Composição química e toxicidade de óleos essenciais para o pulgão-verde *Schizaphisgraminum* (Rondani, 1852). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n.1, p. 22-29, 2014.

LIMA, I.C.; WU, S.V.; SILVA, L.M.; FREITAS, J.J.S; CARNEIRO, F.R.O.; OLIVEIRA, F.R.T. Quantificação de colágeno tipos I e III em lesões de pele de pacientes portadores de hanseníase. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, p. 1-8, 2020.

LIU, F.; IQBAL, K.; GRUNDKE-IQBAL, I.; HART, G.W.; GONG, C-X. O-GlcNAcylation regulares phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 29, p. 10804-9, 2004.

LOBATO, A.K.S.; SANTOS, D.G.C.; CASTRO, D.S.; TORRES, G.I.O.P.S.; OLIVEIRA, C.F.N.; SILVA, M.H.L. Avaliação dos efeitos da temperatura e da restrição hídrica sobre a germinação de sementes de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, p. 297-299, 2007.

LOPES, J.J.; MARX, C.; INGRASSIA, R.; PICADA, J. N.; PEREIRA, P.; FERRAZ, A.D.B.F. Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNS-acting medicinal lants of *Piper* genus. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 1-2, p. 9-14, 2012.

LUCIANO, L.L.; SORES, E.A.; GARCIA, J.A.D.; PEREIRA, A.A.; MIRANDA, A.P.; SILVA, D.B.; FERNANDES, A.; SILVA, T.D.; LIMA, S.J.F; GARCIA, E.K.I.; LIMA, C.C. Utilização de óleo de moringa na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, e23710110981, 2021.

MACAN, L.R.; DEWES, D.C.; PILETTI, R. Avaliação físicoquímica comparativa do morango (Albion), desidratado pelos métodos de secagem e liofilização. **Revista Ciencias Agroveterinarias e Alimentos**, Itapiranga, v. 2, n. 1, p.1-9, 2017.

MACÊDO, C.G.; SOUSA, B.C.M.; FRAGA, S.S.; LOURIDO, K.A.; LUSTOSA, D.C.; SILVA, E.O.; CASTRO, K.C.F. Fitoquímica e atividade antifúngica do extrato de folhas de *Piper marginatum* no controle de fitopatógenos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 6, 70-77, 2018.

MAURER, L.M.; TOMASINI-JOHANSSON, B.R.; MOSHER, D.F. Emerging roles of fibronectin in thrombosis. **Thrombosis Research**. v. 125, n. 4., p. 287-291, 2010.

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

MESQUITA, J.M.O.; CAVALEIRO, C.; CUNHA, A.P.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 15, n. 1, p. 6-12, 2005.

MENEZES FILHO, A.C.P.; CASTRO, C.F.S. Identificação das classes de metabólitos secundários em extractos etanólicos foliares de *Campomanesia adamantium*, *Dimorphandra mollis*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Kielmeyera lathrophytum* e *Solanum lycocarpum*. **Macapá**, v. 9, n. 1, p. 89-101, 2019.

MIENALTOWSKI, M.J.; BIRK, D.E. Structure, physiology, and biochemistry of collagens. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 802, 5-29, 2014.

MITTAL, A.; SARDANA, S.; PANDEY, A. Herbal boon for wounds. Int. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5 (2), 1-12, 2013.

MONTGOMERY, D.E. **Introduction to Statistical Quality Control**. 6. ed. New York: John Wiley and Sons, 2008.

MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; AMORIM, E.L.C.; STRATTMANN, R.R.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpáticas da caatinga. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 999-1005, 2005.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEYFT, R.; COFFMAN, RL.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MOQRICH, A.; HWANG, S.W.; EARLEY, T.J.; PETRUS, M.J.; MURRAY, A.N.; SPENCER, K.S.R.; ANDAHAZY, M.; STORY, G.M.; PATAPOUTIAN, A. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. **Science**, v. 307, p. 1468-1472, 2005.

MORALES-GONZALES, J.A. **Oxidative stress and chronic degenerative diseases: a role for antioxidants**. São Paulo: InTech. 2013. 501 p.

MOREIRA, E.A. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb e *Lobelia stellifeladii* R. Braga. Campanulaceae. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p.13-39, 1979.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NASCIMENTO JÚNIOR, C.S.; CAVALCANTI, E.B.V.S.; SOUSA, A.P.; SILVA, D.F.; FERREIRA, M.D.L. Análise qualitativa do perfil químico de plantas medicinais do horto das Faculdades Nova Esperança. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, e816998033, 2020.

NATÉRICA, F. Ausência de proteína altera migração de células no embrião. **Ciência e Cultura**, v. 57, n. 2, 1, 2005.

NAVICKIENE, H.M.D., ALÉCIO, A.C., KATO, M.J., BOLZANI, V.S., YOUNG, M.C.M., CAVALHEIRO, A.J., FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**. V.55, n. 6, p. 621-626, 2000.

NAYAK, S.B.; RODRIGUES, V.; MAHARAJ, S.; BHOGADI, V.S. Wound healing activity of the fruit skin of *Punica granatum*. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 9, p. 857-861, 2013.

NEWMAN, A.C.; NAKATSU, M.N.; CHOU, W.; GERSHON, P.D.; HUGHES, C.C. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. **International Review of Cell and Molecular Biology**. v. 22, n. 20, p. 3791- 3800, 2011.

NITZ, A.C.; ELY, J.B.; D'ACAMPORA, A.J.; TAMES, D.R.; CORRÊA, B.P. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopu didymus* e *Calendula officinalis*. **ACM Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 35, n. 4, p. 74-79, 2006.

NOGUEIRA NETO, J.D.; SOUZA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do nerolidol. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 125-130, 2013.

NOVAES, A.S., MOTA, J.S., BARISON, A., VEBER, C.L., NEGRÃO, F.J., KASSUYA, C.A., BARROS, M.E. Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 21, n. 4, p. 523-528, 2013.

NOVAES, A.S.; MOTA, J.S.; BARISON, A.; VEBER, C.L.; NEGRÃO, F.J.; KASSUYA, C.A.; BARROS, M.E. Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). **Phytomedicine**, v. 21, p. 523-528, 2014.

NOWATZKI, J.; SENE, R.V.; PALUDO, K.S.; VEIGA, S.S.; OLIVER, C.; JAMUR, M.C.; NADER, H.B.; TRINDADE, E.S.; FRANCO, C.R.C. Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. **Toxicon**, v. 56, n. 4, p. 535-543, 2010.

OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S.; SILVA, A.E.; FARIA, Y.J.M.D.; DAMASCENO, C.A.R.; BRITO, P.D.; QUEIROZ, S.A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FREITAS, C.I.A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 3, p. 302-310, 2010.

OLIVEIRA, J.D.; ALVES, C.C.F.; MIRANDA, M.L.D.; MARTINS, C.H.G.; SILVA, T.S.; AMBROSIO, M.A.L.V.; ALVES, J.M.; SILVA, J.P. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 502-510, 2016.

