



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**MIRELE DA SILVEIRA VASCONCELOS**

**HIDROGEL CICATRIZANTE A PARTIR DE HEMICELULOSES VEGETAIS DE**  
*Caesalpineia pulcherrima* **E PROTEÍNAS LATICÍFERAS DE** *Calotropis procera*

**FORTALEZA**

**2017**

**MIRELE DA SILVEIRA VASCONCELOS**

**HIDROGEL CICATRIZANTE A PARTIR DE HEMICELULOSES VEGETAIS DE  
*Caesalpinea pulcherrima* E PROTEÍNAS LATICÍFERAS DE *Calotropis procera***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

**Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos**

**FORTALEZA**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

V451h Vasconcelos, Mirele da Silveira.

Hidrogel cicatrizante a partir de hemiceluloses vegetais de *Caesalpinia pulcherrima* e proteínas laticíferas de *Calotropis procera* / Mirele da Silveira Vasconcelos. – 2017.  
139 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos .

1. *Calotropis procera*. 2. Galactomanana. 3. Inflamação. 4. Látex. 5. Protease. I. Título.

CDD 572

---

MIRELE DA SILVEIRA VASCONCELOS

**HIDROGEL CICATRIZANTE A PARTIR DE HEMICELULOSES VEGETAIS DE**  
*Caesalpinea pulcherrima* **E PROTEÍNAS LATICÍFERAS DE** *Calotropis procera*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Orientador - Prof. Dr. MARCIO VIANA RAMOS – PRESIDENTE

Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal do Ceará  
(UFC)

---

Examinadora - Profª. Dra. NYLANE MARIA NUNES DE ALENCAR

Deptº de Farmacologia – Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Examinador - Prof. Dr. ARICLECIO CUNHA DE OLIVEIRA

Universidade Estadual do Ceará – (UECE)

---

Examinadora - Profª. Dra. CARLA FREIRE CELEDONIO FERNANDES

Fundação Oswaldo Cruz – Rondônia – (FIOCRUZ)

---

Examinador -Prof. Dr. JOSE VITOR MOREIRA LIMA FILHO

Universidade Federal Rural de Pernambuco – (UFRPE)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me dar esta oportunidade e dom da vida e permitir a realização de um grande sonho que é concluir meu doutorado. Por estar comigo em todos os momentos e me fazer forte para ir tão longe mais do que eu pudesse imaginar e por me confortar nos momentos mais críticos desta caminhada.

Ao meu orientador, professor Dr. Márcio Viana Ramos - UFC, pela disponibilidade ao aceitar orientar-me, disponibilizar as proteínas do látex e contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional sendo referência de competência como pesquisador. Pela confiança depositada para desenvolver esse trabalho. Pela extrema paciência e compreensão ao conduzir as orientações e cobrar meus resultados no momento oportuno, discutindo e contribuindo com sua experiência científica para cada etapa desta tese. Pelas colaborações firmadas entre UFC-IFCE com novos projetos. Por abrir portas para que eu pudesse trabalhar com outros professores e pesquisadores no desenvolvimento desta tese.

À professora Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar - UFC, por ter aceitado participar da banca examinadora, por todo o apoio em ceder seu laboratório e recursos humanos (estudantes de iniciação científica, mestrado e de doutorado) para ajudar no desenvolvimento da tese. Todas as vezes que precisei estava sempre disponível para contribuir com alguma orientação construtiva e sempre me recebeu com muito carinho e um sorriso de confiança que tudo ia dar certo.

À professora Dra. Adriana Rocha Tomé - UECE, por sua grande colaboração nas análises histológicas. Pelas preciosas sugestões, por todos os bons momentos de conversa, risadas nas quais pode pacientemente tirar minhas dúvidas. E por sua grande generosidade e competência como profissional.

Ao professor Dr. Renato de Azevedo Moreira - UNIFOR, por ter aceitado colaborar neste projeto e disponibilizar seu laboratório e alunos para me auxiliar na elaboração dos hidrogéis. E disponibilizar o material vegetal utilizado neste trabalho.

Ao Professor Dr. José Vitor Moreira Lima Filho - UFRPE, por ter aceitado gentilmente o convite para participar da banca, e pelas valiosas contribuições para o final deste trabalho.

Ao Professor Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira - UECE, por ter aceitado gentilmente o convite para participar da banca, pelas valiosas contribuições deste o projeto de qualificação e para o final deste trabalho.

A Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes - FIOCRUZ, por ter aceitado tão prontamente o convite para participar desta banca, mesmo considerando todas as suas atribuições e pelas valiosas contribuições para o final deste trabalho.

A professora Dra. Dirce Fernandes de Melo - UFC, que me deu a oportunidade de desenvolver o mestrado na bioquímica e contribuir indiretamente para eu ter chegado aqui. Pela amizade, competência, conselhos, apoio, conhecimentos e oportunidades únicas de trabalhos que continuamos a desenvolver gerando bons frutos que só me fizeram crescer cientificamente.

À professora Dra. Diana Célia Nunes - UECE, pelas valiosas discussões e contribuições aos meus questionamentos.

À professora Dra. Érika Freitas Mota - UFC, pela amizade e valiosas sugestões sempre que precisei.

À minha querida amiga e generosa professora Dra. Maria Baccache Ary - UFC, por todo apoio e amizade deste que entrei na Bioquímica. Nestes 14 anos acompanhou minha trajetória desde a monitoria, mestrado e na seleção do doutorado, vibrando com cada conquista e sempre disposta a me ajudar.

Ao meu primeiro orientador no departamento de bioquímica, professor Dr. Fernando Monteiro de Paula (*in memoriam*) - UFC, pela grande oportunidade ao qual iniciei como monitória de bioquímica sob sua orientação desde 2003.

A minha grande e querida amiga, Tamiris de Fátima Goebel de Souza - UFC, por todos os ensinamentos, questionamentos, competência e apoio incondicional em todas as etapas dos experimentos com animais, sempre pronta a ajudar no que fosse preciso. Não tenho nem palavras para agradecer mas que dizer que não conseguiria chegar até aqui sem sua colaboração.

Aos colegas de pós-graduação, Felipe Domingos de Sousa e Rogênio Mendes – UFC/UNIFOR, pela competência e disponibilidade em acompanhar-me em todas as elaborações dos hidrogéis e trazerem sempre questionamentos pertinentes ao desenvolvimento do trabalho.

Aos estudantes do laboratório de Farmacologia do Núcleo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos (NPDM): Gisele e Yuri que sempre ajudaram com presteza e seriedade durante os experimentos. Aos técnicos, Patrícia,

Manuel Monteiro e demais colegas deste laboratório Marília e Luana, Patrícia e Daniele Shuh pela convivência amistosa.

Agradeço a minha amiga e Dra. Ingrid Samantha Tavares de Figueiredo, por suas valiosas contribuições ao longo do trabalho e por ter sido a ponte entre o Prof. Márcio e a Prof. Nylane com sua experiência com cicatrização para que eu pudesse escolher no momento certo o caminho para meu doutorado.

Aos estudantes do laboratório de Proteínas laticíferas da Bioquímica, pela maravilhosa convivência Daniel, Debora, Camila tauane, Mauro, Sandro Julyane, Zelândia, Wallace e especialmente Jackson e João Pedro na grande ajuda com as análises finais; Pedro Júnior pela grande ajuda cuidando dos animais e nos experimentos nos momentos mais críticos da minha gravidez; e Carol Viana pela força e apoio desde a qualificação até os momentos finais.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica pelos ensinamentos. Aos funcionários e técnicos do departamento pelas gentilezas e presteza na realização de suas tarefas.

As minhas grandes e queridas amigas de mestrado e doutorado Deborah Moura Rebouças e Camila Freitas Bezerra, por todas as conquistas na pós-graduação, pela amizade, conselhos, risadas e auxílio efetivo que foi de extrema importância nesta reta final.

Às minhas queridas amigas, Dra. Neuza Felix e Dra. Chistiane Coura que mesmo distante sempre estão torcendo por mim. Aos meus colegas de doutorado pela amistosa convivência.

Ao Diretor, colegas e alunos do meu local de trabalho, campus IFCE Baturité, pela compreensão e apoio nesta etapa tão importante do doutorado.

A toda a minha família, marido, pais, tios, irmãos e amigos que me apoiaram e compreenderam quão árduo é o caminho de um sonho e pelo apoio incondicional em ajudar com meus filhos, nos momentos mais importantes do doutorado. Ao meu amado esposo Francisco Araújo que foi meu braço direito sempre que precisei, inclusive nos experimentos. Especialmente agradeço e dedico esta Tese aos meus filhos Pedro David e Saulo Vítor, meus resultados mais consistentes que conquistei durante a pós-graduação, os quais consigo explicar e defender ser razão, mas com o coração. Pela espera ansiosa do término desta etapa.

A todos, muito obrigada!!!

## RESUMO

*Calotropis procera* (Ait.) R. Br. é bem conhecida por ser uma planta laticífera e por suas propriedades medicinais. Seu látex já vem sendo utilizado na medicina tradicional no tratamento de distúrbios da pele. Estudos científicos demonstram que proteínas laticíferas isoladas de *C. procera* possuem diversas propriedades farmacológicas sendo reportados seus efeitos anti-inflamatório, antisséptico, analgésico e cicatrizante de feridas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da fração proteica CpPII de *C. procera* na modulação do processo cicatricial em modelos experimentais de ferida. Para isso foi desenvolvido um hidrogel (Hg) utilizando hemiceluloses vegetais (galactomananas) a partir de *Caesalpinia pulcherrima*, como excipiente, e proteínas laticíferas (CpPII), ricas em enzimas proteolíticas como princípio ativo. Proteínas laticíferas com e sem iodoacetamida (IAA), foram incorporadas em diferentes concentrações (m/v) em hidrogel de galactomananas (Hemi), obtendo as formulações testadas: HgCpPII 0,2%, HgCpPII 0,5% e HgCpPII-IAA 0,2%. Foram utilizados camundongos *Swiss* machos para os testes *in vivo* (irritabilidade dérmica e de cicatrização) segundo procedimentos experimentais aprovados pelo comitê de ética institucional, sob o número 64/2014. As modificações teciduais e os mediadores-alvo da resposta cicatricial foram avaliados de acordo com parâmetros morfométricos, bioquímicos, imunológicos e histológicos em modelos de feridas excisionais (1cm<sup>2</sup>). Os resultados mostraram que as formulações de hidrogel apresentaram qualidade satisfatória após análise microbiológica, estabilidade ao armazenamento a 4 °C e biocompatibilidade dérmica. As feridas tratadas com a fração CpPII apresentaram modulação dos mediadores inflamatórios (MPO, NO, IL-1 $\beta$ , IL-6) e redução da peroxidação lipídica (MDA). O número de mastócitos degranulados nos animais tratados com CpPII aumentou significativamente no dia 14, sendo maior a degranulação no grupo tratado com HgCpPII 0,5% ( $p < 0,05$ ). Houve ainda intensa estimulação da fase inflamatória e proliferativa da cicatrização, através da ativação de fibroblastos e estimulação da deposição de colágeno, resultando em aumento significativo da taxa de contração e re-epitelização das feridas quando comparadas aos grupos controles ( $p < 0,05$ ). Ensaio com a fração CpPII inibida com iodoacetamida 20mM indicam que as propriedades farmacológicas do látex

não estão associadas somente à presença de proteínas com atividade proteolítica. O hidrogel HgCpPII não induziu irritação dérmica e estimulou eficientemente a cicatrização de feridas atuando nas diferentes fases do processo de cicatrização. As hemiceluloses, inicialmente propostas como veículo de liberação para as proteínas imunomoduladoras, estavam envolvidas, pelo menos em parte, na modulação do processo atuando possivelmente como antioxidantes. O estudo sugere uma nova aplicação para hemiceluloses vegetais como veículos utilizando proteínas imunomoduladoras do látex de *C. procera* como substâncias úteis no tratamento de feridas, porém, investigações adicionais são necessárias para prospecção mais profunda da composição ideal em termos de fixação e absorção na pele pela formulação proposta para ser testado em outros modelos de cicatrização de feridas.

**Palavras-chave:** *Calotropis procera*, galactomanana, inflamação, látex, protease.

## ABSTRACT

### Healing hydrogel based in natural hemicelluloses from *Caesalpinea pulcherrima* and laticifers proteins of *Calotropis procera*

*Calotropis procera* (Ait.) R. Br. is well known for being a laticifers plant and for its medicinal properties. Its latex has already been used in traditional medicine in the treatment of dermis disorders. Scientific studies have shown that laticifers proteins isolated from *C. procera* have several pharmacological properties and their anti-inflammatory, antiseptic, analgesic and wound healing effects are reported. The aim of this work was to evaluate the effect of the CpPII protein fraction of *C. procera* on cicatricial process modulation in experimental wound models. For this, a hydrogel (Hg) was developed using natural hemicelluloses (galactomannans) from *Caesalpinea pulcherrima*, as excipient, and laticifers proteins (CpPII), rich in proteolytic enzymes as active principle. In the present study, laticifers proteins containing proteolytic activity (CpPII) or inhibited with iodoacetamide (IAA) were incorporated at different concentrations (w/v) in galactomannan hydrogels (Hemi) to obtain the following formulations tested: HgCpPII 0.2%, HgCpPII 0.5% and HgCpPII-IAA 0.2%. Male Swiss mice were used for *in vivo* tests (wound healing and dermal irritability) according to experimental procedures approved by the institutional ethics committee under number 64/2014. Tissue modifications and target mediators of cicatricial response were evaluated according to morphometric, biochemical, immunological and histological parameters in excisional wound models (1cm<sup>2</sup>). The results showed that the hydrogel formulations presented satisfactory quality after microbiological analysis, storage stability at 4°C and dermal biocompatibility. Wounds treated with the CpPII fraction showed modulation of inflammatory mediators (MPO, NO, IL-1 $\beta$ , IL-6) and reduction of lipid peroxidation (MDA). The number of mast cells degranulated in the CpPII-treated animals increased significantly on day 14, and the mast cells degranulation in the group treated with 0.5% HgCpPII ( $p < 0.05$ ) was higher. There was also intense stimulation of the inflammatory and proliferative phase of healing process. Furthermore, fibroblasts activation and collagen deposition resulted in a significant increase in the rate of wound contraction as well as tissue re-epithelialization when

compared to control groups ( $p < 0.05$ ). Wound healing assays with the CpPII fraction inhibited by iodoacetamide (20mM) showed that the latex pharmacological properties were not only associated with the presence of proteolytic activity proteins. The HgCpPII hydrogel did not induce dermal irritation and efficiently stimulated wound healing by acting on the different phases of the healing process. Hemicelluloses, initially proposed as a delivery vehicle for immunomodulatory proteins, were involved, at least in part, in modulating the process possibly acting as antioxidants. This study suggests a new application for plant hemicelluloses as vehicles using *C. procera* latex immunomodulatory proteins as useful substances in the treatment of wounds. However, further investigations are required for deeper exploration of the optimal composition in terms of fixation and absorption in the skin by the proposed formulation to be tested in other wound healing models.

**Keywords:** *Calotropis procera*, galactomannan, inflammation, latex, protease.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Histologia da Pele .....	18
FIGURA 2 - Diferentes fases do processo da cicatrização de feridas .....	19
FIGURA 3 - Evolução da resposta cicatricial do tecido a nível histológico	20
FIGURA 4 - <i>Calotropis procera</i> (Ait.).....	20
FIGURA 5 - <i>Caesalpinia pulcherrima</i> .....	35
FIGURA 6 - Segmento de uma cadeia principal de galactomanana vegetal	36
FIGURA 7 – Fluxograma de Obtenção das proteínas solúveis do látex de <i>Calotropis procera</i> .....	46
FIGURA 8 - Fluxograma de Obtenção da fração CpPII das proteínas solúveis do látex de <i>Calotropis procera</i> .....	46
FIGURA 9 – Extração de hemiceluloses vegetais (galactomanana) de sementes de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> .....	50
FIGURA 10 - Fluxograma de elaboração dos hidrogéis (HgCpPII) contendo a fração CpPII das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> .....	49
FIGURA 11 - Análise da qualidade microbiológica dos hidrogéis .....	50
FIGURA 12 – Protocolo experimental I: Modelo de irritabilidade dermal ....	53
FIGURA 13 – Protocolo experimental II: Modelo de ferida excisional A.....	54
FIGURA 14 – Protocolo experimental III: Modelo de ferida excisional B.....	55
FIGURA 15 - Atividade proteolítica de hidrogéis em pH 5,0 e pH 6,0 .....	67
FIGURA 16 - Atividade proteolítica em hidrogéis armazenados em diferentes temperaturas por 30 dias.....	68
FIGURA 17 - Estabilidade a longo prazo do hidrogel (0,2%) armazenado a 4º C estimado pela perda da atividade proteolítica .....	69
FIGURA 18 - Atividade proteolítica das formulações testadas nos ensaios <i>in vivo</i> . .....	70
FIGURA 19 - Efeito do tratamento tópico com hidrogel de proteína laticíferas de <i>C. procera</i> (HgCpPII 0,2%) em modelos de irritação dermal..	72
FIGURA 20 - Aspecto macroscópico do progresso da cicatrização de feridas após tratamento com hidrogéis CpPII. ....	78
FIGURA 21 - Os hidrogéis foram eficientes para promover a contração da ferida. Infiltrado inflamatório intenso em biópsias de feridas tratadas com hidrogel contendo fração CpPII de proteínas laticíferas.....	83

<b>FIGURA 22 - Infiltrado inflamatório intenso em biópsias de feridas tratadas com hidrogel contendo fração CpPII de proteínas laticíferas .....</b>	<b>85</b>
<b>FIGURA 23 - Os hidrogéis de proteínas laticíferas estimulam a degranulação dos mastócitos. ....</b>	<b>86</b>
<b>FIGURA 24 - Os hidrogéis de proteínas laticíferas estimulam a fase proliferativa do processo de cicatrização. ....</b>	<b>87</b>
<b>FIGURA 25 - Representação histológica do processo de fibroplasia.....</b>	<b>88</b>
<b>FIGURA 26 - Os hidrogéis de proteínas laticíferas estimulam a colagênese. ....</b>	<b>89</b>
<b>FIGURA 27 - Representação histológica do processo de colagênese. ....</b>	<b>90</b>
<b>FIGURA 28 - Análises microscópicas de re-epitelização da ferida. ....</b>	<b>92</b>
<b>FIGURA 29 - Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas com H &amp; E, com ênfase na espessura do novo epitélio (NE). ....</b>	<b>93</b>
<b>FIGURA 30 - O hidrogel CpPII 0,2% aumenta a espessura do novo epitélio no modelo de feridas excisionais.....</b>	<b>94</b>
<b>FIGURA 31 - As hemiceluloses diminuem a atividade da enzima MPO.....</b>	<b>96</b>
<b>FIGURA 32 - As hemiceluloses diminuem os níveis de nitrito. ....</b>	<b>97</b>
<b>FIGURA 33 - Citocinas pró-inflamatórias medidas em feridas. ....</b>	<b>98</b>
<b>FIGURA 34 - Hemiceluloses e proteínas fitomoduladoras reduzem a peroxidação lipídica. ....</b>	<b>100</b>
<b>FIGURA 35 - Proteínas laticíferas de <i>C. procera</i> aceleraram eficientemente contração da ferida nos dias 2, 7, 12 e 14 após a cirurgia.....</b>	<b>105</b>
<b>FIGURA 36 - Proteínas laticíferas livres de hemiceluloses e em hidrogel com iodoacetamida 20 mM melhoram eficientemente a cicatrização.....</b>	<b>106</b>
<b>FIGURA 37 - As proteínas fitomoduladoras favoreceram a síntese do novo epitélio.....</b>	<b>108</b>
<b>FIGURA 38 – Ações do hidrogel de proteínas laticíferas de <i>C. procera</i> (CpPII) nas diferentes fases da cicatrização de feridas e seus mediadores-alvos. ....</b>	<b>122</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 - Resumo dos componentes envolvidos no processo cicatricial .....</b>	<b>25</b>
<b>TABELA 2 - Escores para avaliação semi-quantitativa de parâmetros relacionados à cicatrização de feridas a nível histológico.....</b>	<b>58</b>
<b>TABELA 3 - Avaliação microbiológica das formulações de hidrogel.....</b>	<b>66</b>
<b>TABELA 4 - Escores de Irritação dermal após aplicação tópica de hidrogéis de hemiceluloses e proteínas laticíferas .....</b>	<b>75</b>
<b>TABELA 5 - Hidrogel de proteínas laticíferas (HgCpPII) a 0,2 e 0,5% (m/v) não é irritante para aplicação dérmica .....</b>	<b>76</b>
<b>TABELA 6 - Avaliação semi-quantitativa de sinais flogísticos induzidos por hidrogel contendo proteínas laticíferas.....</b>	<b>80</b>
<b>TABELA 7 - Hidrogel de proteínas laticíferas (HgCpPII) a 0,2 e 0,5% (m/v) acelera a queda da crosta da ferida .....</b>	<b>82</b>
<b>TABELA 8 - Avaliação semi-quantitativa de cortes histológicos no dia 2 e 14 .....</b>	<b>84</b>
<b>TABELA 9 - Avaliação semi-quantitativa de sinais flogísticos induzidos por WCpPII 0,2% e HgCpPII-IAA 0,2% no dia 2.....</b>	<b>102</b>
<b>TABELA 10 - O tratamento com WCpPII 0,2% e HgCpPII-IAA 0,2% (m/v) de proteínas laticíferas aceleram a queda da crosta da ferida.....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$  – Micrograma