PACO, K.; PONCE-SOTO, L.A.; LOPEZ-ILASACA, M.; AGUILAR, J.L. Determinación del efecto cicatrizante de *Piper aduncum* (mático) en fibroblastos humanos. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 33, n. 3, p. 438-47, 2016.

PAGGIARO, A.O; NETO, N.T.; FERREIRA, M.C. Princípios gerais do tratamento de feridas. **Revista Médica**. v. 89, n.3 e 4, p. 132-136, 2010.

PAGNANO, L.O.; BARALDI-ARTONI, S.M.; PACHECO, M.R.; SANTOS, E.; OLIVEIRA, D.; LUI, J.F. Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com calêndula. **Ciência Rural**. v. 38, n. 6, p. 1662-1666, 2008.

PANAH, K.G.; HESARAKI, S.; FARAHPOUR, M.R. Histopathological evaluation of *Thymus vulgaris* on wound healing. **Indian Journal of Life Sciences**, v. 4, p. 3538-3544, 2014.

PANDEY, K.; RIZVI, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PANKOV, R.; ENDO, Y.; EVEN-RAM, S.; ARAKI, M.; CLARK, K.; CUKIERMAN, E.; MATSUMOTO, K.; YAMADA, K.M. A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. **Journal of Cell Biology**, v. 170, n. 5, p. 793-802, 2005.

PARENTE, L.M.L.; LINO JUNIOR, R.S.; TRESVENZOL, L.M.F.; VINAUD, M.C.; DE PAULA, J.R.; PAULO, N.M. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 1-7, 2012.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, S.K.; JAIN, R.; TANEJA, P.; TYAGI, O.D. Phitochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 591-673, 1997.

PASSOS, F.B.; LOPES, C.M.; AQUINO, F.G.; RIBEIRO, J.F. Nurse plant effect of *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. in area of brazilian savanna undergoing a process of restoration. **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, n. 3, p. 251-259, 2014.

PAULA, M.C.Z.; BOLSON, M.; CARDOZO JUNIOR, E.L.; HEFLER, S.M. Levantamento etnofarmacológico e resgate de germoplasma em remanescentes florestais da floresta estacional semidecidual no oeste do Paraná, Brasil. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Toledo, 2009. Relatório Técnico.

PEACOCK JR., E.E. **The wound repair**. Philadelphia: W B Saunders, 1984.

PENG, L.H.; FUNG, K.P.; LEUNG, P.C.; GAO, J.Q. Genetically manipulated adult stem cells for wound healing. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 21-22, p. 957-66, 2011.

PENG, L.H.; MAO, Z.Y.; QI, X.T.; CHEN, X.; LI, N.; TABATA, Y.; GAO, J.Q. Transplantation of bone-marrow-derived mesenchymal and epidermal stem cells contribute to wound healing with different regenerative features. **Cell and Tissue Research**, v. 352, n. 3, p. 573-83, 2013.

PEREIRA, A.S.; SHITSUKA, D.M.; PARREIRA, F.J.; SHITSUKA, R. Metodologia da pesquisa científica. Ed. UAB/NTE/UFSM, 2018. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1. Acesso em 10.12.2020.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba, SP: Editora da Universidade de São Paulo, 2000. 477p.

PIRIZ, M.A.; LIMA, C.A.B.; JARDIM, V.M.R.; MESQUITA, M.K.; SOUZA, A.D.Z.; HECK, R.M. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16, n. 3, 628-636, 2014.

PISSINATE, K. Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados 75 sintéticos. 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006.

PRASAD, S.; KALRA, N.; SINGH, M.; SHUKLA, Y. Protective effects of lupeol and mango extract against androgen induced oxidative stress in Swiss albino mice. **Asian Journal of Andrology**, v.10, p. 313-318, 2008.

QUILEZ, A.; BERENGUER, B.; GILARDONI, G.; SOUCCAR, C.; MENDONÇA, S.; OLIVEIRA, L.F.S.; MARTINCALERO, M.J.; VIDARI, G. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, n. 3, p. 583-589, 2010.

RANILLA, L.G.; KWON, Y.I.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresour Technology**, v. 101, n. 12, p. 4676-89, 2010.

REDDY, G.K.; ENWEMEKA, C.S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 225-229, 1996.

REIS, A.O.; CORDEIRO, J.C.R.; MACHADO, A.M.O.; SADER, H.S. *In vitro* antimicrobial activity of linezolid tested against vancomycin-resistant enterococci isolated in Brazilian hospitals. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 243-251, 2001.

REINKE, J.M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

RIBEIRO, R.I.M.A.; KURIBAYASHI, J.S.; BORGES JÚNIOR, P.C.; BELETTI, M.E.; ESPINDOLA, F. S.; CASSALI, G.D.; LOYOLA, A.M. Inhibition of metalloproteinases by *Aloe vera*, *Annona muricata*, and black tea aqueous extracts. **Journal of Biosciences**, v. 26, n. 1, p. 121-127, 2010.

REGASINI, L.O.; COTINGUIBA, F.; PASSERINI, G.D.; BOLZANI, V.S.; CICARELLI, R.M.; KATO, M.S.; FURLAN, M. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, 199-203, 2009.

RIGHI, A.A.; ALVES, T.R.; NEGRI, G.; MARQUES, L.M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363-2370, 2011.

ROVANI, G.; SANTOS, V.L.P.; MIGUEL, O.G.; BUDEL, J.M.; CAMPOS, R. Investigação fitoquímica e antioxidante de partes vegetativas aéreas de *Piper amalago* L. **Caderno da Escola de Saúde**, v. 2, p. 164-177, 2013.

ROY, P.; AMDEKAR, S.; KUMAR, A.; SINGH, R.; SHARMA, P.; SINGH, V. In vivo antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 186-192, 2012.

RUEGG, T.; CALDERON, A.L.; QUEIROZ, E.F.; SOLIS, P.N.; MARSTON, A.; RIVAS, F.; ORTEGA-BARRIA, E.; HOSTETTMANN, K.; GUPTA, M.P. 3-farnesyl-2-hydroxybenzoic acid is a new anti-*Helicobacter pylori* compound from *Piper multiplinervium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 461-467, 2006.

SALEHI, B.; ZAKARIA, Z.A.; IBRAHIM, S.A.; RAJKOVIC, J.; SHINWARI, Z.K.; KHAN, T.; SHARIFI-RAD, J.; OZLEYEN, A.; TURKDONMEZ, E.; VALUSSI, M.; TUMER, T.B.; FIDALGO, L.M.; MARTORELL, M.; SETZER, W.N. *Piper* species: a comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1364, 2019.

SANDHU, S.V.; GUPTA, S.; BANSAL, H.; SINGLA, K. Collagen in health and disease. **Journal of Orofacial Sciences**, v. 2, p. 153-159, 2012.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**. v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, M.R.A.; SILVA, A.G.; LIMA, R.A.; LIMA, D.K.S.; SALLET, L.A.P.; TEIXEIRA, C.A.D.; POLLI, A.R.; FACUNDO, V.A. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). **Revista Brasil de Botânica**, v. 33, p. 319-324, 2010.

SANTOS, T.G.; REBELO, R.A.; DALMARCO, E.M.; GUEDES, A.; GASPER, A.L.; CRUZ, A.B.; SCHIMIT, A.P.; CRUZ, R.C.B.; STEINDEL, M.; NUNES, R.K. Composição química e avaliação antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Química Nova**. v. 35, p. 3, p. 477-481, 2012.

SANTOS, F.P.; ALVES, H.S.; LIMA, E.O.; CHAVES, C.O.M. Flavonóides de *Piper glandulosissimum* Yunker (Piperaceae). **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 1672-1677, 2015.

SANTOS, V.L.P.; LIMA, C.P.; CAMPOS, R.; RIBEIRO, C.S.R.; MARQUES, F.A.; BUDEL, J.M.; MESSIAS-REASON, I.J. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of *Piper amalago* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 35, n. 8, p. 1883-1889, 2016.

SANTOS, V.L.P.; RAMAN, V.; BOBEK, V.B.; MIGACZ, I.P.; FRANCO, C.R.C.; KHANB, I.A.; BUDEL, J.M. Anatomy and microscopy of *Piper caldense*, a folk medicinal plant from Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, p. 9-15, 2018.

SANTOS, A.L.; NOVAES, A.S.; POLIDORO, A.S.; BARROS, M.E.; MOTA, J.S.; LIMA, D.B.M.; KRAUSE, L.C.; CARDOSO, C.A.L.; JACQUES, R.A.; CARAMÃO, E.B. Chemical characterisation of *Piper amalago* (Piperaceae) essential oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with rapid-scanning quadrupole mass spectrometry (GC \times GC/qMS) and their antilithiasic activity and acute toxicity. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 5, p. 432-445, 2018.

SANTOS, V.L.P.; FRANCO, C.R.C.; AMANO, E.; MESSIAS-REASON, I.J.; BUDEL, J.M. Anatomical investigations of *Piper amalago* (jaborandi-manso) for the quality control. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 85-91, 2015.

SANTOS, V.L.P.; LIMA, C.P.; CAMPOS, R.; RIBEIRO, C.S.R.; MARQUES, F.A.; BUDEL, J.M.; MESSIAS-REASON, I.J. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of *Piper amalago* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 35, p. 1883-1889, 2016.

SANTOS, V.L.P.; LIMA, C.P.; CAMPOS, R.; BUDEL, J.M.; MESSIAS-REASON, I.J. Determination of flavonoids and the antimicrobial activity of leaves of *Piper amalago* L., Piperaceae. **World Journal of Pharmaceutical Science**, v. 8, p. 1635-1644, 2019.

SANTOS, V.L.P.; RIBAS, J.L.C.; LIMA, C.P.; CAMPOS, R.; GARCIA, A.C.; BUDEL, J.M.; MESSIAS-REASON, I.J. The wound healing effect of aqueous extract *Piper amalago* L. in diabetic patient. **Explore-The Journal of Science and Healing**, v. 13, p. 1-4, 2019.

SANTOS, V.L.P.; LIMA, C.P.; FRANCO, C.R.C.; MONTEIRO, L.M.; BUDEL, J.M.; MESSIAS-REASON, I.J. Determination on the chemical groups in the lyophilized aqueous extract obtained from the leaves of *Piper amalago* L. **World Journal of Pharmaceutical Science**, v. 9, n. 5, p. 109-120, 2020.

SAVINO, W.; AYRES MARTINS, S.; NEVES-DOS-SANTOS, S. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1015-1025, 2003.

SEMA. Secretaria Estadual do Meio Ambiente. Departamento de Florestas e áreas Protegidas do Estado do Rio Grande do Sul e Departamentos de Ciências Florestais, Engenharia Rural e Geociências da Universidade Federal de Santa Maria. Relatório Final do Inventário Florestal Contínuo do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 2003. Relatório Técnico.

SILVA, R. V.; NAVICKIENE, H. M. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; MÉDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521-527, 2002.

SILVA, D.M.M.H.; BASTOS, C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32(2): 143-145, 2007.

SILVA, A.L.; CHAVES, F.C.M.; LAMEIRA, R.C.; BIZZO, H.R. Rendimento e composição do óleo essencial de *Piper aduncum* L. cultivado em Manaus, AM, em função da densidade de plantas e épocas de corte. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, n.4, supl. I, p.670-674, 2013.

SILVA, J.K.R.; PINTO, L.C.; BURBANO, R.M.R.; MONTENEGRO, R.C.; GUIMARÃES, E.F.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 55-60, 2014.

SILVA, P.S.G.; LOPES, R.F.; SILVA, J.C.; SANTOS, W.B.; VERÍSSIMO, R.C.S.S.; BASTOS, M.L.A. Atividade citotóxica, antimicrobiana e cicatrizante do extrato da *Jatropha gossypiifolia* L. **Revista de Enfermagem UFPE**, v. 12, n. 2, p. 465-74, 2018.

SILVA, W.B.; CAJAIBA, R.L.; PARRY, M.M. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do município de Uruará, estado do Pará, Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinais**, v. 29, n. 1, p. 115-131, 2018.

SILVA JUNIOR, I.F., OLIVEIRA, R.G., SOARES, I.M., ALVIM, T.C., ASCENCIO, S.D., MARTINS, D.T.O. Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 151, 137–143, 2014.

SIMEONE, M.L.F.; MIKICH, S.B.; CÔCCO, L.C.; HANSEL, F.A.; BIANCONI, G.V. Caracterização química do óleo essencial dos frutos de *Piper amalago* e *Piper hispidum*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 5., 2009, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2009.

SINGH, D.; SINGH, D.; CHOI, S.M.; ZO, S.M.; PAINULI, R.M.; KWON, S.W.; HAN, S.S. Effect of extracts of *Terminalia chebula* on proliferation of keratinocytes and fibroblasts cells: an alternative approach for wound healing. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

SOARES, C.S.A.; SILVA, M.; COSTA, M.B.; BEZERRA, C.E.S.; CARVALHO, L.M.; SOARES, A.H.V. Atividade inseticida de óleos essenciais sobre *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae) em roseira. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 7, n., p. 169-175, 2012.

SOLEY, B.S.; MORAIS, R.L.; PESQUERO, J.B.; BADERC, M.; OTUKIA, M.F.; CABRINIA, D.A. Kinin receptors in skin wound healing. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 82, n. 2, p. 95-105, 2016.

SORRELL, J.M.; CAPLAN, A.L. Fibroblasts: a diverse population at the center of it all. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 276, p. 161-241, 2009.

SOSA, S.; BALICK, M.J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R.G.; PIZZA, C.; ALTINIER, G.; TUBARO, A. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, 211-215, 2002.

SOUSA, P.J.C.; BARROS, C.A.L.; ROCHA, J.C.S.; LIRA, D.S.; MONTEIRO, G.M.; MAIA, J.G.S. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18: 217-221, 2008.

SOUTO, R.N.P.; HARADA, A.Y.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. Insecticidal activity of *Piper* essential oils from the amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**. v. 41, n. 2, p. 510-517, 2012.

SOUZA, P.G.; ALBINO, A.M.; LIMA, R.A. Identificação de metabólitos secundários no extrato etanólico das inflorescências de *Piper arboreum* Aubl. e seu potencial candidacida. **Biota Amazônia**, v. 9, n. 2, p. 32-34, 2019.