ANOVA - Análise de variância

E.P.M. - Erro padrão da média

EGF – Fator de crescimento epidérmico

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

h – Hora

Hemi - Hemiceluloses

H&E – Hematoxilina-eosina

$\text{H}_2\text{O}_2$ – Peróxido de hidrogênio

HgCpPII – Hidrogel de proteínas laticíferas

HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamonio

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

KCl – Cloreto de potássio

KGF – Fator de crescimento de queratinócitos

M – Molar

min – Minutos

mg - miligrama

mL - Mililitro

MPO – Mieloperoxidase

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo difosfato

$\text{NaNO}_2$  – nitrito de sódio

NO – Óxido nítrico

$\text{NO}^{2-}$  - Nitrito

$\text{NO}^{3-}$  - Nitrato

NOSi – NOS induzível

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PBS – Tampão de fosfato de potássio

p – Nível de significância

ROS – Espécies reativas de oxigênio

TGF- $\beta$  - Fator transformador de crescimento-beta

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>188</b>
1.1 Cicatrização de feridas .....	43
1.2 Mediadores que participam do processo de cicatrização .....	43
1.3 Proteases na modulação do processo cicatricial .....	26
1.4 Produtos naturais de origem vegetal para uso dérmico.....	26
1.5 <i>Calotropis procera</i> .....	30
1.6 Hemiceluloses e hidrogéis para cicatrização de feridas .....	34
1.7 Biocompatibilidade dérmica de biomateriais de origem vegetal .....	38
1.8 Controle de qualidade de formulações para uso tópico .....	39
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>41</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
3.1 Objetivo Geral.....	43
3.2 Objetivos Específicos .....	43
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
4.1 Materiais .....	44
4.1.1. Reagentes .....	44
4.1.2 Materiais vegetais.....	44
4.1.3 Animais.....	45
4.2. Métodos.....	45
4.3 Preparação do hidrogel .....	48
4.4 Caracterização microbiológica e físico-química dos hidrogéis .....	50
4.4.1. Análises microbiológicas .....	50
4.4.2. Avaliação da estabilidade.....	51
4.5. Modelo de irritação dermal.....	52
4.5.1. Pré-preparo dos animais para o teste de irritabilidade dérmica .....	52
4.5.2. Teste de irritação dose única e múltipla em pele íntegra e escarificada .....	52
4.5.3. Avaliação e classificação das reações cutâneas .....	53
4.6 Ensaio de cicatrização de feridas com hidrogéis .....	54
4.6.1 Análises macroscópicas .....	56
4.6.2 Análises microscópicas .....	57
4.6.2.1 Análise histológica e confecção das lâminas .....	57
4.6.2.2 Obtenção e análise das fotomicrografias .....	58
4.6.2.3 Avaliação de Edema e infiltrado de leucócitos.....	58
4.6.2.4 Avaliação de Fibroplasia .....	59

4.6.2.5 Avaliação da colagênese .....	59
4.6.2.6 Avaliação de mastócitos íntegros e degranulados.....	60
4.6.2.7 Avaliação da re-epitelização .....	60
4.7 Avaliação dos mediadores-alvos da resposta cicatricial.....	60
4.7.1 Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) .....	61
4.7.2 Determinação dos níveis de nitrito .....	61
4.7.3 Dosagens in situ de citocinas pró-inflamatórias ( IL- 1 $\beta$ e IL-6).....	62
4.7.4 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	63
4.8 Análise estatística.....	64
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
5.1 Caracterização microbiológica e físico-química (estabilidade) dos hidrogéis.....	65
5.1.1 Avaliação Microbiológica das formulações de hidrogel .....	65
5.1.2 Avaliação físico-química.....	66
5.1.2.1 Atividade proteolítica de proteínas laticíferas em hidrogel a pH 5.0 and pH 6.0. ....	67
5.1.2.2 Atividade proteolítica de hidrogel de proteínas laticífera de Calotropis procera sobre diferentes temperaturas de armazenamento .....	68
5.1.2.3 Estabilidade dos hidrogéis ao armazenamento a 4 <sup>o</sup> C por 365 dias .....	69
5.1.2.4 Atividade proteolítica das formulações testadas nos ensaios de in vivo. ....	70
5.2 Efeito do tratamento tópico com hidrogel HgCpPII 0,2% em teste de irritabilidade dermal em camundongos .....	71
5.2.1 Modelos de irritabilidade dermal em pele íntegra e escarificada.....	71
5.2.2 Escore de Irritabilidade dérmica após teste tópico com hidrogel HgCpPII 0,2%.....	74
5.2.3 Índice de Irritação Primária em teste de irritabilidade dérmica de hidrogéis .....	76
5.3 Efeito dos hidrogéis de proteínas laticíferas na cicatrização de feridas .....	71
5.3.1 Análise macroscópica.....	77
5.3.1.1. Aspectos macroscópicos de feridas excisionais sob o tratamento com hidrogéis contendo a fração protéica (CpPII) .....	77
5.3.1.2 O tratamento tópico com hidrogel CpPII influenciou os parâmetros de edema e hiperemia tecidual .....	79
5.3.1.3 O tratamento tópico com hidrogel CpPII acelerou a queda da crosta das feridas .....	81
5.3.1.4 O tratamento tópico com hidrogel CpPII promove a contração das feridas .....	82
5.3.2 Análise Microscópica.....	83
5.3.2.1 O tratamento tópico com hidrogéis CpPII aumenta a intensidade do infiltrado polimorfonuclear .....	83
5.3.2.2 O tratamento tópico com hidrogéis CpPII 0,2% e 0,5% estimulam a degranulação de mastócitos.....	86
5.3.2.3 O tratamento tópico com HgCpPII 0,2% estimula a fase proliferativa da cicatrização de feridas excisionais .....	87

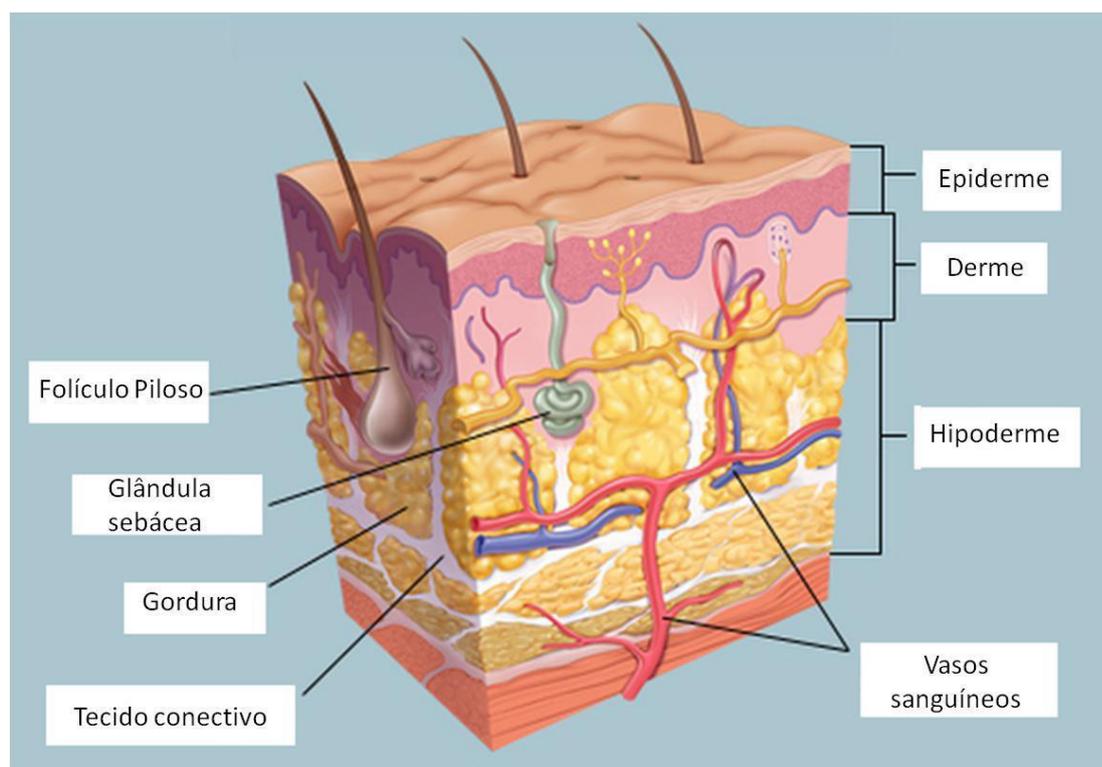
5.3.2.4 Os tratamentos tópicos com hidrogéis CpPII 0,2 e 0,5% intensificam a deposição de colágeno em feridas excisionais .....	88
5.3.2.5 O tratamento tópico com hidrogéis CpPII 0,2 e 0,5% estimulam o processo de re-epitelização em feridas excisionais .....	91
5.3.2.6 O tratamento tópico com HgCpPII 0,2% aumenta a espessura do novo epitélio em feridas excisionais .....	93
5.4 Efeito do tratamento com hidrogel HgCpPII 0,2% sobre os mediadores inflamatórios em feridas excisionais .....	95
5.4.1 O tratamento tópico com hidrogel de hemicelulose diminui a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) durante a fase inflamatória da cicatrização em feridas excisionais ....	95
5.4.2 O tratamento tópico com hidrogel modula os níveis de nitrito nas fases inflamatórias e proliferativas de feridas excisionais.....	97
5.4.3 O tratamento tópico com HgCpPII 0,2 % modula a liberação de citocinas .....	98
5.4.4 O tratamento tópico com hemiceluloses e proteínas fitomoduladoras reduzem a peroxidação lipídica.....	99
5.5 Proteínas laticíferas livres de hemiceluloses e em hidrogel contendo 20 mM de iodoacetamida promove eficientemente a cicatrização. ....	101
5.5.1. Aspectos macroscópicos de feridas excisionais sob o tratamento com hidrogéis contendo a fração protéica (CpPII): sinais flogísticos e queda da crosta .....	101
5.5.2. Aspectos macroscópicos de feridas excisionais sob o tratamento com hidrogéis contendo a fração protéica (CpPII): percentual de contração .....	104
5.5.3 As proteínas fitomoduladoras favoreceram a síntese do novo epitélio .....	107
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>109</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>123</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>124</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Cicatrização de feridas

A cicatrização de feridas é um dinâmico processo o qual envolve eventos celulares, fisiológicos, imunológicos e bioquímicos complexos com vistas a restauração da função e da continuidade anatômica do tecido (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2017; JORGE *et al.*, 2008). No processo de cicatrização humano, as curas morfológicas são aquelas realizadas na epiderme e derme e eventos dérmicos são infiltrado celular, formação de tecido de granulação e a produção de colágeno (JORGE *et al.*, 2008; WOOLF, 1998).

A Figura 1, apresenta a histologia da pele normal com suas várias camadas. Figura 1 - Histologia da pele.

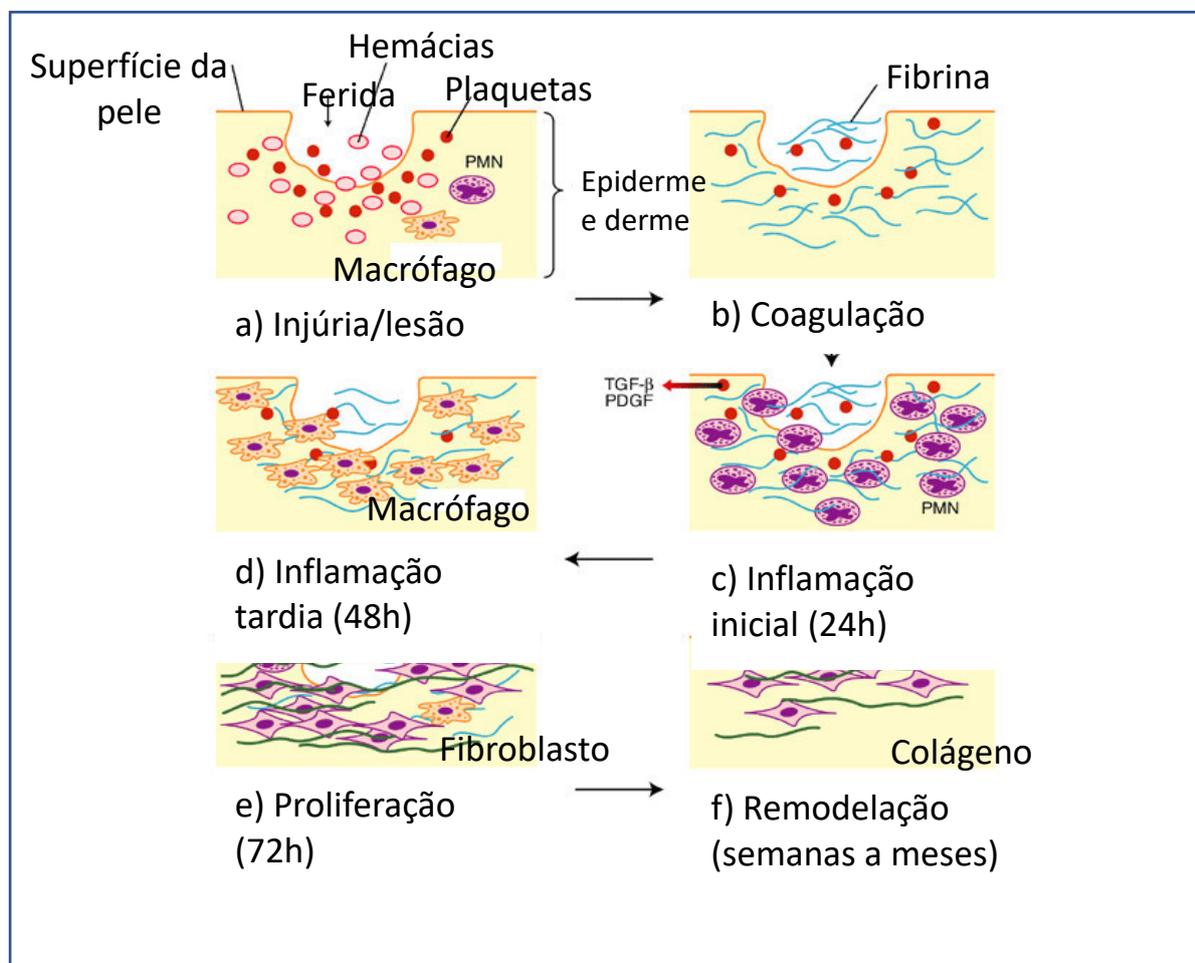


Fonte: <http://www.webmd.com/skin-problems-and-treatments/picture-of-the-skin#1>, (2017).

O processo de cicatrização pode ser dividido em quatro diferentes fases não excludentes entre si, mas superpostas: (a) início da lesão com extravasamento de hemácias (b) fase de hemostasia ou coagulação com agregação de plaquetas e deposição de fibrina a qual previne a perda de sangue,

(c) início da fase inflamatória e debridamento da ferida após 24h da injúria com liberação de fatores de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) com recrutamento de neutrófilos para a ferida, d) Após 48h há predomínio de macrófagos na fase tardia da inflamação (e) migração, reparo ou fase de proliferação é caracterizada pela proliferação celular de tecido de granulação formado e mantido por fibroblastos e o processo angiogênico, (f) maturação ou fase de remodelagem, que inclui remodelamento de tecido com suprimento, deposição e organização das fibras colágenas podendo durar de semanas a meses (JORGE *et al.*, 2008; KOKANE *et al.*, 2009). As fases acima estão representadas ilustrativamente na Figura 2.

Figura 2 - Diferentes fases do processo da cicatrização de feridas.



(a) Início da lesão; (b) fase de coagulação; (c) início da fase inflamatória após 24h da injúria; (d) Fase tardia da inflamação após 48h da injúria (e) Fase proliferativa com 72h após a injúria e (f); Fase de remodelagem ou maturação. Fonte: Experts Reviews in Molecular Medicine, 2003.

Especificamente cada fase do processo cicatricial envolve a ativação e sincronização de elementos intracelulares, intercelulares e extracelulares, incluindo eventos coagulatórios e inflamatórios, acúmulo de tecido fibroso, deposição de colágeno, epitelização, contração da ferida, granulação de tecido e remodelação (GHOSH; GABA, 2013).

A lesão de tecido inicia a resposta vascular da fase inflamatória que apresenta macroscopicamente eritema, edema e rubor como sinais flogísticos, sendo normalmente associada com dor. A hiperemia ou eritema contribui para o processo de angiogênese ou neovascularização, importantes na formação do tecido de granulação que preenche o leito da ferida (PORSAN et al., 2016 ; ROBINS; KUMAR; COTRAN, 2010). Fisiologicamente, a resposta vascular envolve ativação das plaquetas e um período breve e transitório de vasoconstrição e hemostasia. Um período de 5 a 10 min de vasoconstrição intensa é seguido de vasodilatação ativa acompanhada de um aumento na permeabilidade capilar (GURTNER *et al.*, 2008).

A fase proliferativa subsequente é dominada pela formação da granulação e epitelização do tecido, ou formação de tecido novo. Sua duração é dependente do tamanho da lesão, mas geralmente pode ocorrer de 2 a 10 dias. Esta é caracterizada por proliferação e migração de diferentes tipos celulares. A reepitelização é o recobrimento de uma lesão com novo epitélio e consiste de migração e proliferação de queratinócitos na periferia da lesão (RAPPOLEE *et al.*, 1988).

Após a migração de queratinócitos sobre a derme lesada, são formados novos vasos sanguíneos, e as novas ramificações capilares associadas com macrófagos e fibroblastos substituem a matriz de fibrina com tecido de granulação, formando um novo substrato para a migração de queratinócitos nos estágios finais da reparação tecidual. Os queratinócitos que estão abaixo da borda proliferam e maturam, e restauram a função de barreira do epitélio. Na fase mais tardia desta etapa, fibroblastos, os quais são atraídos da margem da lesão ou da medula são estimulados por macrófagos, e alguns diferenciam para miofibroblastos (OPALENIK; DAVIDSON, 2005).

A contração da lesão é importante ocorrer desde o início do processo de cicatrização, pois impede o sangramento e a possível contaminação por microorganismos (MEDHI et al., 2008). Os miofibroblastos são células contráteis

que, com o tempo, unem as bordas da lesão. A retração das bordas da ferida tem como a finalidade de diminuir a área de preenchimento pelo tecido cicatricial. Quanto maior a contração da ferida, menor a formação da cicatriz. Posteriormente, ao longo do processo de cicatrização, os miofibroblastos vão ser responsáveis pelo remodelamento da área cicatricial. Este tipo celular possui a dupla habilidade de sintetizar colágeno e tem atividade contrátil pela presença de actina, contribuindo para a contração da ferida (ROBINS; KUMAR; COTRAN, 2010).

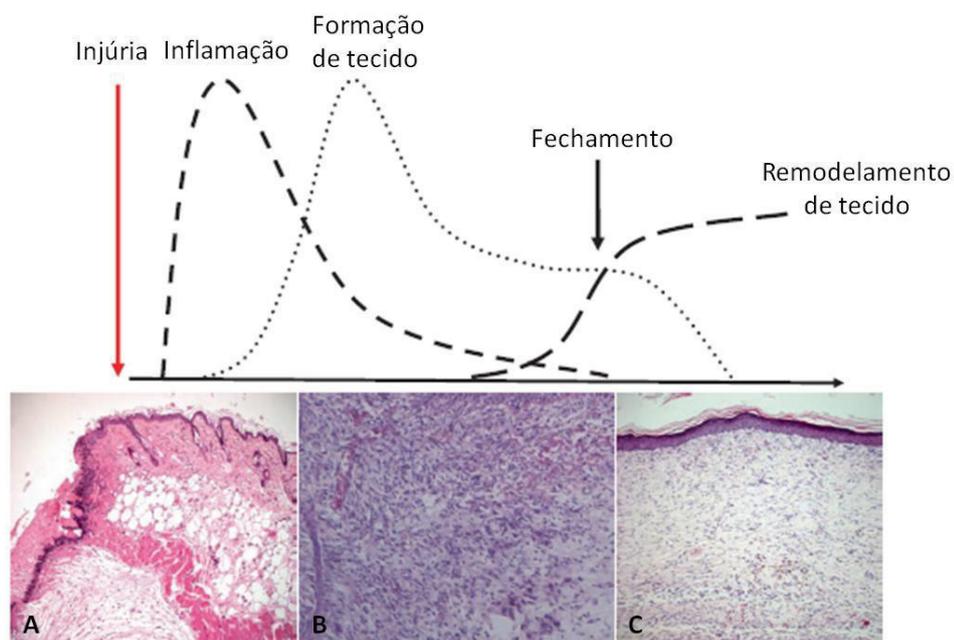
Fibroblastos e miofibroblastos interagem e produzem matriz extracelular (MEC), principalmente na forma de colágeno, o qual confere o volume para a cicatriz madura (STADELMANN *et al.*, 1998). A rede formada pela síntese de colágeno é responsável pela integridade vascular e resistência dos novos capilares (BLEE *et al.*, 2002). No início da fase proliferativa a atividade dos fibroblastos é limitada para a replicação e migração celular. Cerca do terceiro dia após a lesão a massa crescente de fibroblastos inicia a síntese e secreção de colágeno tipo III. A quantidade de colágeno secretada durante este período determina a força de tensão da cicatriz (WERNER; GROSE, 2003).

A fase final da cicatrização é de remodelagem, que se inicia em 2-3 semanas, e inclui reorganização das novas fibras de colágeno, formando uma estrutura que continua progressivamente a aumentar a força de tensão da lesão. O processo de remodelagem continua até dois anos, atingindo 40-70% da tensão de um tecido não lesado (STADELMANN *et al.*, 1998). Durante esta fase, todos os processos ativados após a lesão terminam.

A maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos sofrem apoptose ou saem da lesão, deixando uma massa que contém poucas células e constituída principalmente de colágeno e outras proteínas de matriz extracelular (SZABOWSKI *et al.*, 2000). Além disso, após 6-12 semanas, a matriz acelular é ativamente remodelada a partir do colágeno tipo III medular para um predominantemente composto por colágeno tipo I (LOVVORN *et al.*, 1999).

Na figura 3 é possível observar a nível histológico, os diferentes aspectos do tecido durante a resposta cicatricial à injúria.

Figura 3 - Evolução da resposta cicatricial do tecido em nível histológico



Fotomicrografias em Hematoxilina & Eosina de diferentes estágios cicatriciais: (A) Resposta a injúria e iniciação do reparo; (B) Remodelamento da MEC e aumento da instabilidade mecânica; (C) Angiogênese, fibroplasia e re-epitelização. Fonte: adaptado de EMING, (2010).

## 1.2 Mediadores que participam do processo de cicatrização

Componentes do sistema imune contribuem, direta e indiretamente no processo da cicatrização de lesões cutâneas, pois além de participar da função inflamatória e de defesa do hospedeiro, as células desse sistema liberam citocinas, linfocinas e fatores de crescimento indispensáveis pela continuidade do processo (PARK; BARBUL, 2004).

Organizando o estágio inicial em uma série de eventos ordenados, logo após a lesão, as plaquetas atuam como mediadores da cicatrização de forma agregada formam um coágulo de fibrina, secretam uma variedade de fatores de crescimento (EGF, PDGF), citocinas e matrizes extracelulares que levam ao reparo do tecido (GURTNER *et al.*, 2008 ; RAPPOLEE *et al.*, 1988).). Na superfície, o coágulo de fibrina começa a secar e formar uma crosta (FEESS, 2016). O entendimento básico de que as plaquetas e fibrinas produzidas a partir de fibrinogênio no local da ferida, desencadeia vários processos bioquímicos como angiogênese,

migração celular, fibroplasia e síntese de colágeno têm sido significativamente investigados (KNIGHTON *et al.*, 1982; GRELLING; CLARK, 1997; HOFFMAN; MONROE, 2007).

O aumento da permeabilidade vascular resulta em migração de neutrófilos e monócitos nos arredores do tecido que cessa após os primeiros dias pós-lesão, se não houver contaminação (STADELMANN *et al.*, 1998).