SOUZA FILHO, A.P.S.; VASCONCELOS, M.A.M.; ZOGHBI, M.G.B.; CUNHA, R.L. Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Acta Amazonica**. v. 39, n. 2, p. 2009: 389- 396, 2009.

SOUZA, C.M.P.; BRANDÃO, D.O.; SILVA, M.S.P.; PALMEIRA, A.C.; SIMÕES, M.O.S.; MEDEIROS, A.C.D. Utilização de Plantas Medicinais com Atividade Antimicrobiana por Usuários do Serviço Público de Saúde em Campina Grande – Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.15, n. 2, p.188-193, 2013.

SUZUKI, A.; ANGULO, P.; LYMP J.; LI, D.; SATOMURA, S.; LINDOR, K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Liver International**, v. 25, p. 779-786, 2005.

TAMULY, C.; HAZARIKA, M.; BORA, J.; GAJUREL, P.R. Antioxidant activities and phenolic content of *Piper wallichii* (Miq.) Hand-Mazz. **International Journal of Food Properties**, v. 17, n. 2, p. 309-320, 2014.

THAKUR, R.; JAIN, N.; PATHAK, R.; SANDHU, S.S. Practices in wound healing studies of plants. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-17, 2011.

THE PLANT LIST. A working list of all plant species. 2019. <http://www.theplantlist.org/>. Acesso em 20 dez. 2019.

TOBIN, D.J. Biochemistry of human skin-our brain on the outside. **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 52-67, 2006.

TORRES, L.R.O.; SANTANA, F.C.; SHINAGAWA, F.B.; MANCINI FILHO, J. Bioactive compounds and functional potential of pequi (*Caryocar spp.*), a native brazilian fruit: a review. **Grasas y Aceites**, v. 69, p. 1-16, 2018.

TRENGOVE, N.J.; STACEY, M.C.; MACAULEY, S.; BENNETT, N.; GIBSON, J.; BURSLEM, F.; MURPHY, G.; SCHULTZ, G. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, n. 6, p. 442-52, 1999.

TRANCOSO, M.D. Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. **Revista Práxis**, ano V, n.9, 2013.

TSALA, D.E.; AMADOU, D.; HABTEMARIAM, S. Natural wound healing and bioactive natural products. **Phytopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 532-60, 2013.

VALLENIUS, T. Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. **Biology Open**, v. 3, n. 6, p. 1-10, 2013.

VANCHERI, C.; GILI, E.; FAILLA, M. Bradykinin differentiates human lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the B2 receptor. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, p. 1242-1248, 2005.

VARGA, E.; BARDOCZ, A.; BELAK A.; MARAZ, A.; BOROS, B.; FELINGER, A.; BÖSZÖRMENYI, A.; HORVATH, G. Antimicrobial activity and chemical composition of thyme essential oils and the polyphenolic content of different Thymus extracts. **Farmacia**, v. 63, n. 3, p. 357-61, 2015.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M.K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 54, p. 10-4, 2011.

VIANA, P.A.; PRATES, H.T.; RIBEIRO, P.E.A. Uso do extrato aquoso de folhas de nim para o controle de *Spodoptera frugiperda* no milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006.

VIEIRA, A.P.; SANTOS, N.R.; BORGES, J.H.S.; VINCENZI, M.P.A.; SCHMITZ, W.O. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 65-74, 2008.

VILLELA, D.L. Terapia tópica de úlceras crônicas de perna com plasma rico em plaquetas-PRP: revisão sistemática da literatura. 2007. Dissertação (Mestrado em Enfermagem), São Paulo. Universidade de São Paulo, 154p.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827-839, 2003.

XUAN T.D.; FUKUTA, M.; WEI, A.C.; ELZAAWELY, A.A.; KHANH, T.D.; TAWATA, S. Efficacy of extracting solvents to chemical components of kava (*Piper methysticum*) roots. **The Journal of Natural Medicines**, v. 62, p. 188-194, 2008.

YAMAGUCHI, L.F., LAGO, J.H.G., TANIZAKI, T.M., DI MASCIO, P.; KATO, M.J. Antioxidant activities of prenylated hydroquinones and benzoic acid from *Piper crassinervium*. **Phytochemistry**, v.67, p. 1838-1843, 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.

ZARAI, Z.; BOUJELBENE, E.; SAKEM, N.B.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **LWT- Food Science and Technology**, v. 50, p. 634-641, 2013.

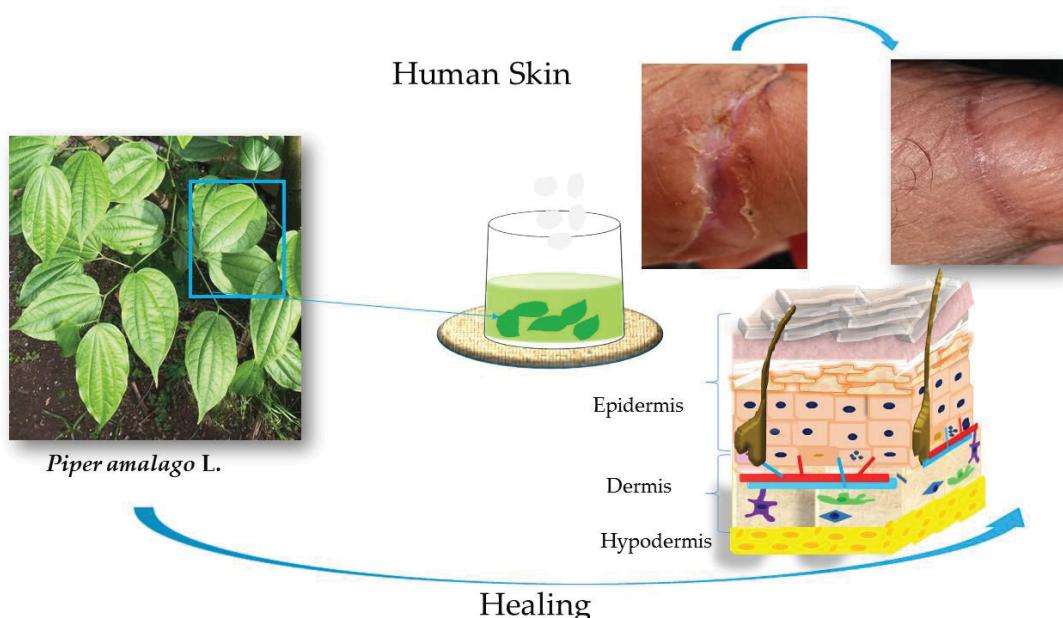
APÊNDICE 1 – ARTIGOS PUBLICADOS

Abaixo encontram-se os dois artigos publicados em revistas indexadas:

- 1-** Artigo intitulado “The wound healing effect of aqueous extract from *Piper amalago* L. in diabetic” publicado na revista EXPLORE: The Journal of Science & Healing. (NY).
- 2-** Resumo do artigo intitulado “Review of Piper species growing in the Brazilian State of Paraná with emphasize on the vegetative anatomy and biological activities” publicado na revista The Botanical Review.

EXPLORE: The Journal of Science & Healing (NY)
Volume 16, Issue 6, November–December 2020, Pages 368-371.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.explore.2019.12.001>
Qualis: A2
Fator de impacto: 1.775

GRAPHICAL ABSTRACT



The wound healing effect of aqueous extract from *Piper amalago L.* in diabetic patient

Vera Lucia Pereira dos Santos^{a,b,*}; João Luiz Coelho Ribas^c; Cristina Peitz de Lima^d; Ranieri Campos^e; Amanda Carvalho Garcia^b; Jane Manfron Budel^f; Iara José Messias-Reason^b.

a. Escola Superior de Saúde, Biociências, Meio Ambiente e Humanidades, Centro Universitário Internacional Uninter, Campus 13 de Maio, Rua 13 de maio, 538, CEP: 80510-030, Curitiba, PR, Brazil.

b. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Universidade Federal do Paraná, Brasil, Rua XV de Novembro, 1299, Centro, CEP: 80060-000, Curitiba, PR, Brazil.

c. Programa de Pós-Graduação, Centro Universitário Internacional Uninter, Campus 13 de Maio, Rua 13 de maio, 538, CEP: 80510-030, Curitiba, PR, Brazil.

d. Escola de Saúde, Centro Universitário Autônomo do Brasil, Unibrasil, Rua Konrad Adenauer, 442, Tarumã, CEP: 82821-020, Curitiba, PR, Brazil.

e. Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, CEP: 69067-005, Manaus, AM, Brazil.

f. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, CEP: 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil.

ABSTRACT

Diabetes patients present a complex healing process due to several factors directly linked to their pathology. The use of medicinal plants that aid in tissue repair can bring great benefits to such individuals. This case report describes how the topical application of the aqueous extract produced from the leaves of *Piper amalago* L. was used to aid the healing of a lacerated wound in the left thumb of a patient with type 2 diabetes mellitus. The aqueous extract of the leaves of *Piper amalago* L. was prepared in boiling water. During the boiling process the dried leaves were submerged in the boiling water and left for five min. The injured thumb was submerged in the solution and the leaves were placed on the injury. The action of the aqueous extract obtained from the leaves of *P. amalago* was shown to be promising in the healing of a wound in a patient with type 2 diabetes mellitus. The topical application of the aqueous extract produced from the leaves of *P. amalago* assisted in the healing of a lacerated wound in the left thumb of a patient with type 2 diabetes mellitus over a period of 15 days.

Keywords: medicinal plant; *Piper amalago*; lacerated wound; healing.

INTRODUCTION

The skin is one of the organs that are most susceptible to injury, and it needs to be repaired in order to restore its structure and functions. The healing of a wound is a highly complex process¹, consisting of a coordinated cascade of cellular and biochemical events that interact for the regeneration of the injured tissue to take place. Healing occurs in three phases: the inflammatory phase; proliferation or granulation; and remodelling or maturation.²

During the process of tissue repair several factors directly interfere with the wound; these can directly affect the wound and/or have systemic influences on the functioning of the organism. Systemic factors include advanced age, where healing tends to be slower because the elderly may have weakened immune, respiratory and circulatory systems, nutritional deficiency and poor hydration.³

Chronic pathologies, such as diabetes mellitus, have a large impact on wound healing and they can hold up the tissue repair process due to a diminution in the response to growth factors and proteins involved in the insulin signalling pathway.

Moreover, the excessive production of reactive oxygen species and the reduction of nitric oxide are also involved.⁴⁻⁵

Archaeological records dating from 60,000 BCE indicate the role of medicinal plants in the recovery of health for humans and the treatment of diseases.⁶ The role of medicinal plants is as old as the human species, and in recent years these plants have played an important role in repairing tissues and improving the treatment of wounds.⁷⁻⁸

The medicinal plants found in the state of Paraná, Brazil include the Piperaceae family, which has 2,658 species distributed within 13 genera throughout the Americas. In Brazil there are four genera, with approximately 450 representatives that are found in the Atlantic Forest and the Amazon rainforest. The *Piper* genus is one of the most representative and it includes about 290 species.⁹⁻¹²

Ethnopharmacological studies of *Piper* have shown biological activities, such as antioxidant, psychotropic and antimicrobial effects, as well as the capacity to treat snake bites.¹³⁻¹⁶

Chemically, *Piper* contains amides that have been shown to have anti-inflammatory and antimicrobial action¹⁷⁻¹⁸, as well as healing properties.¹⁸

One of the most important *Piper* species is *Piper amalago* L., popularly known in Brazil as "jaborandi-manso", which is the focus of the present study. *Piper amalago* L., is a shrub that can reach up to 7 m in height; it can be found from Southern Brazil as far as Central America.¹⁸ It contains volatile oil in oil cells that are located in the stem and leaves.¹⁹

This species is used in traditional medicine for digestive ailments²⁰, in the treatment of cardiac problems, as diuretics, in the treatment of urinary calculi¹⁷, and also for muscular pain and hair loss.²¹

Extracts from the aerial parts contain amides that have presented anti-inflammatory¹⁸; antimicrobial¹⁵, and anti-leishmania properties.²²

The essential oil obtained from *P. amalago* leaves showed activity against *Staphylococcus aureus*¹⁶, a bacterium of the Gram-positive coccus group which is capable of quickly evolving resistance to antimicrobial agents. It is frequently isolated from infected surgical wounds and may contain foci for the growth of systemic infections.²³

Therefore, the objective of the present study was to report on the healing effect of the aqueous extract of the leaves of *P. amalago* in a patient with type 2 diabetes mellitus.

MATERIALS AND METHODS

This project was submitted to the Ethics Committee of the Uninter International University Center; Curitiba, Paraná, Brazil, and approved under No. 68737817.7.0000.5573.

Material

The plant material was gathered in Curitiba, Paraná, Brazil ($24^{\circ} 18' S$ and $49^{\circ} 37' W$), in January 2016. The leaves were dried and then stored, where they were protected from light and moisture.

Preparation and utilisation of the aqueous infusion

The aqueous extract of the leaves was prepared with 1 L of boiling water. During the boiling process ($100^{\circ} C$) 1.4 g of dried leaves (five leaves) of *P. amalago* were submerged and left for five min. The injured thumb was then submerged in the solution for 20 min, when it was at a temperature of about $40^{\circ}C$, and the leaves were left on the injury during that time

RESULTS ANALYSIS

The patient was male, 62 years old (at the time of the accident), who had had type 2 diabetes mellitus for 13 years, as well as systemic arterial hypertension. On October 21st, 2016 he was handling an electric circular saw with a disc for wood cutting. The machine rebounded, causing a lesion in the left-hand dorsal region with damage to the extensors of the thumb and articular capsule lesion. The thumb was partially cut away.

The patient received microsurgery and the tendons, articular capsule, skin and adjacent tissues were sutured and supported with a plaster splint. On the same day, the patient started taking the following: the antibiotic cephalexin (500 mg), one tablet every 6 h for ten days; the anti-inflammatory and analgesic, Celebra® (200 mg), one tablet every 12 h for five days; and the antipyretic Lisador®, one tablet every 8 h, also for five days.