Os neutrófilos fagocitam os fragmentos e microorganismos, promovendo a primeira linha de defesa contra infecção (STADELMANN *et al.*, 1998). Essas células polimorfonucleares (PMC) possuem grânulos azurófilos que apresentam níveis elevados de mieloperoxidase (MPO), que juntamente com a NADPH oxidase está envolvida na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxidação de biomoléculas (ARNHOLD, 2004). NADPH oxidase é um complexo enzimático de membrana, que catalisa a redução monovalente do oxigênio molecular ( $O_2$ ) a ânion superóxido ( $O_2^-$ ). MPO, por sua vez, catalisa a reação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) com íons cloreto ( $Cl^-$ ), formando o ácido hipocloroso (HClO), outro potente agente oxidante (CAPELLÈIRE-BLANDIN, 1998).

Na fase inflamatória tardia, depois de 2-3 dias, monócitos aparecem na lesão e são diferenciados em macrófagos, e atuam digerindo e matando patógenos, seqüestrando restos de tecido e destruindo neutrófilos remanescentes. Macrófagos ou células mononucleares (MNC) iniciam a transição da inflamação para o reparo secretando uma variedade de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-1, 2, 6 e 8), fatores quimiotáticos e de crescimento (FGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) que estimulam migração celular, proliferação e formação da matriz extracelular (GURTNER *et al.*, 2008). Se essa fase aguda da inflamação persistir devido à hipóxia da lesão, infecção, deficiência nutricional, medicação utilizada, ou outros fatores relacionados a resposta imune do paciente, pode interferir com as fases seguintes (STADELMANN *et al.*, 1998).

Durante processos inflamatórios, os fagócitos (PMC e MNC) são ativados e elevam sensivelmente sua taxa de consumo de oxigênio, ocorrendo o aumento da demanda respiratória. Isso leva à produção e liberação de enzimas, radicais livres e espécies reativas de oxigênio, amplificando a lesão celular e endotelial (VELLOSA *et al.*, 2007). Os radicais livres são produtos do metabolismo celular de organismos aeróbios gerados durante o processo respiratório celular. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, que resulta na indução

de danos celulares pelos radicais livres, é denominado de estresse oxidativo. Este processo gera danos a lipídios, podendo induzir peroxidação dos lipídios de membranas biológicas, além de alterar proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, induzindo morte celular (LEITE; SARNI, 2003).

Os fagócitos quando ativados também produzem a isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS), que é responsável pela geração do óxido nítrico (NO), importante mediador do processo inflamatório (BABIOR, 2000). NO é uma espécie reativa de nitrogênio que, em meio aquoso, reage com o oxigênio para formar outra espécie reativa, o peróxinitrito ( $\text{OONO}^\cdot$ ), potente agente oxidante (MACMICKING *et al.*, 1997). Durante o processo de cicatrização, NO influencia a função dos macrófagos, fibroblastos e queratinócitos, contribuindo para reepitelização (WITTE; BARBUL, 2002).

Os mastócitos são células do sistema imune inato que liberam vários mediadores pré-formados (histamina, proteases e citocinas) em seus grânulos após a lesão. Ao investigar a fase aguda da cicatrização em camundongos deficientes de mastócitos, observou-se que o número de neutrófilos na ferida destes animais estava reduzido enquanto o número de macrófagos foi similar quando comparados ao controle. Esses dados sugerem que os mastócitos podem ser reguladores críticos da infiltração de neutrófilos (EGOZI *et al.*, 2003; WELLER *et al.*, 2006). Os mastócitos também estão envolvidos nas fases mais tardias da cicatrização através da remodelação do colágeno (YOUNAN *et al.*, 2011). Além disso essas células têm sido implicadas na formação de cicatrizes hipertróficas (WULFF *et al.*, 2012). Juntos, estes achados sugerem que os mastócitos possuem importante papel na diminuição de cicatrizes. Estudos em modelos animais mostraram que a inibição da degranulação ou o bloqueio da atividade da protease em mastócitos podem reduzir a produção de tecido cicatricial.

IL-6 é uma citocina potente em estimular a proliferação de fibroblastos e parece exercer dupla função como pró- e anti-inflamatória atuando principalmente na angiogênese, expressão e deposição de colágeno e epitelização. IL-1 $\beta$  desempenha um papel imunomodulador local e sistêmico, extremamente importante na coordenação de eventos celulares da cicatrização de feridas e atua na quimiotaxia de fibroblastos e queratinócitos além de contribuir para a síntese de colágeno (SADAVA *et al.*, 2014).

Na Tabela 1, estão listadas as funções de alguns dos principais componentes que estão envolvidos nas fases iniciais e tardias durante o reparo tecidual.

Tabela 1 - Resumo da ação de componentes envolvidos no processo cicatricial

COMPONENTES DO REPARO	SUBSTÂNCIAS LIBERADAS	AÇÃO NO PROCESSO CICATRICIAL	REFERÊNCIAS
Plaquetas	Fatores de crescimento (EGF, PDGF) Citocinas Matriz Extracelular	Angiogênese ; Migração celular ; Fibroplasia ; Síntese de colágeno	KNIGHTON <i>et al.</i> , 1982; GRELLING; CLARK, 1997; HOFFMAN; MONROE, 2007
Neutrófilos	Mieloperoxidase e NADPH oxidase	1ª linha de defesa contra infecção ; Geração de espécies reativas de oxigênio	STADELMANN <i>et al.</i> , 1998; ARNHOLD, 2004 ; CAPELLÈIRE-BLANDIN, 1998
Macrófagos	Enzimas e citocinas (IFN- $\gamma$ , IL- 1,2,6 e 8) Radicais livres e espécies reativas de oxigênio Fatores quimiotáticos e de crescimento (FGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) Geração do óxido nítrico	Iniciam a transição da inflamação para o reparo ; Ativam macrófagos, fibroblastos e queratinócitos ; Reepitelização	GURTNER <i>et al.</i> , 2008 ; STADELMANN <i>et al.</i> , 1998 ; VELLOSA <i>et al.</i> , 2007 ; BABIOR, 2000; WITTE; BARBUL, 2002
Mastócitos	Liberam vários mediadores pré-formados como histamina, proteases e citocinas	Reguladores críticos da infiltração de neutrófilos ; Remodelação do colágeno	EGOZI <i>et al.</i> , 2003; WELLER <i>et al.</i> , 2006 ; YOUNAN <i>et al.</i> , 2011; BROUGHTON <i>et al.</i> , 2006
IL-6	Liberado por macrófagos, mastócitos, queratinócitos Dupla função (pró- e anti-inflamatória)	Proliferação de fibroblastos; Angiogênese, expressão e deposição de colágeno e epitelização	SADAVA <i>et al.</i> , 2014; BROUGHTON <i>et al.</i> , 2006
IL-1 $\beta$	Liberado por macrófagos, mastócitos, queratinócitos Imunomodulador local e sistêmico	Quimiotaxia de fibroblastos e queratinócitos; Síntese de colágeno	SADAVA <i>et al.</i> , 2014 ; BROUGHTON <i>et al.</i> , 2006

EGF, fator de crescimento epidérmico; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ; FGF, fator de crescimento de fibroblastos; IFN-  $\alpha$ , interferon alfa; IL, interleucina; TGF-  $\beta$ , fator de crescimento transformante beta; TNF, fator de necrose tumoral. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

### 1.3 Proteases na modulação do processo cicatricial

O reparo completo de tecidos envolve reações catabólicas de degradação de tecidos pela produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e também reações anabólicas de formação de tecidos pela produção de fatores de crescimento (RICHES, 1996), responsáveis pela recomposição da celularidade regional ou restabelecimento da sua homeostasia pela formação da cicatriz (CURI *et al*, 2005).

Nas fases iniciais e durante os estágios tardios do processo de cicatrização tecidual de feridas há a participação de um grupo de enzimas proteolíticas, as quais são proteases endógenas liberadas na matriz extracelular, denominadas de metaloproteinases. Estas enzimas remodeladoras da matriz são secretadas por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, realizando o debridamento do tecido necrótico e contribuindo inicialmente para redução da força tênsil (LEVENSON *et al.*, 1965) do tecido em cicatrização que posteriormente será aumentada com a proliferação de uma nova matriz extracelular composta de proteínas estruturais, especificamente colágeno do tipo I (LEE; KIM; LEE, 2015).

A presença de tecido necrótico ou material estranho em uma ferida aumenta o risco de infecção e sepse, além de prolongar a fase inflamatória, que inibe a cicatrização de feridas. Assim, quando aplicável, é importante remover o tecido necrótico ou material estranho de áreas ao redor da ferida seja com auxílio de bisturi/tesoura; hidratação de feridas e remoção autolítica do tecido necrótico; e ou remoção enzimática proteolítica usando colagenase bacteriana, papaína, fibrinolisin/DNAse, tripsina, estreptocinase-estreptodornase e subtilisina (GHADI *et al.* 2016).

A aplicação de substância exógena à lesão pode ser uma estratégia para minimizar os danos no tecido, propiciando uma adequada perfusão e oxigenação tecidual, promovendo um ambiente úmido, com mínimo de dor, desconforto e cicatriz para o organismo contribuindo assim, para restaurar a continuidade anatômica e função da parte afetada no menor tempo possível (PIERCE *et al*, 1992).

Atualmente, a modulação de proteases da matrix extracelular já vem sendo utilizada como estratégia para melhorar a performance do processo de cicatrização em feridas agudas e crônicas (WESTBY *et al.*, 2016).

O uso tópico de proteases exógenas na forma de pó ou gel como a enzima papaína do mamão e a enzima colagenase derivada de *Clostridium histolyticum* são agentes debridantes no tratamento de feridas, promovendo uma cicatriz mais plana, devido ao estímulo no alinhamento das fibras colágenas (MAMBOYA, 2012 ; SANCHEZ NETO *et al.*, 1993). O debridamento enzimático consiste na aplicação tópica da preparação de protease que atua sobre a fibrina e o colágeno do tecido necrótico (DOGRA; REENA, 2014).

As proteases e seus inibidores contribuem para a degradação e deposição da matriz extracelular, criando um equilíbrio que é essencial para a adequada e coordenada cicatrização de feridas cutâneas. Contudo, quando este equilíbrio é interrompido, as feridas são levadas a um estado de cronicidade caracterizado por níveis abundantes de proteases e níveis diminuídos de inibidores de protease (MCCARTY; PERCIVAL, 2013). O aumento normal na expressão de metaloproteinases de matriz 9 (MM9) foi observado no início da fase aguda da cicatrização de feridas, mas tendem a retornar a níveis basais com a resolução do processo cicatricial. No entanto, se houver uma excessiva produção de proteases no leito da ferida, isto poderá levar a desordem na cicatrização (REISS *et al.*, 2010).

Leite *et al.*, (2012), utilizaram duas concentrações de papaína em gel (2% e 4% m/v) para avaliar clinicamente os efeitos do seu uso em úlceras de perna maiores que 2 cm<sup>2</sup>, de origem venosa ou diabética. Os autores recomendaram o uso da papaína em diferentes concentrações de acordo com o estágio da cicatrização, e conforme o tipo de tecido presente na ferida.

A papaína em gel foi estudada em modelo de ferida crônica. Cães com feridas necróticas infectadas foram tratados com diferentes concentrações da enzima proteolítica (5% e 3% m/v) as quais mostraram efetividade na cicatrização especialmente no debridamento químico e remoção de tecido necrótico quando aplicada em altas concentrações, e facilitou a cicatrização promovendo a formação de tecido de granulação em menores concentrações (PORSAN *et al.*, 2016). Os autores ressaltam que a redução na concentração de enzima proteolítica é necessária em feridas que não têm material necrótico e não requerem a formação de uma grande quantidade de tecido de granulação. Feridas estagnadas no caso de pacientes diabéticos apresentando tecidos desvitalizados e restrita vascularização, seria uma abordagem interessante o uso de uma maior

concentração de protease que estimule a fase inflamatória, além de promover o debridamento do tecido (LEITE *et al.*, 2012).

Assim, as evidências científicas indicam que para ter efetividade no processo de cicatrização uma concentração adequada de enzimas proteolíticas deve ser estabelecida de acordo com as características macroscópicas de cada ferida (MONETTA, 1987; ROCHA *et al.*, 2005).

#### **1.4 Produtos naturais de origem vegetal para uso dérmico**

O termo “natural” é uma substância produzida ou encontrada pela natureza que é diretamente extraída de fontes vegetais distintas como ervas, frutas, flores, folhas, látex dentre outras partes das plantas e também em animais. O efeito desses ingredientes naturais nos produtos para cuidados com a pele, depende da sua eficácia *in vitro* e *in vivo* e o tipo de veículo dermatológico ao qual eles são incorporados (FOWLER *et al.*, 2010).

Produtos naturais oriundos especificamente de plantas por possuírem propriedades medicinais são prospectivas fontes de novas drogas (SEO *et al.*, 2008). A presença de vários constituintes bioativos nas plantas tem incitado os cientistas a examinar essas fontes naturais buscando determinar o potencial das propriedades cicatrizantes (HOSSEINKHANI *et al.*, 2016).

O interesse por medicamentos de origem vegetal para uso dérmico, ganhou atenção também pelos laboratórios fitofarmacêuticos que concentram seus esforços em identificar os constituintes ativos e mecanismos de ação de várias plantas medicinais por terem baixa toxicidade, possuírem origem natural e serem usadas há muito tempo na medicina popular (ZHOU *et al.*, 2004).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 80% da população mundial ainda depende de remédios a base de plantas para o tratamento de doenças (BRUNNING; MORSEGUI; VIANNA, 2012). Pesquisas visando a identificação de plantas regionais com finalidades terapêuticas, que possuam comprovada ação farmacológica e/ou substâncias biologicamente ativas são necessárias para que seja possível a recomendação segura e utilização de tais plantas no sistema de saúde vigente (DUTRA, 2009).

Assim, se faz necessário pesquisar o uso popular de espécies potencialmente importantes para uso dérmico (SCHEFFER *et al.*, 1999).

Destaca-se que a pesquisa de produtos naturais tem-se intensificado para auxiliar no tratamento de feridas através da identificação de substâncias, isolamento, quantificação e investigação da atividades biológica, como é o caso do óleo de capivara (MARINHO; NETO-FERREIRA; CARVALHO, 2013), o uso da enzima papaína extraída do mamão (SANCHEZ NETO *et al.*, 1993), proteínas extraídas do látex da seringueira *Hevea brasiliense* (FRADE *et al.*, 2006) dentre o estudo com outras plantas medicinais (BAHRAMSOLTANI *et al.*, 2014).

Muitos outros compostos fitoquímicos derivados de plantas com altos níveis de propriedades cicatrizantes de feridas, também vem sendo isolados e usados para o design de formulações tópicas e curativos de feridas. Esses compostos pertencem a famílias dos alcalóides, óleos essenciais, flavonóides, taninos, terpenóides, saponinas e fenólicos (THANGAPAZHAM; SHARAD; MAHESHWARI, 2016). No entanto, há ainda uma falta de relatórios sobre o nível de dosagem, efeitos toxicológicos e adversos destes compostos. A partir de então, um protocolo padronizado e ensaios clínicos devem ser seguidos para fornecer evidências mais sólidas, apoiar o uso de compostos farmacologicamente ativos derivados de plantas no tratamento e gerenciamento de feridas (REX; MSA MUTHUKUMAR; PAULRAJ., 2018).

Esses agentes naturais induzem cicatrização e regeneração do tecido perdido por vários mecanismos devido sua natureza química atuando como antioxidante, antibacteriano, antiinflamatório, além da atividade cicatrizante de feridas (THAKUR *et al.*, 2011; HALLIWEL, 1995). Vários relatórios farmacológicos estão disponíveis em algumas espécies de plantas para a validação de uso tradicional e desenvolvimento seguro e eficaz e medicamentos fitoterápicos mundialmente aceitos para feridas (THAKUR *et al.*, 2011).

### 1.5 *Calotropis procera*

*Calotropis procera* (Ait.) R. Br. é uma planta laticífera pertencente a sub-família Asclepiadaceae da família Apocynaceae. É um género de cerca de seis espécies de arbustos ou árvores pequenas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da Ásia e África. *C. procera* é nativa da África Ocidental até o sul de Angola, África do Norte e Oriente, e atualmente a espécie encontra-se presente na Austrália, ilhas do Pacífico e do Caribe, México, América Central e do Sul (PARIHAR; BALEKAR, 2016). A espécie representada na figura 4, possui vários nomes populares de acordo com a região onde se encontra no Brasil: ciúme e hortência (CE), algodão-de-seda e seda (PE), flor-de-seda, paininha-de-seda (SP) e leiteiro (SP, MG) (KISMANN; GROTH, 1999).

Figura 4: *Calotropis procera* (Ait.).



(A) planta; (B) folhas e flores; (C) caule da planta e exsudação do látex. Fonte: KHAIRNAR *et al.*, (2012); CHAUDHARY *et al.*, (2017); SUDESH., (2012).

*C. procera* é bem conhecida por ser uma planta tóxica e por suas propriedades medicinais. Várias partes da planta são utilizadas em vários sistemas de medicina tradicional em todo o mundo. A raiz, casca, folhas e seu látex são usados para fins medicinais nas regiões mais pobres da Índia e da África, bem como no Brasil em menor grau (KUMAR; ARYA, 2006).

O látex ou seiva leitosa obtida das partes aéreas da planta *C. procera*, tem sido eficaz no tratamento de diversas desordens da derme como lepra, eczema, infecções cutâneas, malária, e picadas de cobra (KUMAR; BASU, 1994; RAHMAN; WILCOCK, 1991).

Um vasto número de pesquisas e artigos de revisão apresentam as propriedades fitoquímicas de *C. procera* (BRUNO-MORENO *et al.*, 2013; EDMAN, 1983; PARIHAR e BALEKAR, 2016) além de determinar sua natureza ácida e presença de 14,8% de teor de sólidos (SHUKLA; KRISHNAMURTI, 1961). Dentre os constituintes químicos da planta inteira foram relatados a presença de alcalóides, esteróis, flavonóides, glicosídeos, triterpenóides (EDMAN, 1983). Estudos apontam que todas as partes da planta tem um potencial tóxico, devido a presença de cardenólídeos sendo considerados glicosídeos cardíacos (PARIHAR; BALEKAR, 2016). Particularmente, o látex de *C. procera* é composto de uma mistura complexa de metabólitos secundários e proteínas, presente no citoplasma de células altamente especializadas denominadas laticíferos (BRUNO-MORENO *et al.*, 2013).

Utilizando o látex na sua forma natural, baseado no uso tradicional, a primeira demonstração científica das propriedades estimuladoras da cicatrização de feridas por látex *C. procera* surgiu na Índia em 1999 (RASIK *et al.*, 1999). Porcos da guiné foram avaliados durante 7 dias após aplicação tópica diária de 20 µl de solução estéril contendo 1.0% do látex da planta usando propilenoglicol como veículo. O tratamento aumentou significativamente o processo de cicatrização através do aumento do colágeno, síntese de DNA e reepitelização, levando à redução da área da ferida. Assim este resultado prevê um suporte racional científico para o estudo desta planta na modulação da cicatrização.

Seguindo as várias reivindicações tradicionais sobre o uso de *Calotropis procera* na cura de doenças, esforços consideráveis foram feitos pelos pesquisadores para verificar sua utilidade através de estudos farmacológicos científicos utilizando as proteínas laticíferas (GUPTA *et al.*, 2012). Estudos em

animais com proteínas do látex de *C.procera*, demonstraram diversas atividades biológicas como potenciais agentes anti-inflamatórios, antisséptico e cicatrizante de ferida além de efeitos analgésicos (KHAIRNAR; BHAMARE, 2012).

Atualmente, uma grande rede de grupos de pesquisadores de laboratórios de diferentes instituições de ensino e pesquisa nacionais e internacionais atuam de forma colaborativa estudando moléculas de fluidos laticíferos em termos moleculares, funcionais e aplicados em agricultura e saúde. Tais pesquisas em rede tem contribuído com relevantes publicações na área de Biotecnologia Molecular de Látex Vegetal incluindo o estudo de proteínas vegetais extraídas do látex de *C. Procera* pelo grupo de pesquisadores cearenses dos laboratórios de Plantas Laticíferas e Laboratório de Biotecnologia de Proteases Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC) coordenados respectivamente pelo Dr. Márcio Viana Ramos e Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas. Desta forma, propriedades biológicas já foram detectadas avaliando a fração protéica de proteínas do látex (LP) isoladas de *Calotropis procera*. A atividade anti-inflamatória de proteínas de látex tem sido bem documentada usando diferentes modelos inflamatórios (ALENCAR *et al.*, 2004; CHAUDHARY *et al.*, 2016; FREITAS *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2015; RAMOS *et al.*, 2009b). Também foi demonstrado investigando LP e suas sub-frações protéicas, as propriedades pró-inflamatórias e antibióticas (ALENCAR *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2012), ação imunoestimulantes, imunomoduladora (FREITAS *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2016) e potencial alergênico (RAMOS *et al.*, 2007).

Outros estudos com as proteínas do látex reportaram propriedades preventivas de choque séptico (LIMA-FILHO *et al.*, 2010), ação antioxidante (KUMAR *et al.*, 2015), propriedades anti-tumorigênicas e de citotoxicidade seletiva (OLIVEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010), ação anti-nociceptiva (RAMOS *et al.*, 2005) e anti-convulsivante (LIMA *et al.*, 2010), além de efeitos no sistema nervoso central (LIMA *et al.*, 2012). Recentemente, nosso grupo de pesquisa estudou várias atividades biológicas das proteínas solúveis extraídas do latex de *Calotropis procera* as quais demonstraram adicionalmente aliviar a artrite; minimizar o estresse oxidativo (CHAUDHARY *et al.* 2016; CHAUDARY *et al.*,

2015) e evitar a mucosite oral e intestinal induzida por quimioterápicos (FREITAS *et al.*, 2012; ALENCAR *et al.* 2017).

Dentre as biomoléculas presentes no látex de *C. procera* encontram-se proteínas que são de natureza básica com forte atividade anti-oxidante (superóxido-dismutase e ascorbato peroxidase) e proteolítica (proteases cisteínicas), quitinases e a osmotina (CpOsm). Após fracionamento do látex e obtenção de 3 frações proteicas denominadas por nosso grupo de pesquisa PI, PII e PIII, a osmotina, uma proteína de 22 kDa foi purificada, estando presente na fração protéica PII do látex de *C. procera* CpPII (também chamada de LP<sub>PII</sub>) na qual também foi detectada a presença de proteínas com atividade proteolítica como as proteases (FREITAS *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2011). Ademais, no látex de *C. procera* foram identificadas e caracterizadas recentemente, duas proteínas do tipo germinas ou “germin-like proteins” (GLPs) também encontrada em alguns cereais como o trigo, porém, apresentando atividade enzimática de oxalato oxidases (FREITAS *et al.*, 2017).