The topical application of the aqueous extract obtained from leaves of *P. amalago* promoted the healing of the lacerated wound in the left thumb of this patient after fifteen days of application of the extract. The evolution of the healing process is demonstrated in the photographs shown in Fig. 1 (A-J).

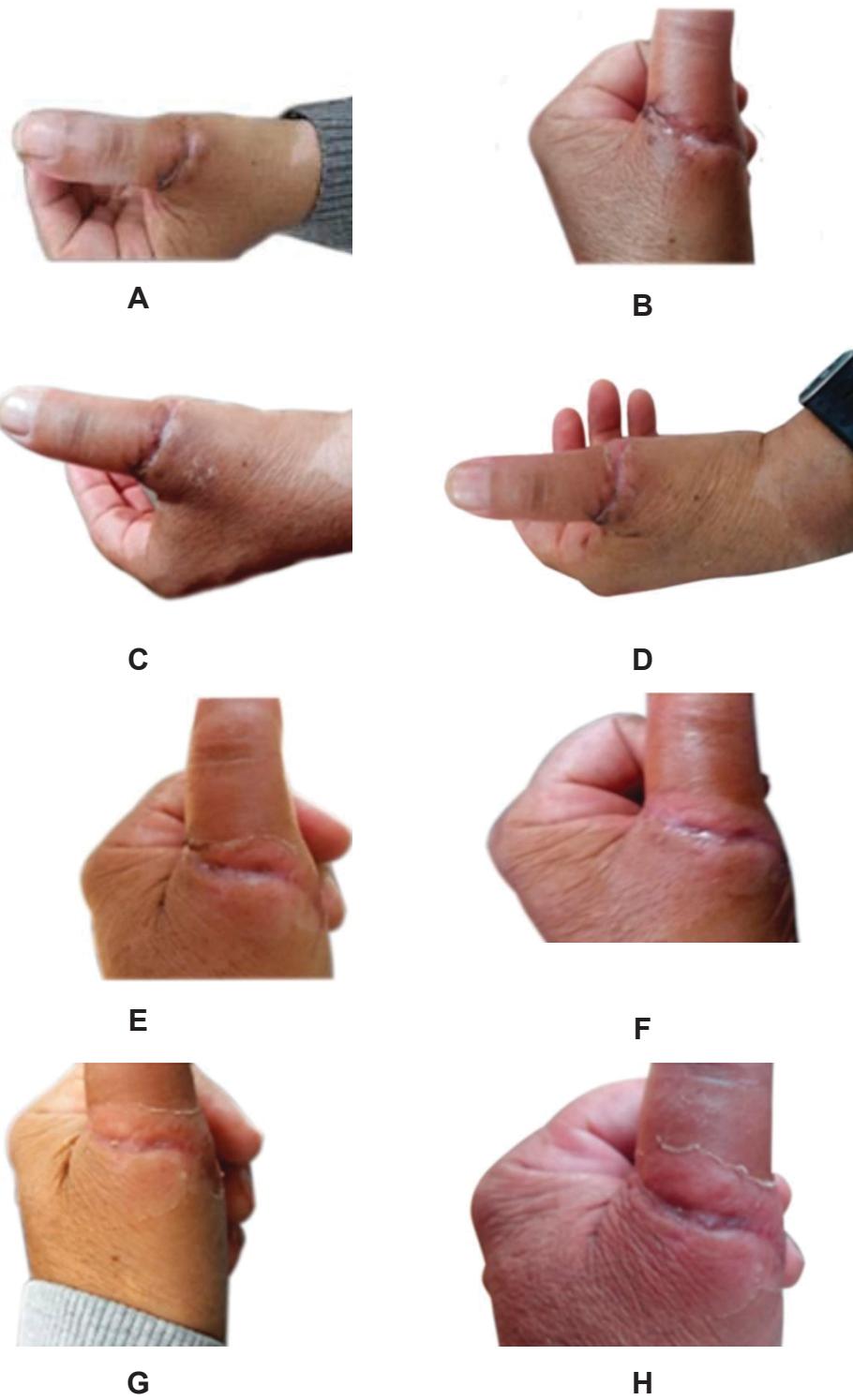




Figure 1: Evolution of the healing process. A. (1st day): site of the wound with edges showing minimal approximation, signs of tissue necrosis (darker regions) and an area of edema. B. (2nd day): site of wound with open areas, signs of tissue necrosis and small area of infection. C. (3rd day): site of wound with closer edges; decreased signs of tissue necrosis and edema. D. (5th day): site of wound with closer edges and areas of debridement. E. (7th day): site of wound with closer edges and areas of debridement. F. (8th day): site of wound with closer edges. G. (11th day): site of wound with closer edges and still with areas of debridement. H. (14th day): site of wound with closer edges and still with areas of debridement. I. (15th day): site of wound with well-approximated and healed edges. J. The image obtained on May 6, 2018 shows the location of the cut to be fully healed.

After 15 days the stitches were taken away; however, some of them opened and the cut did not mend. The cut remained open with the release of suppurative content.

By this time, the patient was not observing any healing regarding his thumb and he decided to try another approach. He began by immersing the injured thumb in the aqueous extract of the leaves of *P. amalago* for 20 min when the liquid was at a temperature of approximately 40°C, and some leaves were left placed over the injury. This procedure began on November 22nd, 2016 and ended on December 6th of the same year (15 days). Photographs were taken at each stage of the healing process.

DISCUSSION

The process of wound healing is complex; it involves chemical signals, cell organisation, and the reconstruction and remodelling of the extracellular matrix so that a lesion can be rapidly closed for functional healing.²⁴

In patients with diabetes, the initial stages of healing occur in a disorganised manner, accentuating edemas, reducing vascular proliferation, and decreasing the number of cells such as leukocytes, macrophages and fibroblasts, thus delaying the process of tissue regeneration.²⁵⁻²⁶

Hyperglycemia can cause vasoconstriction of the arteries, with consequent reduction of blood flow. It can also affect the peripheral nerves of the legs and feet, causing the decrease or loss of feelings of touch, heat and pain. Alterations in vascular

function and structure can cause injury to the affected organ and in extreme cases can even lead to death.²⁷⁻²⁸

Some species of *Piper*, such as *Piper hispidum* Sw., *Piper anonifolium* Kunth and *Piper aleyreanum* C.DC., which are commonly found in the Brazilian Amazon rainforest, are used to heal wounds. In these species, sesquiterpenes are the most representative compounds and they present anti-inflammatory action due to their antioxidant properties.²⁹

Cutaneous wounds in mice treated with a 2.5% concentration of *Piper hispidinervum* C. DC. oil ointment had the tissue repair process accelerated on the eighth day and accentuated after twelve days of treatment, presenting regression characteristics regarding wound repair.³⁰

A study performed by Coelho et al.³¹ demonstrated that the crude methanolic extract of *P. amalago* promoted the second intention healing of wounds. This type of wound is characterised by excessive tissue loss with the presence or absence of infection, it is not possible for the edges of the wound to heal while the wound remains open.³² However, methanol is a neurotoxic compound that is responsible for serious damage to the central nervous system, and it is still capable of causing blindness, affecting the retina and optic nerve.³³⁻³⁵

The phytochemical analysis of the ethanolic extract obtained from the leaves of *P. amalago* showed the presence of alkaloids, condensed tannins, flavonols and triterpenes; the isolated substances were vitexin and lupeol.³⁶

The most common alkaloid in *Piper* is piperine, which has analgesic, antipyretic, anti-inflammatory, antioxidant and depressant activity on the central nervous system.^{37- 38} Piperine is most abundant in fruits of *Piper nigrum* and is responsible for its pungent taste.³⁹

In an acute pain model, the amides obtained from the ethanolic extract of *P. amalago* proved to be anti-nociceptive and anti-hyperalgesic.⁴⁰

Tannins are phenolic substances that are soluble in water and act in the formation of complexes with metal ions; in the antioxidant and sequestering activity of free radicals; and in the ability to form complexes with proteins and polysaccharides.⁴¹⁻⁴³

In wound healing, burns and inflammation processes, tannins help to form a protective layer over the lesioned epithelial tissues, allowing the process of repairing adjacent connective tissue to occur naturally.⁴⁰ Tannins are known to promote wound healing due to their astringent properties.⁴⁴

Tannins were found in an ethanolic extract obtained from *Piper tuberculatum* Jacq. leaves⁴⁵ and in an ethanolic extract obtained from *Piper aduncum* stems.⁴⁶

The triterpenes found in plants have proven anti-inflammatory, antitumor, antibacterial, antifungal, antiviral, analgesic and cardiovascular activity.⁴⁷⁻⁴⁸

Vitexin is a flavonoid that has various pharmacological effects, including antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, anti-hyperalgesic, antimicrobial and neuroprotective effects.⁴⁹⁻⁵²

Lupeol is a triterpene that has potential antimitotic activity⁵³; anti-inflammatory activity⁵⁴; inhibition of the proliferation of cancerous cells⁵⁵; and gastroprotective effects.⁵⁶ Some authors have found that lupeol has high hepatoprotective potential and very low toxicity.⁵⁷⁻⁵⁸

CONCLUSION

The topical application of the aqueous extract from the leaves of *P. amalago* aided the healing of a lacerated wound in the left thumb of a patient with type two diabetes mellitus over a period of 15 days.

REFERENCES

1. Delavary BM, Van Der Veer WM, Van Egmond M, Niessen FB, Beelen, RHJ. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011; 216: 753-762.
2. Campos ACL, Borges-Banco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*. 2007; 20: 51-58.
3. Hess CT. *Tratamento de feridas e úlceras*. 4. ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso, 2002.
4. Glenn I. *Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
5. Lima MHM, Araújo EP. Diabetes mellitus e o processo de cicatrização cutânea. *Cogitare Enfermagem*. 2013; 18(1):170-172.
6. Rocha FAG, Araújo FF, Costa NDL, Silva RP. O uso terapêutico da flora na história mundial. *HOLOS*. 2015; 1:49-61.
7. Amorozo MCM, Gély AL. Uso de plantas medicinais por caboclos do baixo Amazonas, Barcarena, PA, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, Série Botânica. 1988; 4(1):47-131.

8. Moreski DAB, Leite-Mello EVDS, Bueno, FG. Ação cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão. Arq. Cienc. Saúde UNIPAR. 2018; 22:63-69.
9. Silva DMMH, Bastos CN. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. *Fitopatologia Brasileira*. 2007; 32:143-145.
10. Bardelli KC, Mizué Kirizawa M, Sousa AVG. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microcabia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. *Hoehnea*. 2008; 35:553-561.
11. The Plant List. Is a working list of all known plant species. <http://www.theplantlist.org>. Accessed: 03 March 2019.
12. Flora do Brasil 2020 em construção. *Piperaceae*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12735>. Accessed: 03 March 2019.
13. Facundo VA, Pollli AR, Rodrigues RV, Militão JS LT, Stabelli RG, Cardoso CT. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. *Acta Amazônica*. 2008; 38:743-748.
14. Regasini LO, Cotinguiba F, Morandim AA, Kato MJ, Scorzoni L, Mendes-Giannini MJ, Bolzani VS, Furlan M. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. *African Journal of Biotechnology*. 2009; 8:2866-2870.
15. Carrara VS, Serra LZ, Cardozo-Filho L, Cunha-Júnior EF, Torres-Santos EC, Cortez DAG. HPLC analysis of supercritical carbon dioxide and compressed propane extracts from *Piper amalago* L. with antileishmanial activity. *Molecules*. 2012; 17:15-33.
16. Santos VLP, Lima CP, Campos R, Ribeiro CS, Marques FA, Budel JM, Messias-Reason IJ. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of *Piper amalago* L. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2016; 35:1883-1889.
17. Novaes AS, Mota JS, Barison A, Veber CL, Negrão FJ, Kassuya CA, Barros ME. Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2013; 21:523-528.
18. Guimarães EF, Valente MC. Piperaceae – *Piper*. In: Reitz R. (ed.). Flora ilustrada catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí; 2001:21-25.
19. Santos VLP, Franco CRC, Amano E, Messias-Reason IJ, Budel JM. Anatomical investigations of *Piper amalago* (jaborandi-manso) for the quality control. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015; 25:85-91.
20. Pissinate K ([Masters dissertation]. <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/tede/20>, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro) in: estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados 75 sintéticos. 2006.

21. Paula MCZ, Bolson M, Cardozo Junior EL, Hefler SM, 2009. Levantamento etnofarmacológico e resgate de germoplasma em remanescentes florestais da floresta estacional semidecidual no oeste do Paraná, Brasil. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Toledo; 2009, 41p.
22. Carrara VS, Cunha-Júnior EF, Torres-Santos EC, Corrêa AG, Monteiro JL, Demarchi, IG, Lonardoni MVC, Cortez DAG. Antileishmanial activity of amides from *Piper amalago* and synthetic analogs. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013; 23:447-454.
23. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 20017; 43:413-423.
24. Mendonça FAS, Passarini Junior JR, Esquisatto MAM, Mendonça JS, Franchini CC, Santos GMT. Effects of the application of *Aloe vera* (L.) and microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2009; 24(2):150-155.
25. Stefanello TD, Hamerski CR. Tratamento de úlcera de pressão através do laser AsGa de 904 nm: um relato de caso. *Arquivos de Ciências da Saúde Unipar*. 2006; 10:99-103.
26. Andrade NGL, Camelo CN, Carneiro JA, Terêncio KP. Evidências de alterações do processo de cicatrização de queimaduras em indivíduos diabéticos: revisão bibliográfica. *Queimaduras*. 2013; 12:1-7.
27. DeLucia N. Doença vascular e diabetes. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2003; 2:49-60.
28. Smith KC. Laser (and LED) therapy is phototherapy. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*. 2005; 23:78- 80.
29. Silva JKR, Pinto LC, Burbano RMR, Montenegro RC, Guimarães EF, Andrade EHA, Maia JGS. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*. 2014; 58:55–60.
30. Jardim IM. Reparação de feridas cutâneas de camundongos tratadas com óleo de pimenta longa, *Piper hispidinervum* C.DC. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*. 2011; 9:258-276.
31. Coelho RM, Brand G, Ricardo LL, Bonfim NM, Brito LP, Macedo CS, Dourado DM, Sarragioto MH. Atividade cicatrizante e isolamento de amidas pirrolidínicas do extrato metanólico em *Piper amalago*. 2008. <http://sec.sbj.org.br/cdrom/32ra/resumos/T2298-1.pdf>. Accessed: 10 March 2019.
32. Tazima MFGS, Vicente YAMVA, Moriya T. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina*. 2008; 41:259-264.