Estudos de imunomodulação com algumas frações protéicas como a PI obtida de proteínas solúveis totais do látex de *C. procera* (LP<sub>PI</sub>) foram previamente investigadas. A sub-fração protéica de alto peso molecular, LP<sub>PI</sub>, aumentou a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  comparada aos grupos controles contra infecção experimental por *Listeria monocytogenes*. Em ensaios *in vivo*, houve maior migração de leucócitos em camundongos tratados com LP<sub>PI</sub>, após 24 h de infecção. Esse grupo também apresentou número reduzido de bactérias viáveis nos fluidos peritoneal e sanguíneo bem como no fígado. Esta atividade foi associada a presença de proteínas quitinases (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A fração LP<sub>PI</sub> também demonstrou efeitos anti-inflamatórios dose-dependente em um modelo pré-clínico de artrite utilizando diclofenaco como controle positivo. Houve melhora da inflamação articular e hiperalgesia com redução do influxo de neutrófilos e edema na articulação artrítica além de normalização dos níveis de marcadores de estresse oxidativo (CHAUDHARY *et al.*, 2016).

Ressalta-se a importância de 3 estudos do grupo de pesquisadores cearenses para o entendimento do papel das proteínas do látex no tratamento das doenças dérmicas, como a capacidade de manter a homeostase da coagulação em camundongos (RAMOS *et al.*, 2012) e efeitos cicatrizantes de feridas utilizando LP associado a uma biomembrana sintética (RAMOS *et al.*, 2016; FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

Nestes dois últimos estudos, utilizando modelos de feridas incisionais e excisionais, quando essas proteínas (LP) foram incorporadas em uma biomembrana de álcool polivinil, aceleraram o processo de cicatrização. Foram observadas intensa migração de neutrófilos, degranulação de mastócitos, aumento na atividade da mieloperoxidase e de óxido nítrico. Os autores sugeriram que os mecanismos subjacentes pelos quais as proteínas totais do látex em biomembrana, aceleraram a cicatrização envolveram a modulação de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-1 $\beta$  (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2016).

## **1.6 Hemiceluloses e hidrogéis para cicatrização de feridas**

Hemiceluloses são polissacarídeos presentes na parede celular de vegetais funcionando como polissacarídeos de reserva. Recebem essa denominação por apresentarem comportamento semelhante à celulose, dando elasticidade ao tecido formado (KLEMM *et al.*, 2005).

*Caesalpinia pulcherrima* (Fabaceae), é uma planta leguminosa nativa do nordeste do Brasil (Figura 5). Esta espécie é uma fonte alternativa de hemiceluloses, que são extraídas de suas sementes e vêm sendo utilizadas como ingredientes de alimentos e fármacos por possuírem propriedades como alta viscosidade, tolerância ao pH e adesividade (BURITI *et al.*, 2014; JEEVANNANDHAM *et al.*, 2011; SILVA, 2005).

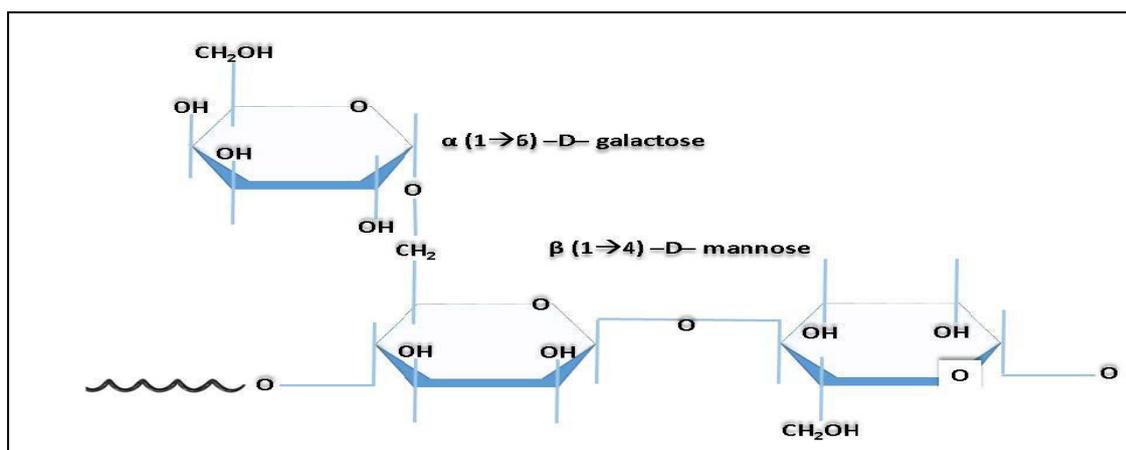
Figura 5: *Caesalpinia pulcherrima*



Planta (A); flores (B); caule da planta, flores e sementes (C). Fonte: <http://www.ehorticulture.com/tree-plants-seeds/ornamental-shrubs/caesalpinia-pulcherrima-detail.html>, (2017).

Galactomananas são exemplos de hemiceluloses obtidas do endosperma de sementes *C. Pulquerima* (ANDRADE *et al.*, 1999). Esses polissacarídeos caracterizam-se por serem neutros. A cadeia principal é composta por unidades de (1 → 4) - $\beta$ -D-manose (M) com diferentes graus de substituição em O-6 com unidades  $\alpha$ -D-galactopiranosil (G). Sua estrutura química está representada na figura 6 (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016).

Figura 6. Segmento de uma cadeia principal de galactomanana vegetal.



Fonte: Albuquerque *et al.*, 2016.

As galactomananas são considerados hidrocolóides altamente solúveis em água, produzindo soluções aquosas altamente viscosas e estáveis, além disso, a sua solubilidade depende da composição (ou razão M/G) e da distribuição de unidades de galactose ao longo da cadeia principal de manana: quanto maior o teor de galactose, maior a solubilidade na água (THOMBRE; GIDE, 2013; RINAUDO, 2008).

A utilização de biomateriais poliméricos na forma de hidrogéis para tratar feridas tem aumentado ultimamente (LI *et al.*, 2017). Existe uma grande variedade de hidrogéis naturais e ou sintéticos em termos de composição; eles consistem em carboximetilcelulose (CMC), poliuretano, poliacrilamida, ágar, quitosana e polivinil-pirrolidona (PVP), assim como derivados de ácido hialurônico (HA) com ou sem alginatos. Ambos os polímeros sintéticos e biopolímeros são facilmente processados a forma desejada e design e estabilizado usando diferentes técnicas para prolongar sua validade. Além disso, curativos à base de hidrogel feitos de diferentes polímeros podem ser usado como carreadores de drogas (MOGOSANU; GRUMEZESCU, 2014).

Atualmente existe no mercado um hidrogel usado clinicamente para tratar feridas (Purilon Gel®), à base de alginato de cálcio que possui além de sódio, carboximetilcelulose, sendo constituído de mais de 90% de água. O Purilon Gel® é indicado para feridas necróticas secas e escuras, bem como feridas com uma mistura de tecido necrótico e granuloso, como úlceras de perna, úlceras de pressão, úlceras de pé diabético não infectadas e queimaduras de primeiro e segundo grau. Pode ser usado em todo o processo de cura para fornecer um ambiente de cura úmido (GHADI *et al.*, 2016).

Entretanto, de acordo com Caló e Khutoryansky (2015), alguns polissacarídeos oriundos de fontes naturais são amplamente utilizados para o tratamento de feridas quando administrado sob a forma de hidrogéis: neutro (celulose, dextrano,  $\beta$ -glucano), ácido (ácido algínico, HA), básicos (quitina, quitosana) ou polissacarídeos sulfatados (sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, heparina, sulfato de queratano). Neste contexto, os hidrogéis à base de polissacarídeos têm surgido como formulações interessantes para diversas aplicações por suas características físico-químicas (SANTOS *et al.*, 2015; THOMBRE; GIDE, 2013). Em particular, a associação estável de polissacarídeos com uma variedade de compostos bioativos como sistemas de administração de fármacos é de interesse para as empresas farmacêuticas. A literatura também relata atividades farmacológicas e antimicrobianas intrínsecas de alguns polissacarídeos que aumentam suas potencialidades para aplicação farmacológica (LI *et al.*, 2017).

Galactomananas já vem sendo utilizadas para formulação de hidrogel (DALOZZO *et al.*, 2013). Em estudo realizado por Koop *et al.*, (2015), hidrogéis baseados em galactomananas foram investigados quanto aos possíveis efeitos irritantes e apresentaram-se seguros para aplicação em feridas cutâneas.

Muitos agentes cicatrizantes possuem vantagens e desvantagens e cabe a correta escolha para o tratamento de cada tipo de ferida (LORENZ; LONGAKER, 2003). Um ambiente quente e úmido com material adequado, pode contribuir para resultados mais rápidos e bem-sucedidos na cicatrização de determinados tipos de feridas; portanto, curativos à base de polímeros e hidrogéis têm tornado-se popular (BOATENG *et al.*, 2008). Além disso, os hidrogéis mostram vantagens como alívio da dor, absorção de exudato, barreira a microorganismos, permeabilidade ao oxigênio, transparência dentre outras vantagens que podem

ser adequadas de acordo com sua aplicação e habilidade geral para liberação de medicamentos de forma controlada (DAFNA *et al.*, 2013; GONEN-WADMANY *et al.*, 2011; Rogero *et al.*, 2003). O requerimento mais críticos para qualquer tipo de hidrogel produzido a partir de biopolímeros é que esses géis devem ter a capacidade de absorver uma grande quantidade de água relativa a sua massa e o material deve resistir à dissolução (SANTOS *et al.*, 2015; PAL *et al.*, 2007).

### **1.7 Biocompatibilidade dérmica de biomateriais de origem vegetal**

Geralmente, produtos vegetais são ricos em antioxidantes, óleos essenciais, hidrocolóides, compostos bioativos e proteínas e podem prover diferentes propriedades biológicas para a pele de acordo com sua composição (DUREJA *et al.*, 2005; DUBEY; KUMAR; TRIPATHI, 2004). No entanto, muitos destes produtos naturais ou biomateriais por apresentarem-se como complexas misturas de compostos químicos podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de reações adversas. Ademais, o potencial irritante e citotóxico dessas formulações contendo substâncias naturais deve ser investigado antes do uso em humanos (RIBEIRO *et al.*, 2015).

Biomateriais são definidos como materiais que podem ter interface com sistemas biológicos em ordem para avaliar, tratar, aumentar, ou substituir qualquer tecido do corpo (WILLIAMS, 1987).

Todos os materiais destinados a aplicação em seres humanos, estimulam respostas teciduais, que envolvem lesões, cicatrização e respostas inflamatórias. A avaliação histológica é o método mais utilizado para avaliar *in vivo*, determinando as características de desempenho e de segurança ou de biocompatibilidade dos biomateriais em desenvolvimento. Do ponto de vista prático, o objetivo da avaliação da compatibilidade de biomateriais *in vivo* é o de determinar e prever se tais dispositivos funcionam como pretendido e não apresenta nenhum dano potencial ao paciente ou usuário por avaliações em condições que simulam o uso clínico (AAMI, 1997; ANDERSON, 2001). Vale ressaltar que fatores locais e sistêmicos podem desempenhar um papel na resposta de cicatrização de feridas a biomateriais (ANDERSON, 2001).

Grandes esforços têm sido feitos por agências governamentais, para testar os procedimentos, protocolos, orientações e padrões que podem ser utilizados na

avaliação *in vivo* utilizando por base os padrões estabelecidos pela International Standard Organization (ISO), ISO número 10.993 (AAMI, 1997; CHAPEKAR, 1996; LANGONE, 1998; FDA, 1995; ISO, 1993; ASTM, 1999).

Os testes *in vivo* com animais para avaliação da biocompatibilidade de um novo biomaterial são escolhidos para simular uso clínico. Tais testes avaliam as respostas do tecido, bem como fornecem informação adicional de reações biológicas adversas de componentes químicos desconhecidos. Tais reações observadas nesta fase de desenvolvimento exigem mais esforços para melhorar a biocompatibilidade do biomaterial e para identificar os agentes responsáveis. O teste de irritação dérmica trata da exposição ou contato com quantidades ainda pequenas de potenciais agentes irritantes que podem resultar em reações alérgicas ou sensibilização (ISO, 1993).

A aplicação clínica de um biomaterial não deve causar qualquer reação adversa no organismo, porém, algumas substâncias químicas podem causar irritação da pele e das mucosas, irritação ocular e sensibilização de contato retardada, portanto, os testes de biocompatibilidade são imprescindíveis para avaliar possíveis riscos de contato (ROGERO *et al.*, 2003).

## **1. 8 Controle de qualidade de formulações para uso tópico**

Durante o desenvolvimento de uma formulação para uso tópico, deve haver um controle da qualidade de produtos, previstos nas boas práticas de fabricação, que devem garantir que o produto cumpra as especificações determinadas aos limites aceitáveis para microorganismos antes de ser comercializado e utilizado pelo consumidor (DE MORAES SOARES, 2015; BRASIL, 2010). É importante destacar que as matérias-primas oriundas de plantas podem estar contaminadas por fatores ambientais como temperatura, práticas de manuseio e condições de armazenamento podendo comprometer sua qualidade e eficácia (DE FREITAS; BAUAB., 2012; KNEIFEL *et al.*, 2002). Portanto, o controle de qualidade em amostras não estéreis deve começar antes do processo de formulação, continuar durante o processamento da matéria-prima até o armazenamento do produto. Além das condições assépticas, é importante monitorar algumas características físicas das amostras como aspecto visual, pH e níveis de contaminação

microbiológico para aumentar a segurança do produto (ABBA., 2009; RATAJCZAK *et al.*, 2015).

De acordo com Bazzo *et al.* (2006), o controle de qualidade microbiológico de hidrogéis deve ser realizado principalmente em formulações cujo veículos e princípios ativos constituam um ambiente ideal para o crescimento de microorganismos, desde que eles possam encontrar nas formulações uma fonte de carboidratos, proteínas, aminoácidos, água, entre outros (SMART; SPOONER., 1972).

A presença de contaminantes em produtos farmacêuticos não estéreis, pode reduzir ou inativar a atividade terapêutica do produto e tem o poder de afetar potencialmente os pacientes, assim, grandes esforços são necessários para garantir a qualidade constante e adequada em produtos originários de fontes biológicas (DE FREITAS; BAUAB, 2012).

Uma das etapas primordiais no controle de qualidade é realizar estudo da estabilidade das formulações. O estudo da estabilidade consiste de uma série de testes para obter a garantia de estabilidade do produto embalado e armazenado na condição estabelecida dentro do período de tempo determinado no qual o produto ainda satisfaz as suas especificações estabelecidas. Quando o produto não é suficiente estável, observa-se alterações nas características físicas como a separação de fases e químicas como a mudança de pH, cor e odor (KUMAR; RAJAN; CHETTY *et al.*, 2011).

Desta forma, se faz necessário realizar teste de qualidade e avaliação da segurança com qualquer formulação para aplicação dérmica, antes de sua comercialização evitando possíveis efeitos adversos, garantindo a eficácia do produto e seu uso seguro (RATAJCZAK *et al.*, 2015 ; KUMAR *et al.*, 2011 ; ROGERO *et al.*, 2003).

## 2 JUSTIFICATIVA

Feridas cutâneas são um dos graves problemas de saúde pública da atualidade e os tratamentos nem sempre produzem os resultados esperados. Em todo o mundo, pesquisas são conduzidas para identificar novos agentes capazes de promover o processo de reparação de feridas, não tóxicos, a partir de plantas medicinais. As plantas são fontes potenciais de medicamentos para a indústria biomédica ou farmacêutica, uma vez que a produção de drogas sintéticas incluem custo mais elevado, e sua utilização está associada há vários efeitos secundários havendo a necessidade de buscar-se fármacos alternativos.

No Brasil, cerca de 71 plantas estão incluídas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), pelo Ministério da Saúde. As espécies apresentam potencialidades medicinais e são estudadas quanto às suas propriedades farmacológicas, das quais cerca de 18 espécies são indicadas na medicina popular para o tratamento de feridas (SCHEFFER *et al.* 1999; SILVA, 2006).

Um dos objetivos do RENISUS é reconhecer o uso de espécies vegetais utilizadas tradicionalmente em diferentes regiões do país, além de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar o desenvolvimento e a inovação na área de plantas medicinais. Desta forma, faz-se necessário a identificação e estudos de plantas que possuam comprovada ação farmacológica e(ou) substâncias biologicamente ativas (SCHEFFER *et al.*, 1999).

*Calotropis procera* é uma planta encontrada em regiões tropicais e subtropicais do país e é amplamente distribuída na cidade de Fortaleza e Região Metropolitana do Estado do Ceará. Produz em quantidade significativa um líquido de aspecto leitoso denominado látex, o qual exsuda quando esta sofre algum tipo de injúria. A planta *C. procera* é conhecida na medicina tradicional por sua importância farmacológica durante séculos e vem sendo utilizada em várias enfermidades dérmicas, porém, ainda não é reconhecida pelo ministério da saúde e nem está incluída na lista de plantas do RENISUS como agente cicatrizante.

Evidências científicas correlacionam as propriedades cicatrizantes de plantas laticíferas à ação de proteínas com atividade proteolítica, como as proteases. Estas moléculas também são liberadas endogenamente funcionando

como biomarcadores de feridas agudas e crônicas (IUONUT *et al.*, 2011). Papaína é um exemplo de protease de origem vegetal, que já vem sendo utilizada como agente debridante de tecidos, diluídas em água. Sua aplicação no tratamento de feridas crônicas requer cuidados pois há riscos durante a manipulação, necessitando de um excipiente mais adequado (MONETTA, 1987). Estudos com outras plantas laticíferas foram desenvolvidos no Brasil incorporando frações de proteínas do látex de *H. Brasiliense* em biomembrana sintética indicada como alternativa para o tratamento de feridas crônicas (FRADE *et al.*, 2006).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente a ação cicatrizante de proteínas solúveis do látex de *C. procera*, em modelo de feridas incisionais e excisionais quando incorporadas em uma biomembrana de álcool polivinil (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; RAMOS *et al.* 2016). Os mecanismos subjacentes envolveram modulação da liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Ressalta-se que Ramos *et al.*, (2013) realizou o fracionamento dessas proteínas solúveis do látex de *C. procera* levando ao estabelecimento de um protocolo de purificação de proteases obtendo-se a fração denominada CpPII de *C. Procera*, a partir da qual foram isoladas 3 diferentes tipos de proteases cisteínicas (RAMOS, 2013). Portanto, a fração CpPII, rica em proteases, foi escolhida para ser testada, quanto ao potencial cicatrizante, no presente trabalho.

Destaca-se que o estudo das proteínas do látex pode ser uma ferramenta promissora na pesquisa de novos medicamentos de origem natural para a cicatrização de feridas. Uma vez que *C. procera* é uma planta nativa e produz látex em quantidade significativa pode contribuir como fonte natural de moléculas bioativas para aplicações biotecnológicas. No entanto, não existe estudo de cicatrização *in vivo* avaliando a eficácia de frações ricas em proteases oriundas de proteínas solúveis totais de *C. procera* quando associadas a um veículo natural na forma de hidrogel a base de hemiceluloses vegetais especificamente, galactomananas, extraídas de *C. pucherrima*.

Considerando a hipótese de que as proteases presente na fração CpPII do látex de *C. procera* estimulam a cicatrização, o presente trabalho testou o efeito cicatrizante de um hidrogel de hemiceluloses vegetais, como excipiente, associado a fração de proteínas CpPII, extraídas do látex de *Calotropis procera*, em modelo de feridas experimentais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um hidrogel cicatrizante baseado em hemiceluloses vegetais e proteínas laticíferas de *Calotropis procera* e avaliar seu efeito em modelo experimental de cicatrização de feridas.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho consistem em :

1. Elaborar hidrogéis a base de hemiceluloses contendo a fração CpPII de proteínas laticíferas de *C. procera*;
2. Realizar a caracterização microbiológica e físico-química (estabilidade) dos hidrogéis;
3. Investigar o efeito dos hidrogéis em diferentes modelos de irritação dermal e determinar o índice de irritação primária ao desafio na pele íntegra e escarificada.
4. Avaliar o efeito dos hidrogéis em diferentes concentrações de proteínas laticíferas (CpPII) na cicatrização de feridas;
5. Avaliar o efeito das proteínas laticíferas livre de hemiceluloses ou com a atividade proteolítica inibida na cicatrização de feridas;
6. Avaliar a possível ação do tratamento tópico com hidrogéis na modulação de mediadores inflamatórios e marcador oxidativo durante a resposta cicatricial;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

Os reagentes, materiais vegetais, bem como os animais utilizados neste trabalho estão descritos abaixo.

#### 4.1.1. Reagentes

Cloridrato de xilazina 2% (Anasedan®- Vetbrands). Cloridrato de ketamina 10% (Dopalen®- Vetbrands). Sabonete líquido anti-séptico (LM farma). Álcool etílico 70%. Iodopovidona 10% (Biotrat). Solução salina, cloreto de sódio estéril a 0,9% (Pharmace – Ceará). Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB, Sigma, São Paulo). Iodoacetamida (Armesham Bioscience, USA). Purilon® gel (Mcsurgical).

Os demais reagentes foram de grau analítico foram obtidos de diferentes fornecedores.

#### 4.1.2 *Materiais vegetais*

Para realização deste estudo, foi utilizado o látex da planta *Calotropis procera* (Ait) R. Br., pertencente à sub-família Asclepiadaceae, família Apocynaceae e amplamente distribuída na cidade de Fortaleza e Região Metropolitana do Estado do Ceará, Brasil. *C. Procera* foi identificada e depositada no Herbário Prisco Bezerra – EAC (Escola de Agronomia do Ceará) que integra a Universidade Federal do Ceará (UFC), sob o número 32663.

As sementes de *Caesalpinia pulcherrima* (Fabaceae) também foram utilizadas. As mesmas foram coletadas no estado do Ceará-Brasil, identificadas e registradas no Herbário Prisco Bezerra - EAC (UFC) sob o número 56367.

### 4.1.3 Animais

Camundongos *Swiss* machos adultos, com 12 semanas de idade e pesando  $25 \pm 3,0$  g, foram obtidos do Biotério da Universidade Federal do Ceará, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas individuais em condições experimentais padrão (12/12 ciclos luz/escuro, temperatura de 25 °C e humidade  $55 \pm 10\%$ ) e alimentados com dieta comercial esterilizada e água *ad libitum*. Antes de manusear os animais, os procedimentos experimentais foram avaliados pelo comitê institucional para uso e cuidado dos animais, seguindo-se de aprovação sob o número 64/2014.

### 4.2 Métodos

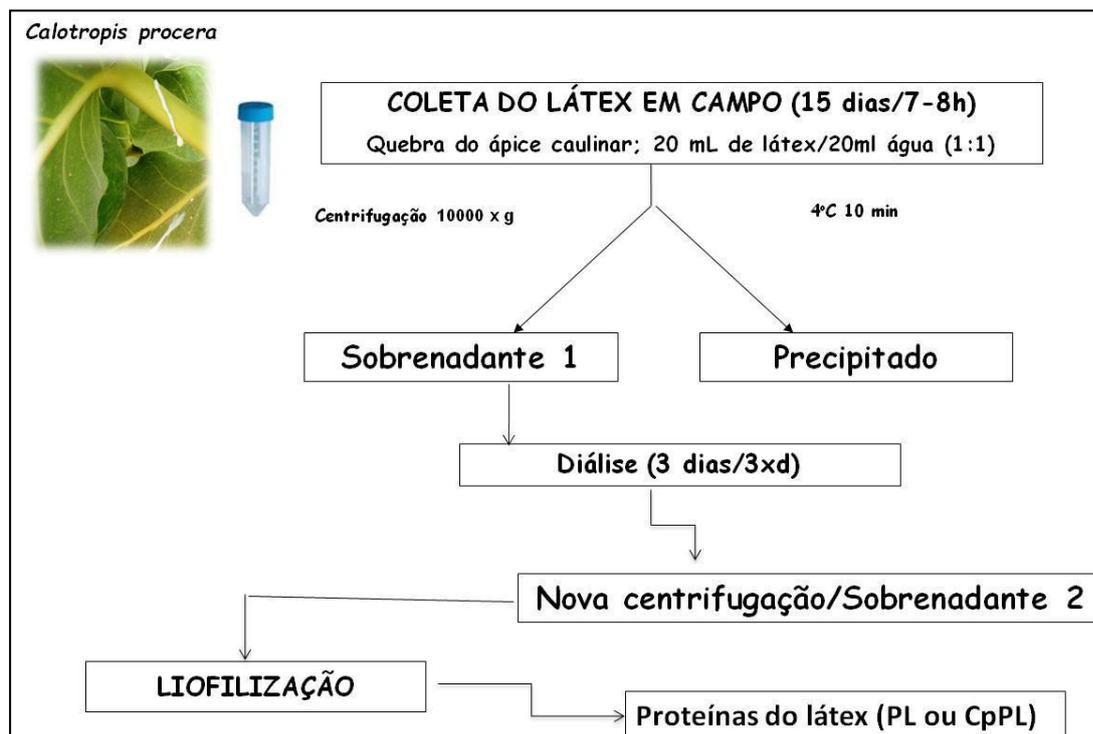
O látex de *C. procera* foi coletado quinzenalmente de plantas saudáveis que crescem espontaneamente a beira de estradas da zona urbana de Fortaleza, seguindo uma estratégia descrita por Ramos *et al.* (2010).

A coleta do material vegetal foi realizada em tubos de plástico Falcon (Figura 7), no período da manhã, entre 7 e 8h, após a quebra do ápice caulinar da planta e exsudação do látex sobre um volume de água destilada para finalizar uma razão de 1:1 (v:v). As proteínas solúveis do látex (PL), retendo a atividade imunomoduladora, foram obtidas após o processamento do látex bruto de acordo com protocolo reportado previamente (ALENCAR *et al.*, 2006).

A fração de proteína livre foi denominada CpPL, o que significa proteínas de látex de *Calotropis procera*. Esta preparação foi ainda cromatografada em CM-Sepharose (pH 5,0) de acordo com o protocolo descrito em (RAMOS *et al.*, 2009a). As frações de proteína resultantes (CpPL-PI, CpPL-PII e CpPL-PIII) foram recuperadas, dialisadas e liofilizadas (Figura 8). CpPL-PII, onde se encontra quase toda a atividade proteolítica de CpPL, foi testada em experimentos adicionais sendo indentificada ao longo dos estudos como fração CpPII, para fins didáticos.

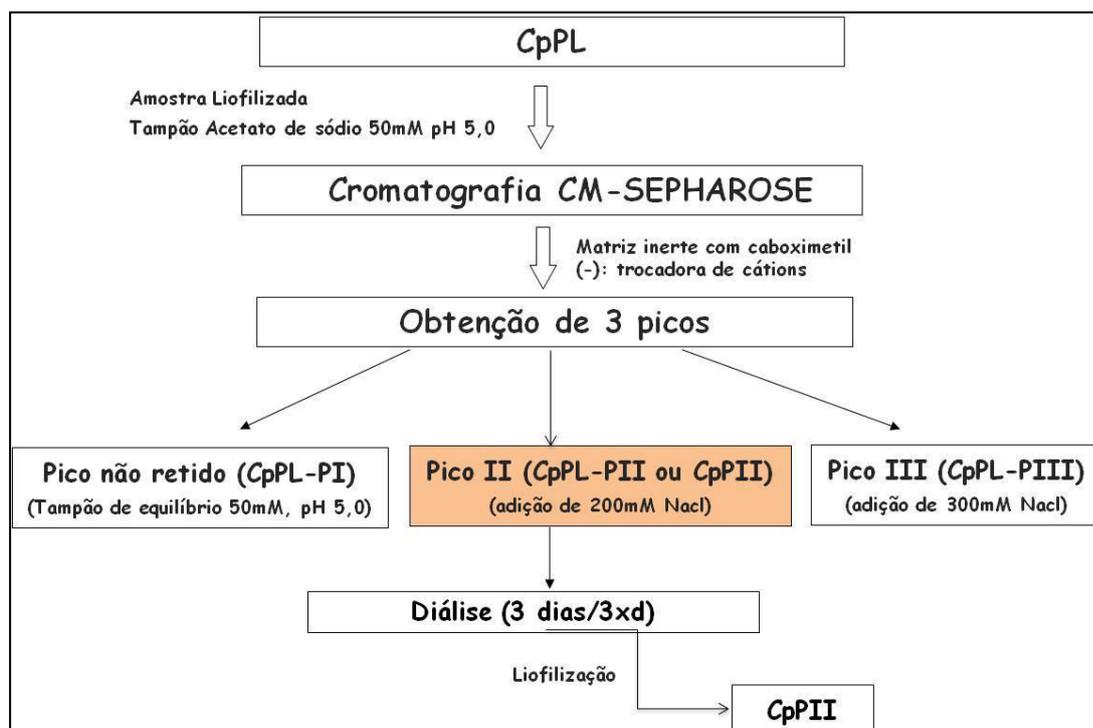
Quando necessário para controle, CpPII foi tratada com iodoacetamida 20 mM (IAA) para inibir irreversivelmente a sua atividade proteolítica endógena (RAMOS *et al.*, 2013).

Figura 7. Fluxograma de obtenção das proteínas solúveis do látex de *Calotropis procera*.



Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Figura 8. Fluxograma de obtenção da fração CpPII do látex de *Calotropis procera*.

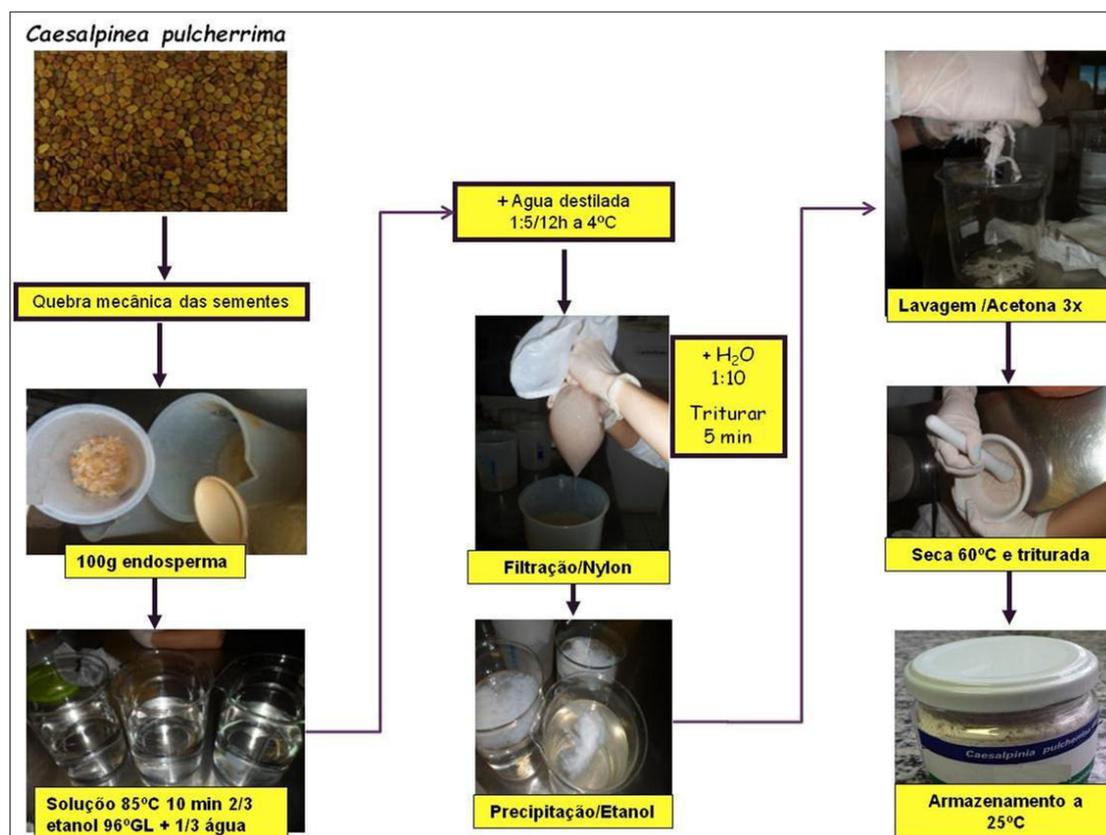


Fonte : elaborada pelo próprio autor.

A extração de hemiceluloses vegetais (Figura 9) foi realizada conforme descrito por Cerqueira *et al.* (2009). As sementes foram moídas e o endosperma separado do cotilédono e da casca. Em seguida, o endosperma foi imerso numa solução a 96% de etanol em ebulição, durante 10 minutos para desativar as enzimas (EGOROV; MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2004). Após lavagem com água destilada, os endospermas foram suspensos em água (m:v, 1:5) e mantidos a 7 °C durante, aproximadamente, 12 h. As suspensões foram então adicionadas a 10 volumes de água e misturadas num liquidificador.

À solução viscosa obtida foram adicionados dois volumes de etanol a 96% e a galactomanana precipitada foi imersa em acetona numa proporção de 1:5 (m:v, precipitado:acetona) durante 15 min, seguido por secagem com fluxo de ar. O pó obtido foi então suspenso em água 1:100 (m:v) e o processo de precipitação repetido. Finalmente, o biopolímero foi moído e passado através de uma malha de 0,125 mm.

Figura 9. Extração de hemiceluloses vegetais (galactomanana) de sementes de *Caesalpineia pulcherrima*.



Fonte : elaborada pelo próprio autor.

### 4.3 Preparação do hidrogel

Para a preparação do hidrogel, CpPII e CpPII-IAA (inibida por iodoacetamida) foram utilizadas em diferentes proporções massa/volume, obtendo-se as formulações testadas neste trabalho (Figura 10).

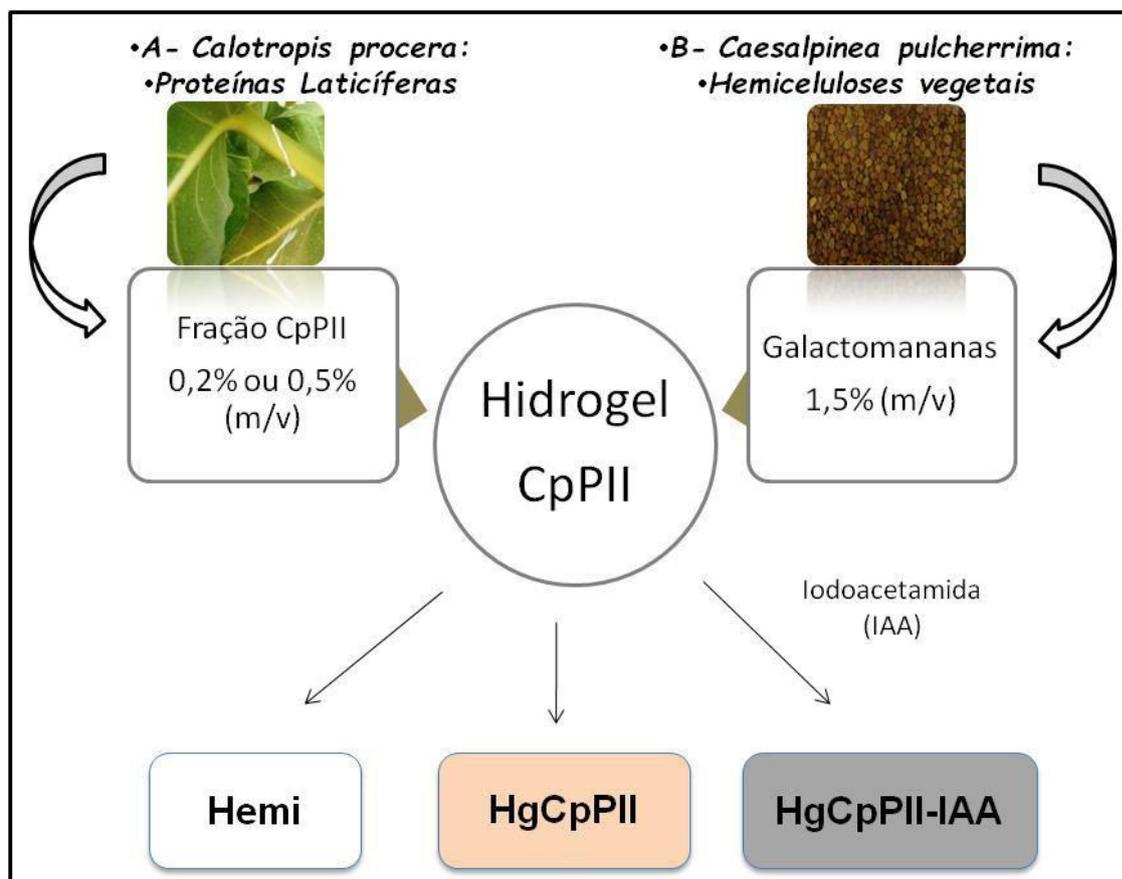
O gel de galactomanana foi utilizado como veículo para liberar a substância ativa testada. O conservante Brometo de Cetiltrimetilamina (CTAB) a 0,1% (m/v) e água Milli-Q q.s.p. foram adicionados às soluções de galactomanana 1,5% (m/v). A mistura foi homogeneizada num agitador Turratec Tecnal TE-102 a 20500 rpm durante 1 minuto e centrifugada a 4 °C, 10000 g durante o período de 15 minutos.

Após homogeneização e obtenção do gel de galactomanana, adicionou-se lentamente a fração de proteínas do látex CpPII. Os hidrogéis permaneceram sob agitação por cerca de duas horas. O produto, obtido pela mistura de soluções aquosas de proteínas do látex e do polímero natural baseado em hemiceluloses de plantas, foi denominado HgCpPII e HgCpPII-IAA.

Após 24 horas de preparo, todas as amostras testadas nos ensaios *in vivo* foram submetidas a determinação de sua atividade proteolítica conforme Freitas et al., (2007).

Esses hidrogéis foram preparados para atingir a concentração final de proteínas laticíferas em 0,2 e 0,5%, e utilizados em todos os experimentos do presente trabalho.

Figura 10. Fluxograma de elaboração dos Hidrogéis (HgCpPll) contendo a fração CpPll de proteínas do latex de *Calotropis procera*.



(A) nas concentrações de 0,2 e 0,5% [m/v] em gel de galactomananas extraídas das sementes de *Caesalpineia pulcherrima* (B). Hidrogéis com atividade proteolítica inibida (HgCpPll-IAA) foram elaborados da mesma forma porém em uma única concentração (0,2% m/v). A formulação contendo somente a galactomana foi denominada de Hemi e foi utilizada como veículo para CpPll. Fonte : elaborada pelo próprio autor.

#### 4.4 Caracterização microbiológica e físico-química dos hidrogéis

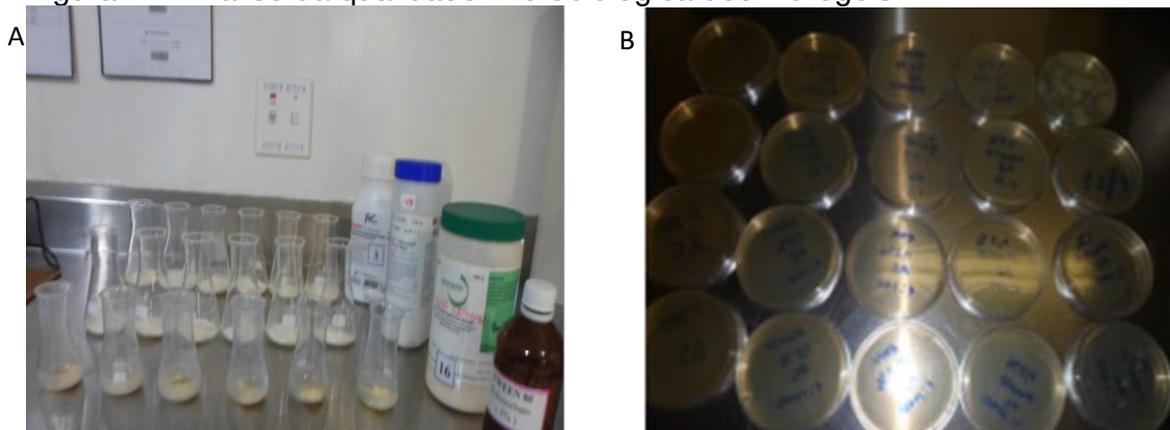
Foram utilizadas análises microbiológica e físico-química para caracterização dos hidrogéis. A análise da físico-química permitiu o estudo da estabilidade das amostras. A análise microbiológica foi realizada a fim de verificar a possibilidade de contaminação na elaboração e/ou envase da amostra.

##### 4.4.1. Análises microbiológicas

A avaliação da qualidade microbiológica (FIGURA 11) foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico da Universidade de Fortaleza. Imediatamente após manipulação seguida de envase em tubos plásticos estéreis de 1,5 mL, amostras de hidrogéis foram analisados através do método *pour plate* para contagem de microorganismos viáveis de acordo com a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010).

Os resultados foram dispostos como Unidade Formadora de Colônia (ufc/g) de acordo com o número de microorganismos viáveis (NMV) calculados a partir da média aritmética de cada diluição multiplicada pelo número de colônias da placa dividido por 3.

Figura 11. Análise da qualidade microbiológica dos hidrogéis.



(A) Amostras manipuladas e envasadas imediatamente após o preparo foram analisadas quanto a presença de contaminação por fungos ou bactérias. (B) O método *pour plate* foi utilizado para contagem de microorganismos viáveis.

#### 4.4.2 Avaliação da estabilidade

As amostras de hidrogéis foram avaliadas no tocante a estabilidade através de medidas do pH, da análise macroscópica (cor, odor e aspecto) e da atividade proteolítica.

As amostras foram avaliadas após 24 h, tempo de manipulação (tempo zero), e após armazenamento, sob diferentes condições de temperatura, ao longo de 1 ano após envase (BRASIL, 2004). Uma gota de cada amostra de hidrogel era aplicada sobre uma tira de papel reveladora de pH, na faixa de 0-14 (Merck®), após 24h de manipulação. O pH das amostras de hidrogel, era determinado com base na coloração resultante da fita, comparada com uma fita padrão indicadora de pH fornecida pelo fabricante. O pH das amostras e a análise macroscópica das formulações também foram acompanhados ao cabo de 30, 60, 90, 180 e 365 dias pós-preparo sob armazenamento a 4 °C.

A atividade proteolítica de CpPII foi utilizada como parâmetro para estimar a estabilidade do ativo CpPII na formulação. A atividade proteolítica total do hidrogel foi determinada tendo azocaseína como substrato, a pH 5,0 e 6,0, e estimada com base nas leituras espectrofotométricas (420nm) de acordo com FREITAS *et al.*, (2007). A atividade proteolítica retida nas amostras de hidrogel armazenadas durante 7, 14, 21, 30, 90, 180, 365 dias pós-preparo era avaliada ao longo do tempo. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância de 0,01 medida em 420 nm. A quantidade de proteína nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976).

As medidas de atividade proteolítica foram expressas como UA/ µg de proteína correspondendo a médias ± erro padrão da média (S.E.M.) de triplicatas de ensaios independentes.

## **4.5 Modelo de irritação dermal**

Testes de irritação cutânea foram conduzidos para verificar a segurança da aplicação tópica dos hidrogéis.

### **4.5.1 Pré-preparo dos animais para o teste de irritabilidade dérmica**

Testes de irritação da pele foram realizados com algumas modificações (JIA; ZHAO; JIA, 2008). Os animais foram submetidos a tricotomia 24 horas antes da aplicação dos hidrogéis e após deixados sob observação durante 24 h para examinar se havia quaisquer respostas anormais da pele. Os animais raspados foram distribuídos aleatoriamente em grupos (n = 6 / grupo), que receberam apenas hidrogel com proteínas laticíferas (grupo HgCpPII 0,2%) e que receberam veículo contendo apenas hemiceluloses (grupo Hemi) aplicado topicamente na área nua da pele de cerca de 1 cm<sup>2</sup>.

### **4.5.2 Teste de irritação dose única e múltipla em pele íntegra e escarificada**

Três diferentes tipos de teste de irritação cutânea foram aplicados no estudo da irritabilidade dermal: teste em dose única na pele intacta; teste de irritação em doses múltiplas em pele íntegra e teste de irritação com doses múltiplas na pele escarificada.