33. Murray TG, Burton TC, Rajani C, Lewandowski MF, Burke JM, Eells JT. Methanol poisoning. A rodent model with structural and functional evidence for retinal involvement. *Archives of Ophthalmology*. 1991; 109:1012 -1016.
34. Eells JT, Murray TG, Lewandowski MF, Stueven HA, Burke JM. Methanol poisoning: clinical and morphologic evidence of direct retinal dysfunction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1991; 32: 689.
35. Degitz SJ, Zucker RM, Kawanishi CY, Massenburg GS, Rogers JM. Pathogenesis of methanol-induced craniofacial defects in C57BL/6J mice. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2004; 70:172-178.
36. Rovani G, Santos VLP, Miguel OG, Budel JM, Campos R. Investigação fitoquímica e antioxidante de partes vegetativas aéreas de *Piper amalago* L. *Caderno da Escola de Saúde Unibrasil*. 2013; 2:164-177.
37. Parmar VS, Jain SC, Bisht SK, Jain R, Taneja P, Tyagi OD. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*. 1997; 46:591-673.
38. Mittal R, Gupta RL. In vitro antioxidant activity of piperine. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 2000; 22:271-274.
39. Semler U, Gross GG. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. *Phytochemistry*. 1998; 27:1566–1567.
40. da Silva Arrigo J, Balen E, Júnior UL, da Silva Mota J, Iwamoto RD, Barison A, Sugizaki MM, Leite Kassuya CA. Anti-nociceptive, anti-hyperalgesic and anti-arthritis activity of amides and extract obtained from *Piper amalago* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016; 179:101-109.
41. Mello JCP, Santos SC. Taninos. In: Simões CM et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; 2001.
42. Santos SC, Costa WF, Ribeiro JP, Guimarães DO, Ferri PH, Ferreira HD, Seraphin JC. Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia*. 2002; 73:292-299.
43. Fonseca P, Librandi APL. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008; 44:271-277.
44. Kobayashi YTS, Almeida VT, Bandeira T, Alcântara BN, Silva ASB, Barbosa WLR, Silva PB, Monteiro MVB, Almeida MB. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 2015; 52:34-40.
45. Gonçalves APS, Lima RA. Identificação das classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper tuberculatum* JACQ. *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological*. 20016; 3:100-109.

46. Aires ICS, Lima RA. Potencial fungicida do extrato etanólico dos talos de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Candida albicans* in vitro. REB. 2014; 7:270-280.
47. Dewick PM. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons Ltda; 2002.
48. Patočka J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine*. 2003; 1:7-12.
49. Basile A, Giordano S, Lopez-Saez JA, Cobianchi RC. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*. 1999; 52:1479-1482.
50. Afifi FU, Abu-Dahab R. Phytochemical screening and biological activities of *Eminium spiculatum* (Blume) Kuntze (family Araceae). *Natural Product Research*. 2012; 26: 878-882.
51. Das MC, Sandhu P, Gupta P, Rudrapaul P, De UC, Tribedi P, Akhter Y, Bhattacharjee S. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by vitexin: a combinatorial study with azithromycin and gentamicin. *Scientific Reports*. 2016; 6:1-13.
52. He M, Min JW, Kong WL, He XH, Li JX, Peng, BW. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*. 2016; 115:74-85.
53. Zachariah R, Nair CRS, Panicker PV. Anti-inflammatory and anti-mitotic activates of lupeol isolated from the leaves of *Ixora coccinea* Linn. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1994;129-132.
54. Fernández MA, De Las Heras B., García MD, Sáenz MT, Villar A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 20012; 53:533-9.
55. Saleem M, Murtaza I, Witkowsky O, Kohl AM, Maddodi N. Lupeol triterpene, a novel diet-based microtubule targeting agent: disrupts survivin/cFLIP activation in prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 388(3):576-82.
56. Lira SR, Rao VS, Carvalho AC, Guedes MM, De Morais TC, De Souza AL, Trevisan MT, Lima AF, Chaves MH, Santos FA. Gastroprotective effect of lupeol on ethanol-induced gastric damage and the underlying mechanism. *Inflammopharmacology*. 2009; 17(4): 221-8.
57. Sunitha S, Nagara JM, Varalakshmi P. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia*. 2001; 72:516-23.
58. Sudhahar V, Kumar SA, Varalakshmi P, Sundarapandian R. Mitigating role of lupeol and lupeol linoleate on hepatic lipemic-oxidative injury and lipoprotein peroxidation in experimental hypercholesterolemia. *Molecular and Cell Biochemistry*. 2007; 295:189-98.

The Botanical Review

Volume 87, pages 23–54, 2021.

<https://doi.org/10.1007/s12229-020-09239-7>

Qualis: A3

Factor impact: 3.083 (2020)

Review of *Piper* species growing in the Brazilian State of Paraná with emphasize on the vegetative anatomy and biological activities

Vera Lucia Pereira dos Santos^{1,5}; Izabelle Cristina Garcia Rodrigues¹; Rodrigo Berté¹; Vijayasankar Raman²; Iara José Messias-Reason³; Jane Manfron Budel⁴

¹ Escola Superior de Saúde, Biociênciam, Meio Ambiente e Humanidades, Centro Universitário Internacional Uninter, Curitiba Paraná Brazil

² National Center for Natural Products Research, School of Pharmacy, University of Mississippi, University Oxford MS USA

³ Departamento de Patologia Médica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba Paraná Brazil

⁴ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa Paraná Brazil

⁵ Author for Correspondence; e-mail: vera.s@uninter.com

Published online: 6 January 2021
The New York Botanical Garden 2021

Abstract

The State of Paraná has a diversity of plants that are used in the traditional medicine and among them are some of the representatives of the Piperaceae family. *Piper* is the one of the most important genera of this family and its species show similar morphology and different biological activities. The literature shows that approximately 54 species of *Piper* have been described in the State of Paraná. The purpose of this study is to gather key information by means of electronic databases, about the morphoanatomy and biological activities of species of *Piper* found in the State of Paraná. The results with regard to the morphoanatomy show that, on the whole, the species that have been described possess hypostomatic leaves, non-glandular and glandular trichomes, and calcium oxalate crystals in the leaves and stems. Several biological activities have been reported, including antimicrobial, anti-inflammatory, antifungal, digestive, diuretic, insecticidal, leishmanicidal, pesticide and trypanocide.

Keywords Anatomy. Biological activities. Volatile oil. Microscopy. Morphology. Piperaceae.