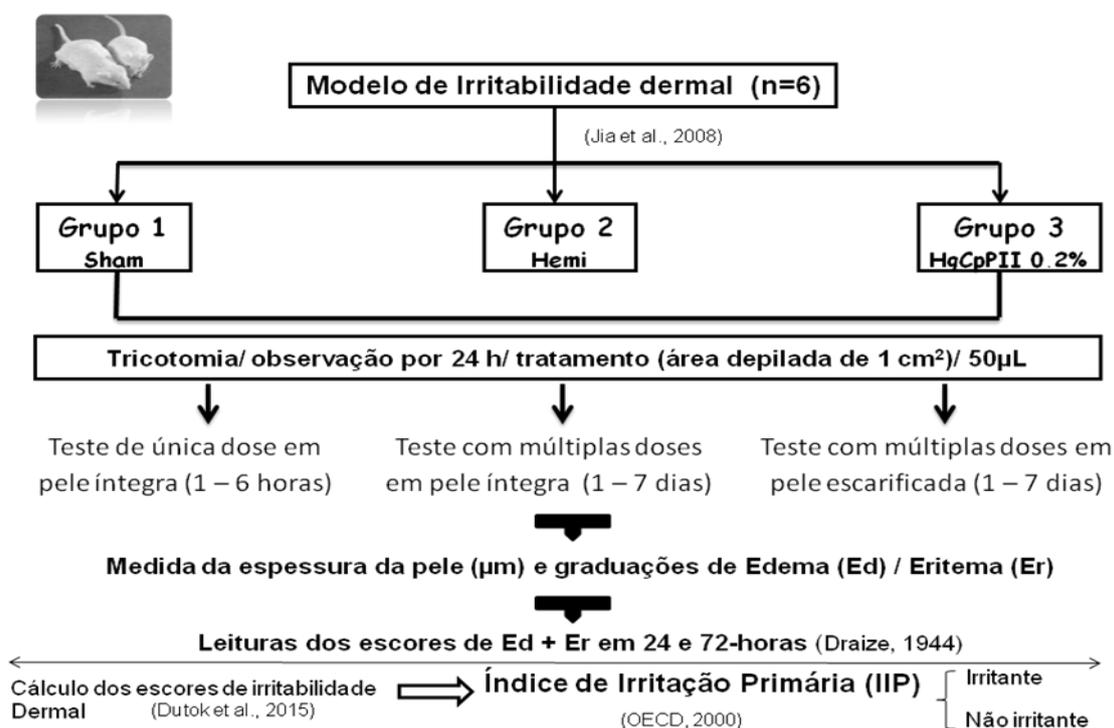
O teste em dose única na pele intacta foi utilizado para avaliar a reação cutânea aguda após aplicação de hidrogel (durante as 6 horas). Os testes de irritação em doses múltiplas em pele íntegra e em doses múltiplas na pele escarificada, foram realizados em animais que foram tratados com HgCpPII 0,2%, uma vez por dia, durante sete dias consecutivos.

A abrasão de pele de camundongos foi feita usando uma lâmina de bisturi até a presença do fluido tissular tecido notável, mas não sangue. Os animais foram tratados com hidrogéis numa dose (50 µL). O grupo de controle (*Sham*) foi realizado na área da derme do animal que não foi submetido à aplicação de qualquer formulação.

#### 4.5.3 Avaliação e classificação das reações cutâneas

As reações irritativas ao desafio cutâneo, foram registradas durante 7 dias consecutivos após observações macroscópicas dos sinais da inflamação e espessura da pele a qual foi medida antes e 24h após a aplicação dos tratamentos, utilizando um micrômetro (Mitutoyo Serie 293). Edema (Ed) e hiperemia (Hi) observados após aplicação das amostras, foram graduados conforme escala de Draize *et al.* (1944), obtendo-se os Escores Totais de Irritação Dermal para edema e para hiperemia (DUTOK *et al.*, 2015). O método de pontuação para a irritação da pele seguiu a seguinte classificação: 1-ausente; 2-leve; 3-moderado; 4-intenso (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944). Os resultados foram expressos como média das leituras de edema e hiperemia nas 24 e 72 horas após aplicação das amostras. De acordo com o resultado obtido nos escores de irritação dermal, foi possível determinar o índice de Irritação Primária (IPP) da amostra classificada como não irritante (0 – 0.9), levemente irritante (1 – 1.9), moderadamente irritante (2 – 4.9) e severamente irritante (5 – 8) (OECD, 2000). Este ensaio está representado no protocolo experimental I (Figura 12).

Figura 12. Protocolo experimental I: Modelo de irritabilidade dermal.

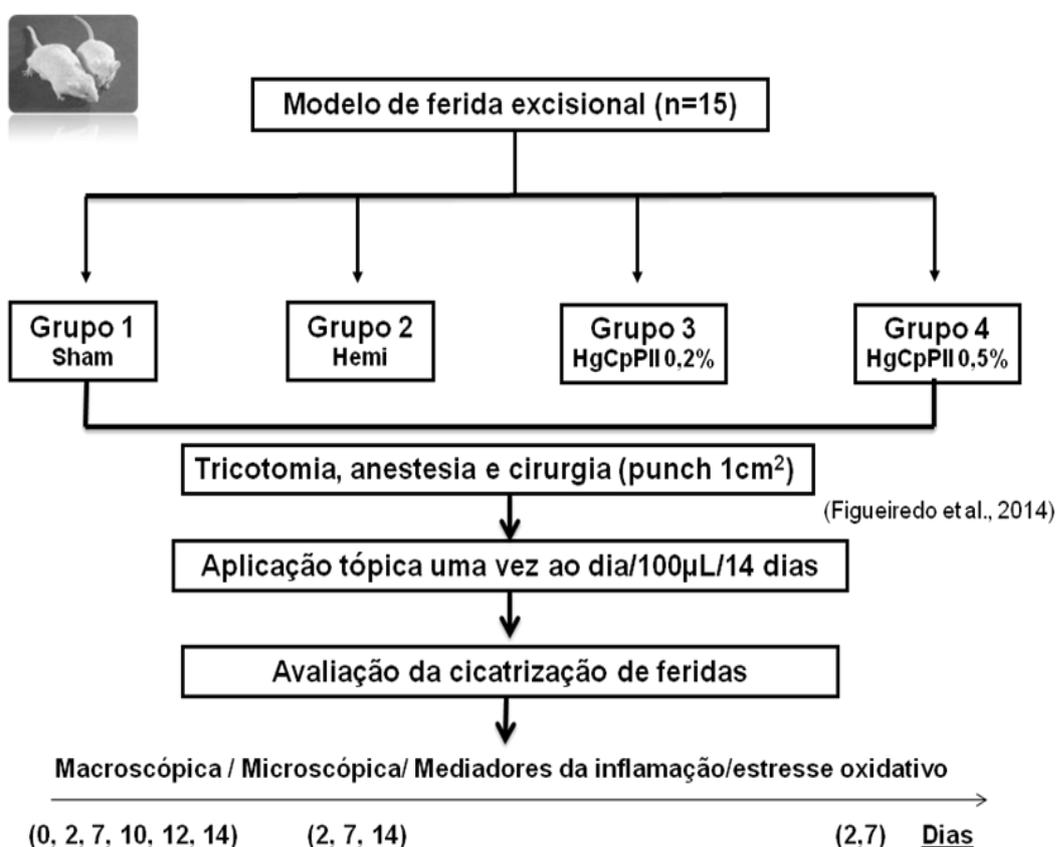


#### 4.6 Ensaios de cicatrização: modelo de ferida excisional

Para testar a hipótese de que a fração de proteínas CpPII do látex de *C. procera*, como ativo em formulação de hidrogel baseado em hemiceluloses, estimula a cicatrização em modelo experimental, utilizou-se o modelo de ferida excisional em camundongos.

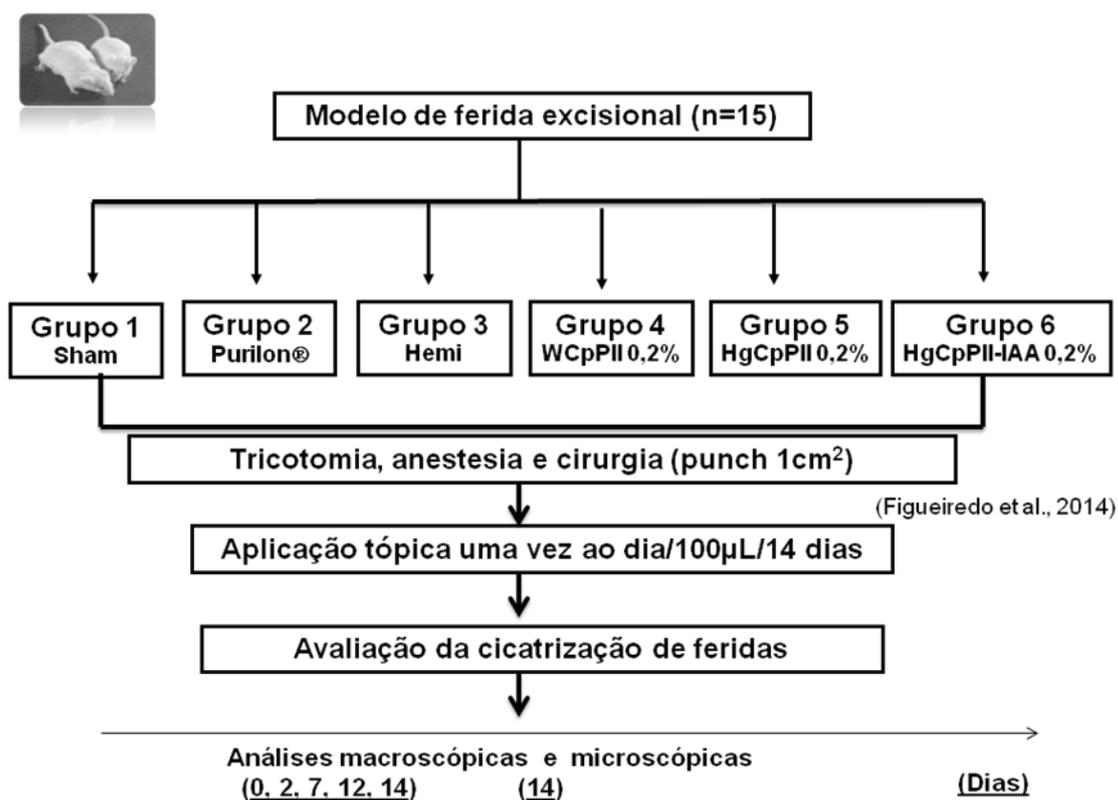
Neste modelo, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 15 animais cada, como se segue: (i) animais submetidos apenas a um procedimento cirúrgico que não recebeu qualquer tratamento (Sham); (ii) animais que receberam hidrogel de galactomanana sem proteínas laticíferas (veículo); (iii) animais tratados com hidrogel a 0,2% (m/v) de proteínas laticíferas (HgCpPII 0,2%) e (iv) animais tratados com hidrogel a 0,5% (m/v) de proteínas laticíferas (HgCpPII 0,5%). Este ensaio está representado no protocolo experimental II (Figura 13).

Figura 13. Protocolo experimental II: Modelo de ferida excisional A



Subsequentemente, para testar a hipótese das proteínas laticíferas CpPII serem independentemente ativas para promover a cicatrização mesmo quando livres de hemiceluloses ou quando sua atividade proteolítica é inibida, um experimento adicional em condições semelhantes foi desenvolvido. Foram incluídos os grupos com hidrogel HgCpPII-IAA 0,2%; animais tratados com fração CpPII 0,2% dissolvidos em água (WCpPII 0,2%) e um hidrogel comercial (Purilon® Gel, MCsurgical) introduzido como grupo de controle positivo. Os grupos Sham, Hemi e HgCpPII 0,2% foram utilizados novamente neste experimento. Este ensaio está representado no protocolo experimental II (Figura 14).

Figura 14. Protocolo experimental III. Modelo de ferida excisional B



Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina 10% (115 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg) antes do procedimento cirúrgico (HALL; CLARK, 1991). A pele da superfície dorsal foi raspada e preparada adicionalmente para cirurgia asséptica utilizando iodopovidona 1% seguida de etanol a 70%.

Realizou-se uma única ferida, 1 cm<sup>2</sup> de espessura total, excisando a pele, com um instrumento de biópsia (punch) na região dorsal de cada camundongo (VASCONCELOS *et al.*, 2015).

A aplicação tópica de hidrogéis (100 µL) foi realizada no leito da ferida, uma vez por dia durante 14 dias. Todos os grupos foram transportados na respectiva gaiola durante 14 dias consecutivos a partir do dia 0.

As feridas excisionais ficaram expostas ao ambiente e foram diariamente observadas e analisadas até o 14<sup>o</sup> dia pós-cirurgia.

#### **4.6.1 Análises macroscópicas**

As feridas excisionais foram avaliadas com 48 h após a cirurgia em termos de edema, hiperemia. O edema foi registrado quando se observou um aspecto tumefeito no do leito e/ou bordas da lesão e confirmado, quando necessário, por meio de compressão digital com o polegar revestido por luva estéril, onde estando o edema presente, forma-se uma depressão.

A presença de hiperemia foi notificada quando se constatou um aspecto avermelhado “rubor”. Esses sinais clínicos de inflamação foram pontuados cegamente de forma semi-quantitativa, conforme sua intensidade, e de acordo com os escores (0): ausente; (1): leve; (2): moderado e (3): intenso (Draize, 1944).

As áreas feridas de feridas excisionais foram medidas utilizando um paquímetro digital e foram calculadas da seguinte forma:  $A = \pi \times R \times r$ , onde A, R e r são área, raio maior e raio menor, respectivamente (PRATA *et al.*, 1988).

A partir da obtenção da área da ferida não cicatrizada foi possível calcular o percentual de redução da lesão considerando como padrão o dia zero, de acordo com a seguinte fórmula: % contração da ferida = [(área da lesão realizada no procedimento cirúrgico – área da ferida não cicatrizada avaliada no dia escolhido) x 100] / área da lesão realizada no procedimento cirúrgico (KUMAR *et al.*, 2008).

Assim, a área e percentagem de contração da ferida foram calculadas e utilizadas para análise estatística.

A evolução da cicatrização das feridas também foi acompanhada pela queda da crosta. A queda da crosta foi observada sempre que uma crosta não cobria as feridas (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010).

Após o estudo macroscópico, as feridas excisionais foram removidas para estudo histológico como descrito no tópico 4.6.2, e os animais foram sacrificados em seguida com uma sobredosagem anestésica.

#### **4.6.2 Análises microscópicas**

As análises microscópicas foram realizadas no intuito de verificar a efetividade do tratamento tópico do hidrogel CpPII nas diferentes etapas do processo cicatricial.

##### **4.6.2.1 Análise histológica e confecção das lâminas**

Amostras das feridas excisionais de cada animal (n = 5) foram coletadas no dia 2, 7 e 14 com a utilização de um instrumento cirúrgico (*punch*) medindo 4 mm de diâmetro.

Durante este procedimento, teve-se o cuidado de remover parte do fragmento de pele normal em volta da lesão, abrangendo um centímetro além de cada margem e aprofundando-se até o plano muscular. Após ressecção das feridas, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical.

As biópsias das feridas, foram fixadas em formaldeído 10% dissolvido em solução tamponada de PBS 0,01 M a pH 7,2, durante 24 horas e, posteriormente submetidas a procedimentos histopatológicos. Secções de 5 micrômetros foram cortadas e coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E) para análise do infiltrado inflamatório, fibroblastos e estimar o progresso da re-epitelização.

Colágeno e mastócitos degranulados foram avaliados no 14<sup>o</sup> dia após a indução cirúrgica da lesão, em lâminas histológicas coradas respectivamente com tricrômico de Masson e azul de toluidina.

O mesmo investigador avaliou cegamente todos os dados histológicos das secções.

#### 4.6.2.2 Obtenção e análise das fotomicrografias

As fotomicrografias de lâminas histológicas representativas das feridas excisionais para avaliação de fibroplasia, colagênese, re-epitelização e espessura da derme foram obtidas pelo microscópio óptico *Zeiss* acoplado a uma câmera digital de alta resolução (*AxioCam Icc 3*). As imagens capturadas foram salvas em formato TIF pelo *software Axio Vision* (versão 4.8.2, SP1/2011), padronizando a luminosidade, objetiva e a altura do condensador (NOURSADEGHI et al., 2008) e analisados posteriormente utilizando o *software ImageJ®* versão 1.4.3.67 (U.S. National Institutes of Health, USA).

#### 4.6.2.3 Avaliação de Edema e infiltrado de leucócitos

Edema e infiltrado de leucócitos foram avaliados semi-quantitativamente, em lâminas histológicas coradas com H&E provenientes de biópsias de feridas (n = 5/grupo) coletadas no 2º dia após a indução cirúrgica da lesão. As regiões da derme com maior densidade de células foram graduadas (TABELA 2), de acordo com o sistema de pontuação histológica proposto por VASCONCELOS et al.(2015) e expressas como intervalo de escores para infiltrado inflamatório, com distinção de polimorfonucleares e mononucleares (AKKOL et al., 2009).

Tabela 2. Escores para avaliação semi-quantitativa de parâmetros relacionados à cicatrização de feridas a nível histológico.

Parâmetros	Ausente (-)	Leve (+)	Moderado (++)	Intenso (+++)
Edema*	0	<50	50	>50
PMN**	0	1-5	6-10	11-20
MNC**	0	1-5	6-10	11-20
PF**	0	10-15	16-25	>26
NV***	0	<5	6-10	>10

\*Porcentagem/campo/seção ; \*\*Células/campo/seção ; \*\*\*Capilares/campo/seção. PMN : células polimorfonucleares ; MNC : células mononucleares ; PF : proliferação de fibroblastos ; NV : neovascularização. Fonte: (VASCONCELOS et al., 2015).

#### **4.6.2.4 Avaliação de Fibroplasia**

A quantificação dos fibroblastos foi realizada a partir de 8 fotomicrografias, adquiridas no aumento de 400x, de lâminas de biópsias de feridas coletadas no 14<sup>o</sup> dia após a cirurgia. As imagens foram capturadas de 4 regiões na derme papilar (superior) e 4 regiões na derme reticular (inferior) no leito de cada ferida (n=5/grupo).

A quantificação das células foi realizada pelo programa *ImageJ*® versão 1.46 utilizando o plugin “*Cell counter*”, do *software* *ImageJ*®. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  EPM do número de fibroblastos de cada ferida (ANDRADE *et al.*, 2011).

#### **4.6.2.5 Avaliação da colagênese**

A quantificação do colágeno foi realizada a partir de 6 fotomicrografias, adquiridas no aumento de 400x, de lâminas de biópsias de feridas coletadas no 14<sup>o</sup> dia após a cirurgia. As imagens foram capturadas abrangendo 3 regiões da derme superior e 3 da derme inferior de cada lesão (n=5/grupo).

Cada fotomicrografia foi desmembrada em 15 imagens (372x272 pixels) e, em seguida, analisadas pelo programa *ImageJ*® versão 1.46, utilizando o plugin “*Colour deconvolution*” para a coloração “*Azan-Mallory*”, onde somente a coloração azul foi mensurada pelo outro *plugin* “*Threshold*”, no qual permite a obtenção do resultado em porcentagem de colágeno existente em cada imagem equivalente ao número total de pixels, sendo o resultado expresso pela média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de cada ferida (ANDRADE *et al.*, 2011).

#### **4.6.2.6 Avaliação de mastócitos íntegros e degranulados**

Para avaliar a participação dos mastócitos durante o processo cicatricial, foram selecionadas lâminas histológicas representativas das feridas excisionais nos dias (2, 7 e 14) após a indução da lesão.

Com o auxílio de um microscópio óptico (aumento de 400x), 15 campos por ferida foram selecionados aleatoriamente, dispostos a partir das bordas da

lesão para diferenciação de mastócito íntegro (I) e degranulado (D), cuja soma representa o número total de mastócitos.

A contagem permitiu quantificar mastócitos íntegros e degranulados por campo (n=5/dia/grupo). A percentagem de mastócitos degranulados foi estimada utilizando a seguinte fórmula: percentagem de mastócitos degranulados (%) = (número de mastócitos degranulados / número de mastócitos totais) × 100 (MATSUMURA, 2007).

#### **4.6.2.7 Avaliação da re-epitelização**

A re-epitelização dos tecidos foi avaliada por microscopia óptica com um aumento de 100x em secções de feridas coletadas 14 dias após a cirurgia. Todas as secções histológicas foram graduadas e avaliadas semi-quantitativamente (TABELA 2), e expressas como intervalo de escores em parâmetros relacionados a cicatrização de feridas (VASCONCELOS *et al.*, 2015; AKKOL *et al.*, 2009).

Para análise da espessura da epiderme recém formada foram obtidas fotomicrografias de lâminas coradas pelo método de H&E (aumento de 400x) e analisadas pelo *software ImageJ®*.

Ao longo do novo epitélio, a espessura foi obtida por 20 medidas da camada basal à granular, excetuando-se o extrato córneo (queratina) no 14<sup>o</sup> dia (BARANOWSKY *et al.*, 2010). Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão da média (EPM) de espessura do novo epitélio (µm).

#### **4.7 Avaliação dos mediadores-alvos da resposta cicatricial**

Os mediadores (MPO, NO, citocinas IL-1β e IL-6 e MDA) envolvidos na fase inflamatória e proliferativa da cicatrização foram investigados por meio de técnicas bioquímicas e imunoenzimáticas, descritas a seguir, após a aplicação tópica de hidrogéis Hemi e HgCpPII 0,2% no modelo experimental de cicatrização.

#### **4.7.1 Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)**

Amostras de feridas excisionais coletadas no dia 2 pós-cirurgia (n=5/grupo) foram utilizadas para determinação de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) de acordo com metodologia descrita (SOUZA *et al.*, 2001). Esta enzima está presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos sendo indicativa de infiltração de polimorfonucleares durante a fase inflamatória da cicatrização.

Os tecidos coletados foram incubados em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio) na proporção de 50 mg de tecido por mL, homogeneizados em *POLITRON*<sup>®</sup> e centrifugados (1500 g/15 min a 4°C).

O sobrenadante obtido foi transferido para um eppendorf e submetido ao choque térmico no *pellet* de células em três etapas de congelamento e descongelamento (- 20°C; 10 minutos cada). O sobrenadante foi novamente centrifugado (1500 x g; 15 min a 4°C) para melhor remoção de contaminantes.

Em seguida, as amostras foram plaqueadas (duplicatas de 7µL em placas de 96 poços) e adicionado 200 µL da solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL H<sub>2</sub>O).

A leitura da reação foi obtida em comprimento de onda 450 nm (no tempo zero e novamente após 1 minuto) em leitor de ELISA. A mudança na absorbância foi plotada em uma curva padrão de neutrófilos, expressa como neutrófilos/mg de tecido.

Os valores obtidos foram expressos como unidade de atividade da enzima mieloperoxidase por miligrama de tecido (UA MPO/mg de tecido) e interpretada como infiltração de neutrófilos no tecido.

#### **4.7.2 Determinação dos níveis de nitrito**

Amostras do tecido de feridas excisionais (n=5/grupo) provenientes dos dias 2 e 7 após a cirurgia foram utilizados para determinação do conteúdo total de nitrato/nitrito (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) pela reação de Griess como um indicador da produção de óxido nítrico (CHEN *et al.*, 2000).

Após coletadas, as amostras foram pesadas, homogeneizadas com auxílio de um *POLITRON*<sup>®</sup> em uma solução resfriada de cloreto de potássio (KCL)

a 1,15% (homogenato a 10%) e centrifugadas (1500 x g; 15 minutos) para obtenção do sobrenadante.

O sobrenadante do macerado foi plaqueado (placas de 96 poços) em duplicata (80 µL de cada amostra) e incubados em uma solução (0,04 mL de nitrato redutase, NADPH, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e água destilada) “overnight” para que o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> das amostras fosse convertido em NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

No dia subsequente, uma curva-padrão de referência de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, a partir de uma diluição seriada de uma solução de NaNO<sub>2</sub> foi preparada e plaqueada. Foram adicionados 80 µL da solução de Griess (1% de sufamilamida em 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina dihidroclorato/água destilada/1:1:1:1) em cada poço.

A coloração púrpura/magenta obtida pela reação, foi medida em leitor de ELISA com filtro de 540 nm (Green *et al.*, 1982). Os valores obtidos para as amostras experimentais foram expressos em µM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), usando como referência a curva padrão de nitrito para a obtenção dos valores (CHEN *et al.*, 2000).

#### **4.7.3 Dosagem *in situ* de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e IL-6)**

Amostras dos tecidos de feridas excisionais (n=5/grupo) foram coletadas no dia 2 após a cirurgia, para dosagem de IL-1β e IL-6. Os tecidos coletados foram homogeneizados individualmente em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4, e processados como descrito por Safieh-Garabedian e colaboradores (1997).

A detecção de IL-1β e TNF-α foi determinada no sobrenadante do macerado da amostra por ELISA (CUNHA *et al.*, 1986). Placas de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo anti-IL-1 ou anti-IL-6 murino (4µg/mL ou 0,8µg/mL; kit da R&D systems- Cat. N° DY401).

Após bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 24h a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05% SIGMA) e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti-IL-1 ou anti-IL-6 diluídos (1:1000 com BSA/Tween 1%).

Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50 µL do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foram adicionados. Decorridos 15 minutos, o reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50µL) foi adicionado e as placas incubadas na ausência de luz a 37°C por 15 a 20min. A reação enzimática foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) e a densidade óptica medida a 490nm em espectrofotômetro para IL-1 e IL-6.

As concentrações de citocinas contidas nas amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão com 11 pontos, obtida por diluição seriada, sendo as concentrações iniciais de 4000 pg/mL para IL-1β e 1500 pg/mL para IL-6.

Os resultado relatados como média ± erro padrão da média (EPM), foram expressos em picograma de citocinas/mL (pg/mL) de sobrenadante/mg de tecido.

#### **4.7.4 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A peroxidação lipídica do homogenato da pele foi quantificada pela formação de substâncias reativas tiobarbitúricas (TBARS) e determinadas por método colorimétrico que consiste na reação dos aldeídos formados cujo principal representante é o malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico em meio ácido e sobre o aquecimento por 30 minutos a 100°C em banho-maria (FANEM - Guarulhos, SP, Brasil).

Após a reação é produzido um composto de coloração amarela sendo a amostra lida em espectrofotômetro (UV-Vis Modelo Q98U Quimis - Diadema, SP, Brasil) no comprimento de onda 532 nm (DRAPER; HADLEY, 1990).

Para quantificar o MDA ligado a macromoléculas, as amostras de homogenato (n=5 – coletadas de feridas excisionais nos dias 2 e 7/ tratamento) foram submetidas à hidrólise alcalina seguindo protocolo proposto por (CIGHETTI *et al.*, 1999) com as seguintes modificações: em tubo de ensaio 100 mg de pele foram homogeneizadas com 1,0 mL de KCl 1,15% com o auxílio do homogeneizador Omni (TH) Tissue Homogenizer (Kennesaw, GA EUA).

Em seguida foi adicionado 3 mL de água pura (Milli-Q, Milipore – Bedford, MA, EUA) e 0,5 mL de NaOH 2M. Após agitação em vortex (PHOENIX - Araraquara, SP, Brasil), os tubos foram aquecidos a 60°C por 30 minutos em

banho-maria e, então neutralizados com HCl 2M para seguirem a reação com o ácido tiobarbitúrico.

Os resultados, relatados como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.) foram expressos como atividade de MDA (nM/mg de tecido). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.8 Análise estatística**

A significância estatística foi avaliada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas da média ou Kruskal-Wallis para a mediana. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Graph-Pad PRISM 4.0. e foram considerados significativos em  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos em média  $\pm$  média de erro padrão.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Caracterização microbiológica e físico-química (estabilidade) dos hidrogéis**

Os resultados da avaliação microbiológica e estudo físico-químico caracterizaram os hidrogéis quanto a qualidade na elaboração e estabilidade aos armazenamento e estão apresentados a seguir.

#### ***5.1.1 Avaliação Microbiológica das formulações de hidrogel***

Formulações independentes de hidrogéis, após manipulação e envase, foram submetidas a avaliação microbiológica para detectar eventuais contaminação através do método pour plate para contagem de microorganismos viáveis (BRASIL., 2010). Os resultados das análises microbiológicas estão sumarizados na Tabela 3.

Neste estudo, 8 (oito) formulações de hidrogéis foram analisados, e nenhuma das amostras excederam o limite de microorganismos viáveis para bactérias e fungos, aceitos pela legislação para produtos não-estéreis.

Tabela 3. Avaliação microbiológica das formulações de hidrogel.

Formulações	Microorganismos viáveis (UFC/g)*	
	Bactérias	Fungos
Hemi M	< 1	< 1
Hemi E	< 1	< 1
HgCpPII 0,2% M	2x10 <sup>1</sup>	3x10 <sup>1</sup>
HgCpPII 0,2% E	< 1	< 1
HgCpPII 0,5 % M	< 1	< 1
HgCpPII 0,5% E	0	2x10 <sup>1</sup>
HdIAA-CpPII 0,2% M	< 1	< 1
HdIAA-CpPII 0,2% E	< 1	< 1

Os resultados são dispostos como Unidade Formadora de Colônia (UFC/g) de acordo com o número de microorganismos viáveis. \*Limites permitidos pela legislação: 10<sup>3</sup> UFC/g para bactérias e até 10<sup>2</sup> UFC/g para fungos. Formulações: manipulada (M): envasada (E). Hemi (hidrogel de hemiceluloses); HgCpPII (hidrogel de proteínas laticíferas); HgCpPII-IAA (hidrogel de proteínas laticíferas contendo iodoacetamida 20mM).

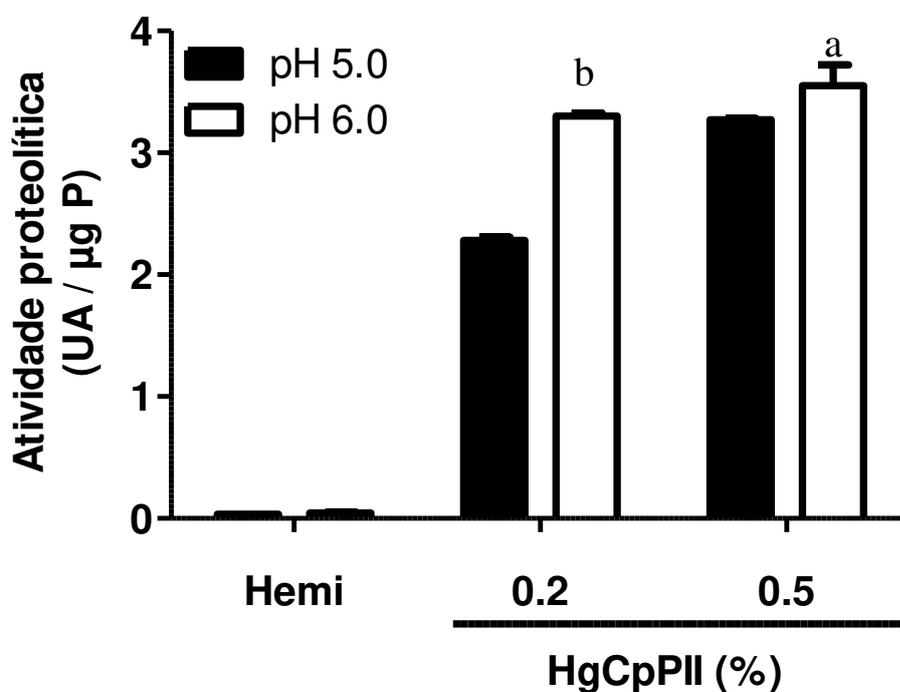
### 5.1.2 Avaliação físico-química

A avaliação físico-química e macroscópica das formulações iniciou-se após 24h de elaboração e durante 365 dias de armazenamento a 4 °C. Ambos hidrogéis possuíam aspectos homogêneos com 24h de manipulados. Após elaboração, os hidrogéis contendo somente hemicelulose apresentaram coloração transparente enquanto que os hidrogéis contendo a fração CpPII apresentaram uma cor levemente amarelada.

### 5.1.2.1 Atividade proteolítica de proteínas laticíferas em hidrogel a pH 5.0 e pH 6.0.

A atividade proteolítica (Figure 15), de proteínas laticíferas (extrato e formulações em gel), foi medida em dois distintos pHs (5,0 e 6,0). As atividades detectadas em pH 6,0 foram maiores quando comparadas com as atividades medidas em pH 5,0. O hidrogel de hemicelulose também foi avaliado e não apresentou atividade proteolítica em ambas condições testadas.

Figura 15 – Atividade proteolítica de hidrogéis em pH 5,0 e pH 6,0.



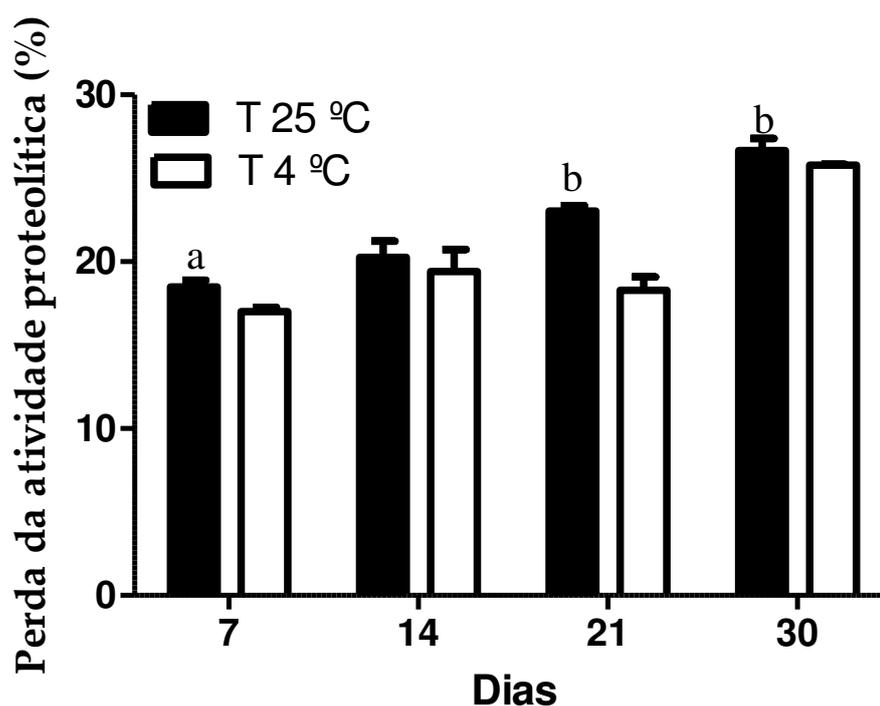
Todos os testes para perda da atividade enzimática foram realizados em triplicata. Resultados foram expressos como Unidade de atividade proteolítica (UAP/μg de proteína). <sup>a</sup>p < 0.05 and <sup>b</sup>p < 0.0001 indica diferença estatística entre diferentes pHs (Teste T student). Azocaseína foi usada como substrato específico. A atividade foi determinada em hidrogéis com 24h de preparo.

### 5.1.2.2 Atividade proteolítica de hidrogel de proteínas laticífera de *Calotropis procera* sobre diferentes temperaturas de armazenamento

A perda da atividade proteolítica de HgCpPII 0,2% foi mesurada após 7, 14, 21 e 30 dias a diferentes temperaturas de armazenamento (4 °C e 25 °C) a fim de investigar a condição de estabilidade do hidrogel (FIGURA 16).

Os resultados indicam que o hidrogel HgCpPII 0,2% armazenado a temperatura de 25°C apresentou maior perda de atividade proteolítica, conseqüentemente menor estabilidade, após 7, 21 e 30 dias quando comparado ao armazenamento a 4 °C ( $p < 0,05$ ).

Figura 16 - Atividade proteolítica em hidrogéis armazenados em diferentes temperaturas por 30 dias.



A atividade foi determinada em hidrogéis (mesmo lote) com 24 h de preparo. Todos os testes para perda da atividade enzimática foram realizados em triplicata. Resultados foram expressos como Unidade de atividade proteolítica (UAP/ $\mu$ g de proteína). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.001$  indica diferença estatística entre diferentes temperaturas (Teste T student). Azocaseína foi usada como substrato específico. A atividade foi determinada em hidrogéis com 24 h de preparo.

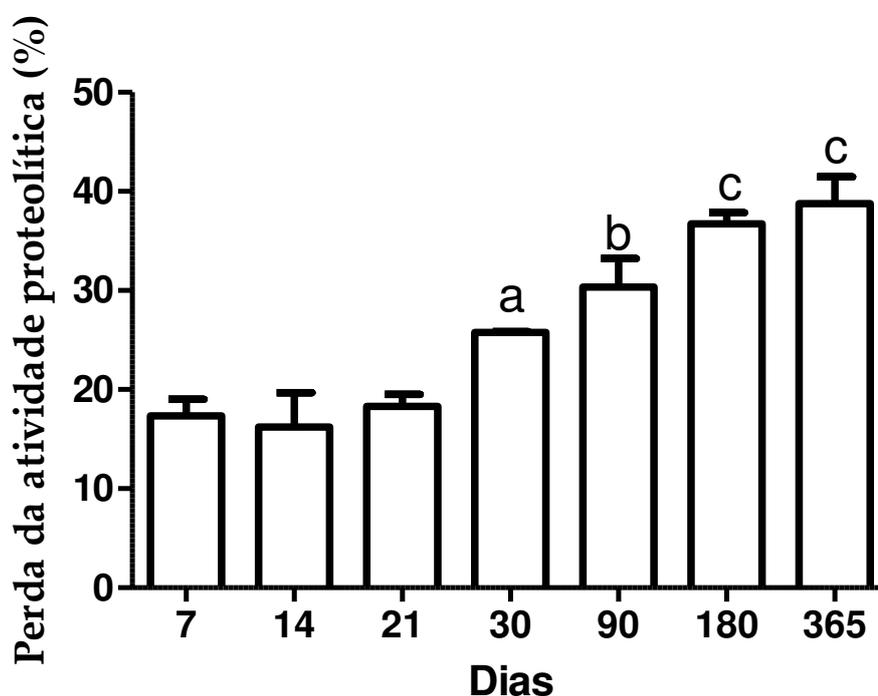
### 5.1.2.3 Estabilidade dos hidrogéis ao armazenamento a 4 °C por 365 dias

A fim de obter uma garantia de estabilidade do hidrogel de proteínas laticíferas ao armazenamento durante um maior período de tempo, avaliou-se a atividade proteolítica, pH e características organolépticas após 7, 14, 21, 30, 90, 180 e 365 dias de armazenamento a 4 °C (FIGURA 17).

No presente experimento, a perda da atividade proteolítica aumentou significativamente após 30, 90, 180 e 365 dias de armazenamento quando comparada com os valores da atividade medida no hidrogel após 24h de preparo.

Ao longo de 365 dias não houve alteração nos valores de pH, durante armazenamento das amostras a 4 °C. As características organolépticas de coloração, odor, aparência e consistência também permaneceram inalteradas sem separação de fases durante todo o tempo de armazenamento a 4 °C.

Figura 17 – Estabilidade a longo prazo do hidrogel (0,2%) armazenado a 4°C estimado pela perda da atividade proteolítica.



Testes para a perda da atividade enzimática realizados em triplicata. <sup>a</sup>p < 0,05, <sup>b</sup>p < 0,01 and <sup>c</sup>p < 0,001 indicam diferença estatística comparada com dia 7 (Teste T student). Os ensaios foram realizados como citado em materiais e métodos.

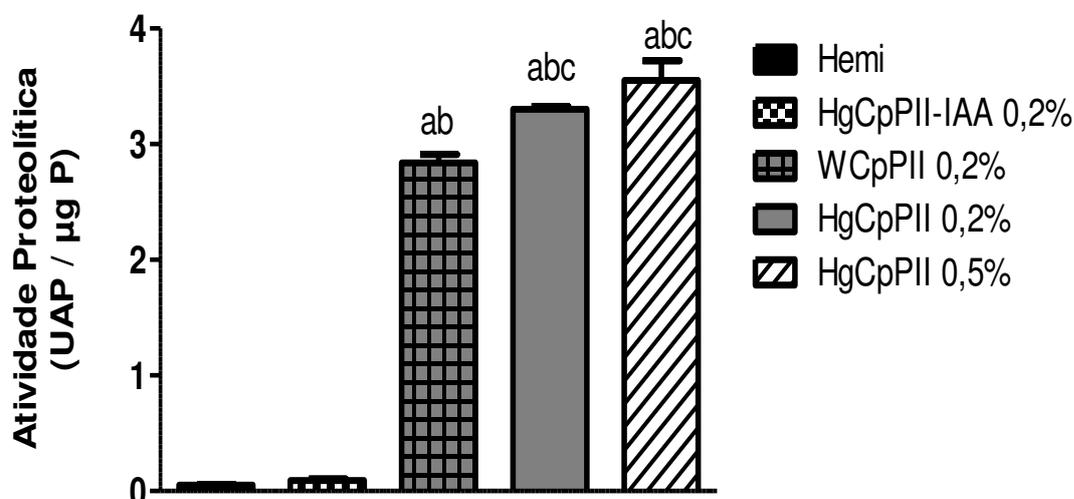
#### 5.1.2.4 Atividade proteolítica das formulações testadas nos ensaios *in vivo*.

A figura 18 representa a atividade proteolítica (AP) das amostras elaboradas e testadas nos ensaios *in vivo*. A atividade proteolítica foi determinada usando Azocaseína como substrato em amostras após 24 horas de preparo.

O resultado da atividade proteolítica revela que a amostra HgCpPII-IAA 0,2% foi inibida por iodoacetamina 20 mM e não diferiu do grupo controle contendo apenas hemiceluloses ( $p > 0,05$ ).

Os grupos contendo a fração CpPII apresentaram atividade proteolítica superior aos grupos hemi e ao HgCpPII-IAA ( $p < 0,05$ ) sendo a atividade maior quando a proteína está incorporada ao hidrogel como veículo do que dissolvida em água ( $p < 0,05$ ). Os hidrogéis a 0,2% e 0,5% não diferiram entre si quanto a AP ( $p > 0,05$ ).

Figura 18 – Atividade proteolítica das formulações testadas nos ensaios *in vivo*.



A atividade proteolítica foi determinada em pH 6.0 usando Azocaseína como substrato após 24 horas de preparo. Todos os testes para a atividade enzimática foram realizados em triplicata. <sup>a</sup> $p < 0,0001$  e <sup>b</sup> $p < 0,0001$  indica diferença estatística comparada aos grupos Hemi e HgCpPII-IAA respectivamente. <sup>c</sup> $p < 0,01$  indica diferença estatística comparada ao grupo WCpPII 0,2% (ANOVA seguido do teste Bonferroni).

## **5.2 Efeito do tratamento tópico com hidrogel HgCpPII 0,2% em teste de irritabilidade dermal em camundongos**

Neste ensaio foram investigados a biocompatibilidade dérmica de amostras de hidrogéis de proteínas laticíferas a 0,2% e hidrogel de hemicelulose (Hemi), em diferentes modelos de irritabilidade dermal conforme protocolo I (Figuras 12).

Após desafio em pele íntegra e escarificada, com aplicação das amostras em doses únicas e múltiplas, reações cutâneas (edema e eritema) foram graduadas em escores de irritabilidade dérmica e permitiram calcular o índice de irritabilidade cutânea primária (IIP). Os resultados estão apresentados a seguir.

### ***5.2.1 Modelos de irritabilidade dermal em pele íntegra e escarificada***

A Irritação dermal (Figura 19 A, B, C) foi avaliada por 7 dias consecutivos através de medidas na espessura da derme antes e após aplicação dos tratamentos (50 $\mu$ L de hidrogel/24 h), usando um micrômetro.

Foram acompanhados diariamente e graduados em escores quando observado a presença de edema ao desafio na pele com o hidrogel a 0,2%.

No teste de Irritação com uma dose em modelo de pele íntegra (Figura 19 A). Apesar de haver uma tendência ao aumento da espessura nas 3 primeiras horas de aplicação do hidrogel HgCpPII 0,2%, este resultado não foi significativo quando comparado com os grupos controles Sham e Hemi.

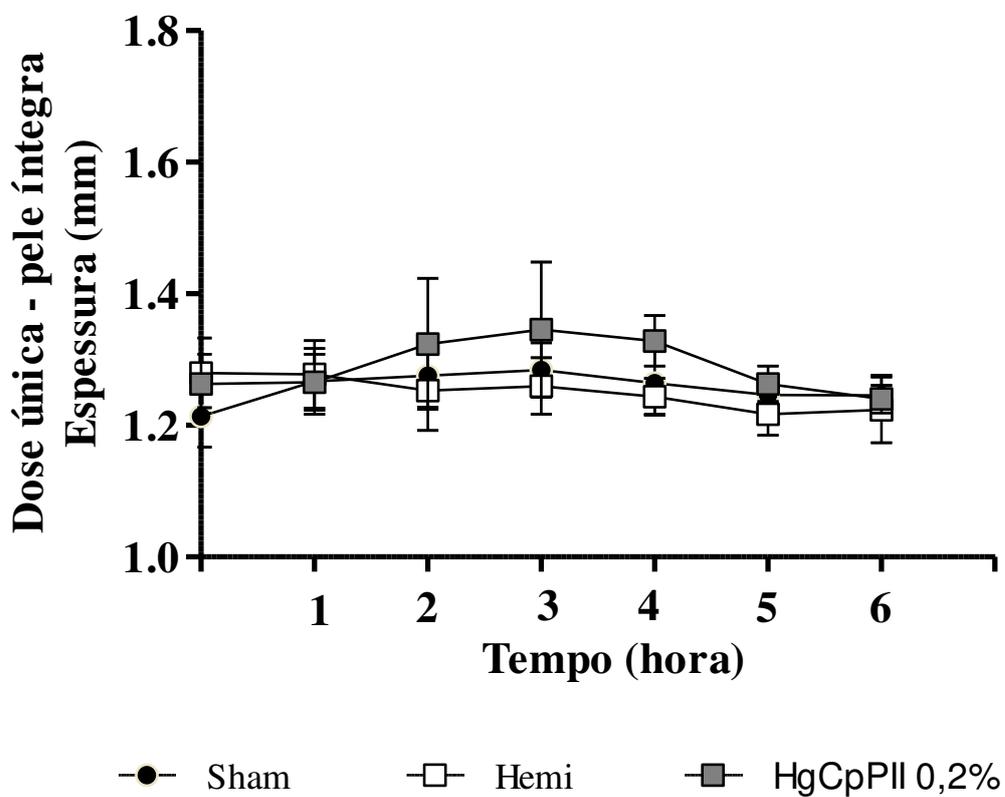
No teste de irritabilidade em pele intacta com doses cumulativas ao longo de 7 dias (Figura 19 B), também não houve diferença da espessura da pele após tratamento tópico com HgCpPII 0,2%.

No teste de múltiplas-doses em modelo de pele escarificada (Figura 19 C), o grupo HgCpPII 0.2% apresentou sinais flogísticos de edema e eritema mais intensos nos primeiros 3 dias de teste ( $p < 0.05$ ).

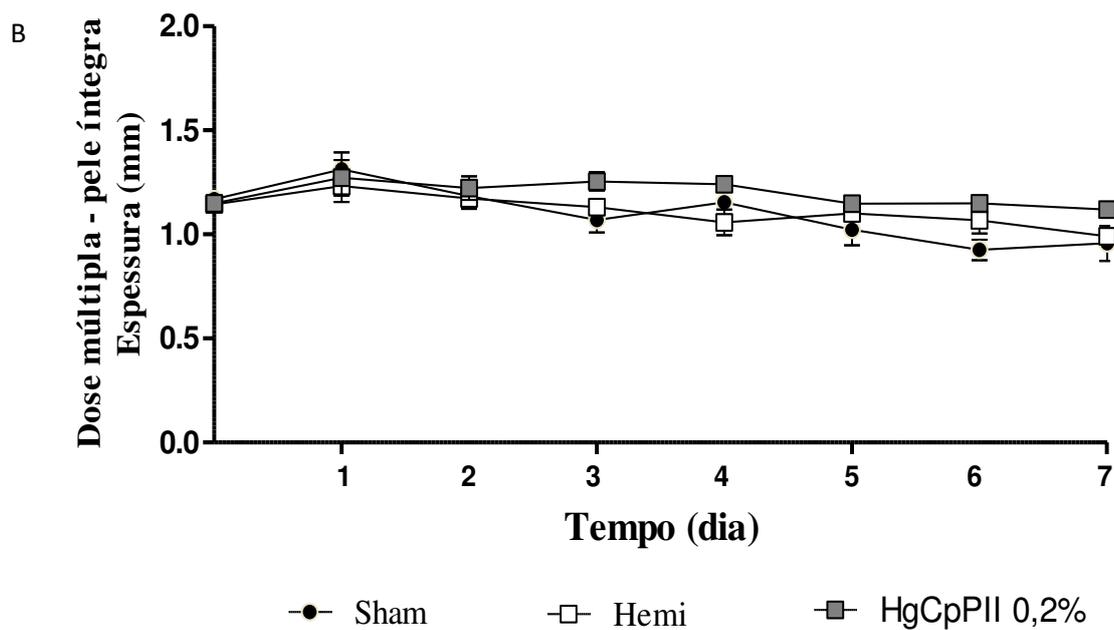
No dia 3, os resultados da espessura da pele para este grupo foi significativamente maior ( $1,857 \pm 0,202$ ) quando comparado ao grupo Hemi ( $1,543 \pm 0,051$ ) e grupo Sham ( $1,491 \pm 0,107$ ). Após o 4<sup>o</sup> dia de experimento, a espessura da pele tendeu a diminuir em todos os grupos ( $p > 0.05$ ).

Figura 19. Efeito do tratamento tópico com hidrogel de proteínas laticíferas de *C. procera* (HgCpPII 0,2%) em modelos de irritação cutânea.

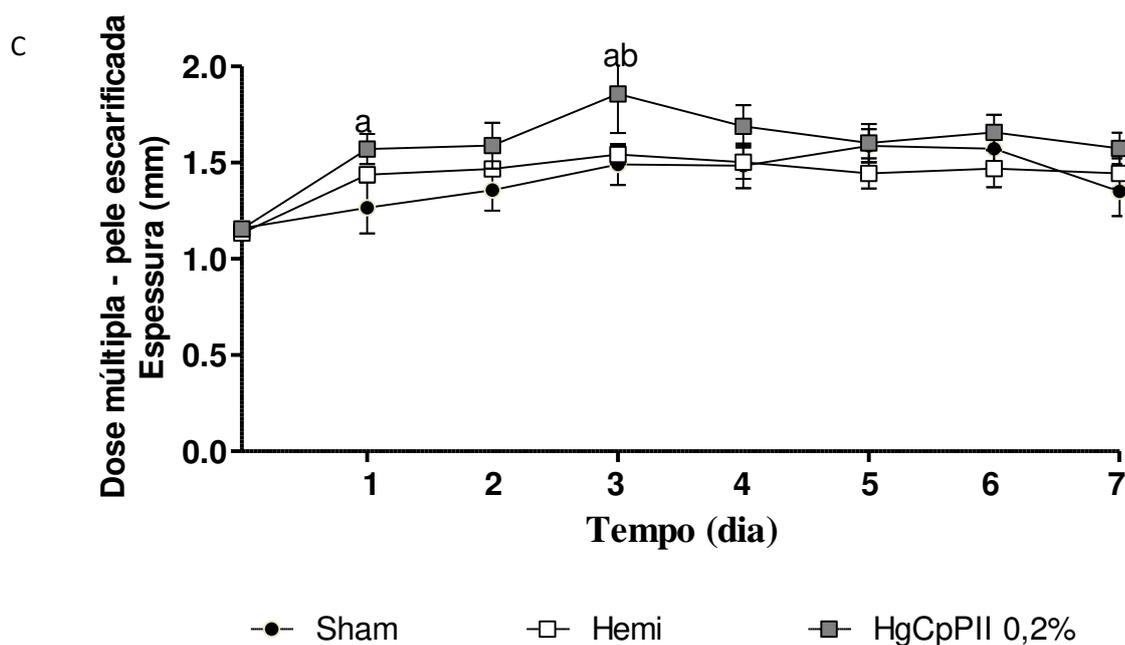
A



(A) teste de irritação de uma dose para pele íntegra.



(B) teste de irritação de doses múltiplas para pele íntegra.



(C) teste de irritação de múltiplas doses para pele escarificada.

Modelo de irritação da pele: as medidas de espessura em pele íntegra e na pele escarificada foram obtidas antes e após a aplicação dos tratamentos (50 $\mu$ L de hidrogel / cada 24 h), utilizando um micrômetro. (A) teste de irritação de uma dose para pele íntegra; (B) teste de irritação de doses múltiplas para pele íntegra; (C) teste de irritação de múltiplas doses para pele escarificada. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E. P. M) da espessura da pele (mm). <sup>a</sup>p < 0,01 indica diferença estatística em relação ao Sham e <sup>b</sup>p < 0,05 indica diferença estatística em relação ao grupo Hemi - (n = 6 animais / grupo, teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

### **5.2.2 Escore de Irritabilidade dérmica após teste tópico com hidrogel HgCpPII 0,2%.**

A Tabela 4 apresenta os Escores de Irritabilidade Dérmica (EID) após o desafio com a aplicação tópica de hidrogéis Hemi e HgCpPII a 0,2%. O resultado representa médias de escores para diferentes graus de reações da formação de edema e aparecimento de eritema em modelos de teste de irritação em pele íntegra e escarificada.

De acordo com a escala de Draize, o grupo HgCpPII a 0,2% apresentou intensidades de reações na pele como edema (0,800) e hiperemia (1,167), revelando maiores escores de irritabilidade dérmica que o grupo Sham (0,367: 0,867) e Hemi (0,600; 0,867) em modelo de irritação em pele escarificada ( $p < 0,05$ ).

Os escores relativos a edema e eritema em pele íntegra foram inferiores ao modelo em pele escarificada e não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela. 4. Escores de Irritação dermal após aplicação tópica de hidrogéis de hemiceluloses e proteínas laticíferas.

	INTEGRA		ESCARIFICADA	
	Edema	Eritema	Edema	Eritema
<b>Sham</b>	0,000	0,000	0,367	0,867
<b>Hemi</b>	0,033	0,000	0,600	0,867
<b>HgCpPII 0,2%</b>	0,017	0,000	0,800 <sup>a</sup>	1,167 <sup>ab</sup>

Total de escores do teste de edema e eritema após aplicação de hidrogéis de hemiceluloses (Hemi) e hidrogéis contendo fração CpPII a 0,2% de proteínas laticíferas, em pele intacta e pele escarificada. A graduação para a irritação da pele seguiu a seguinte classificação: 1- ausente; 2-leve; 3-moderado; 4-intenso (DRAIZE et al.,1944). Os resultados foram expressos como médias para edema e hiperemia em 24 e 72 horas após aplicação das amostras. <sup>a</sup> p < 0,05 indica diferença estatística comparada com o grupo Sham (n = 6 animals/grupo, Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn).

### 5.2.3 Índice de Irritação Primária em teste de irritabilidade dérmica de hidrogéis

A Tabela 5 mostra o índice de Irritação Primária (IIP) após avaliação do hidrogel HgCpPII 0,2% em pele íntegra (PI) e pele escarificada (PE). Não foi observado nenhum sinal de corrosão na pele de animais tratados com hidrogel Hemi e HgCpPII 0,2% quando comparados com o grupo de controle Sham.

O total de escores para ambos os modelos de Irritação em PI e PE, foram respectivamente 0,03 IIP e 0,98 IIP indicando que a formulação de hidrogel HgCpPII a 0,2% (m/v) não é irritante para uso dérmico.

Tabela 5. Hidrogel de Proteínas fitomoduladoras HgCpPII 0,2% não é irritante para aplicação dérmica.

	<b>Pele íntegra (PI)</b>	<b>Pele escarificada (PE)</b>	<b>Classificação (IIP)</b>
Sham	0.00	0.62	Não irritante
Hemi	0.02	0.73	Não irritante
HgCpPII 0.2%	0.03	0.98 <sup>ab</sup>	Não irritante

Critério de escores totais, foi calculado como a média aritmética das leituras de edema e eritema realizadas em 24 e 72 horas, seguida da classificação dos hidrogéis como: não irritante (0 – 0.9), levemente irritante(1 – 1.9), moderadamente irritante(2 – 4.9) e severamente irritante (5 – 8), de acordo com o respectivo valor em parêntese como Índice de Irritação Primária (IIP) - <sup>a</sup> p < 0,05 indica diferença estatística comparada com o grupo Sham e <sup>b</sup> p < 0,05 indica diferença estatística comparada com o grupo Hemi (n = 6 animais/ grupo).

### **5.3 Efeito dos hidrogéis de proteínas laticíferas na cicatrização de feridas**

Para avaliar os efeitos dos hidrogéis de proteínas laticíferas, na cicatrização de feridas, foram utilizadas duas concentrações de hidrogéis de proteínas laticíferas a 0,2% e 0,5% (m/v), conforme protocolo II (Figura 13).

#### ***5.3.1 Análise macroscópica***

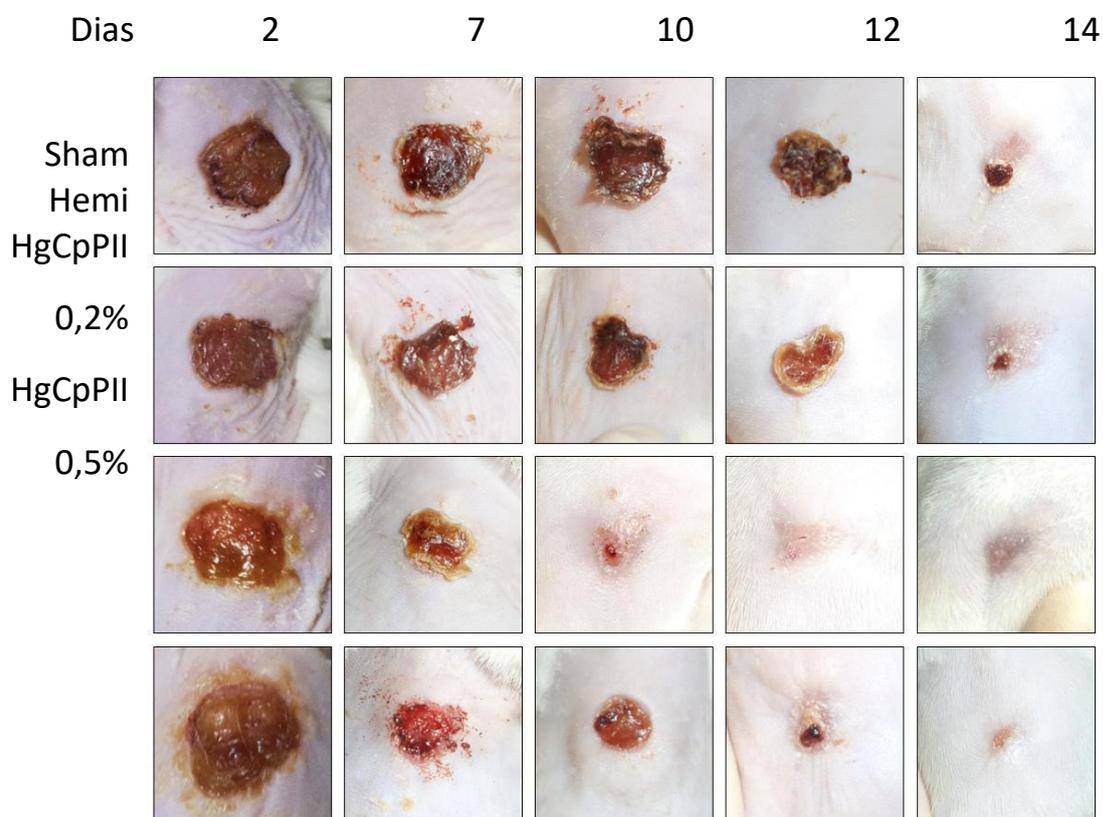
Avaliou-se aspectos macroscópicos das feridas obtendo-se resultados como: sinais flogísticos no 2º dia pós-cirurgia, a queda da crosta do 6º ao 14º dia pós-cirurgia e o progresso da cicatrização durante 14 dias através do percentual de contração das feridas.

##### ***5.3.1.1. Aspectos macroscópicos de feridas excisionais sob o tratamento com hidrogéis contendo a fração protéica (CpPII)***

A análise macroscópica do progresso de cicatrização nas feridas excisionais e o percentual de contração da ferida, determinados ao longo de 14 dias após a cirurgia, estão apresentados nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

No modelo de cicatrização de feridas, todos os grupos analisados apresentaram margens de feridas limpas e sem exsudação durante o período de exame.

Figura 20. Aspecto macroscópico do progresso da cicatrização de feridas após tratamento com hidrogéis CpPII.



As imagens digitais apresentam os aspectos macroscópicos das feridas ao longo de 14 dias e foram selecionadas a partir de animais pertencentes aos grupos experimentais correspondentes. A percentagem de contração da ferida nos dias (2, 7, 10, 12, 14) pós-cirurgia é dada na Figura 15).

### ***5.3.1.2 O tratamento tópico com hidrogel CpPII influenciou os parâmetros de edema e hiperemia tecidual***

No pico do período inflamatório (dia 2), observou-se edema e hiperemia nas feridas excisionais de todos os grupos, embora estes sinais flogísticos fossem mais intensos nas feridas dos animais tratados topicamente com HgCpPII 0,5%, em relação aos grupos Sham ( $p < 0,001$ ) e hemiceluloses ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 20 e TABELA 6).

A partir do 2º dia após indução da lesão, todos os grupos apresentaram formação de tecido de granulação o qual foi notado nas bordas da ferida com mais intensidade nos grupos tratados com hidrogel de proteínas laticíferas (FIGURA 20).

Tabela 6. Avaliação semi-quantitativa de sinais flogísticos induzidos por hidrogel contendo proteínas laticíferas.

<b>Grupos</b>	<b>Sinais Flogísticos</b>	
	<b>Edema</b>	<b>Hiperemia</b>
Sham	1 (0-2)	1 (1-2)
Hemi	1 (0-2)	1 (0-3)
HgCpPII 0,2%	2 (0-2)	2 (1-3)
HgCpPII 0,5%	2 (0-3) <sup>bc</sup>	2 (1-3) <sup>a</sup>

Os parâmetros de edema e hiperemia foram observados no 2<sup>o</sup> dia em relação à intensidade (0 - ausente, 1 - leve, 2 - moderada e 3 - intensa) e expressos como mediana e variação, respectivamente. <sup>a</sup>p < 0,05 e <sup>b</sup>p < 0,001 indicam diferença estatística comparada com o grupo Sham e <sup>c</sup>p < 0,05 em comparação com o grupo Hemi (n = 15 animais / grupo, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn).

### ***5.3.1.3 O tratamento tópico com hidrogel CpPII acelerou a queda da crosta das feridas***

A crosta da ferida nos animais tratados com HgCpPII 0,5% começou a cair mais cedo, no dia 6, enquanto que nos outros grupos iniciou-se a partir do dia 8 (TABELA 7). O grupo HgCpPII 0,2% apresentou o maior percentual de queda da crosta (86,67%) a partir do 13º dia pós-cirurgia quando comparados aos grupos HgCpPII 0,5%(80%), Hemi (73,33%) e Sham (53,33%). O aspecto hiperêmico das feridas sem crosta em animais do grupo HgCpPII 0,5% permaneceu evidente até o dia 10 pós-cirurgia.

Isso foi sugestivo de um processo inflamatório mais intenso e prolongado. O aspecto macroscópico das feridas tratadas com hemiceluloses sugeriu menor inflamação e foi comparável ao grupo Sham.

Tabela 7. Hidrogel de proteínas laticíferas (HgCpPII) a 0,2 e 0,5% (m/v) acelera a queda da crosta da ferida.

Dias	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>Grupos</b>									
Sham	0	0	6,67	6,67	13,33	20	40	53,33	86,67
Hemi	0	0	6,67	13,33	26,67	46,67	53,33	73,33	80
HgCpPII 0,2%	0	0	13,33	13,33	33,33	33,33	60	86,67 <sup>abd</sup>	100 <sup>ab</sup>
HgCpPII 0,5%	13,33	13,33	33,33 <sup>abc</sup>	46,67	53,33 <sup>abc</sup>	60	66,67	80	100 <sup>ab</sup>

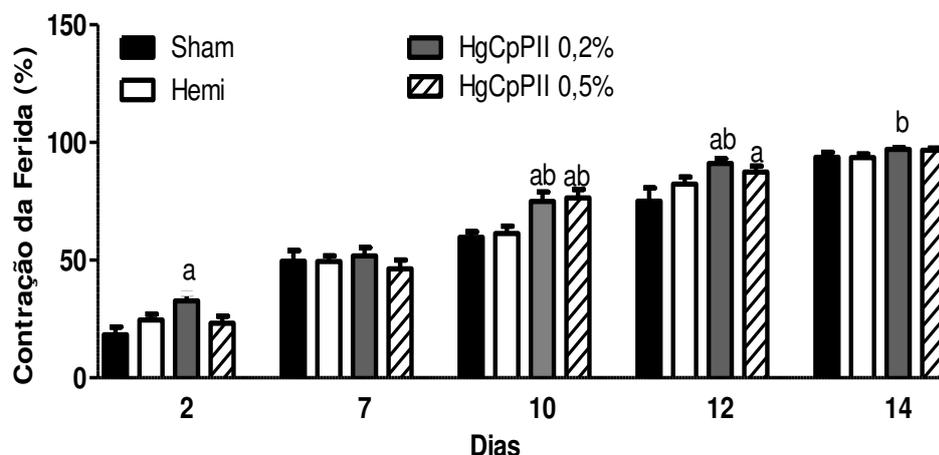
<sup>a</sup>p < 0,05 indica diferença estatística em comparação com o grupo Sham, <sup>b</sup>p < 0,05 em comparação com o grupo Hemi, <sup>c</sup>p < 0,05 em comparação com o grupo HgCpPII 0,2% e <sup>d</sup>p < 0,05 em comparação com o grupo HgCpPII 0,5% (n = 15 animais / grupo, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn).

#### **5.3.1.4 O tratamento tópico com hidrogel CpPII promove a contração das feridas**

A contração da ferida progrediu mais rapidamente nos animais tratados com HgCpPII 0,2% (percentual de contração da ferida no dia 2 (32.63% ± 3.02); dia 10 (90.22% ± 3.18) e dia 12 (97.11% ± 0.67) em comparação com os grupos controles. HgCpPII 0,5% apresentou aumento significativo de fechamento da ferida apenas no dia 10 (87.49% ± 2.48) em comparação ao grupo controle (FIGURA 21).

O processo de cicatrização de todos os grupos seguiu uma evolução normal mostrando a área da ferida não cicatrizada diminuída ao longo de 14 dias, conseqüentemente aumentando o processo de contração da ferida (FIGURA 20 e FIGURA 21). Pela avaliação macroscópica e morfométrica verifica-se que ambos os hidrogéis promoveram a cicatrização, porém, hidrogel contendo fração CpPII a 0,2% revelou maior eficácia.

Figura 21 - Os hidrogéis foram eficientes para promover a contração da ferida.



Porcentagem de contração da ferida no período de tempo até 14 dias após a cirurgia. Os dados são expressos como média  $\pm$  média de erro padrão (S.E.M) da média da contração da ferida (<sup>a</sup>p <0,05 indica diferença estatística em comparação ao grupo Sham e <sup>b</sup>p <0,05 ao grupo Hemicelulose - (n = 15 animais/grupo, Teste ANOVA seguido pelo Teste de Bonferroni).

### 5.3.2 Análise Microscópica

A análise microscópica de seções histológicas relativas ao ensaio de cicatrização conforme protocolos II e III (Figura 13 e 14 respectivamente), obteve resultados como a presença de infiltrado inflamatório de forma semi-quantitativa, no 2º dia pós-cirurgia.

Também foram obtidos resultados qualitativos e quantitativos da degranulação de mastócito, proliferação de fibroblastos, neovascularização, colagênese, re-epitelização e espessura do novo epitélio no 14º dia pós-cirurgia.

#### 5.3.2.1 O tratamento tópico com hidrogéis CpPII aumenta a intensidade do infiltrado polimorfonuclear

Na análise microscópica de biópsias de feridas coletadas no dia 2, foi possível observar em todos os grupos experimentais a presença de infiltrado inflamatório tanto na crosta quanto na derme superior (derme papilar).

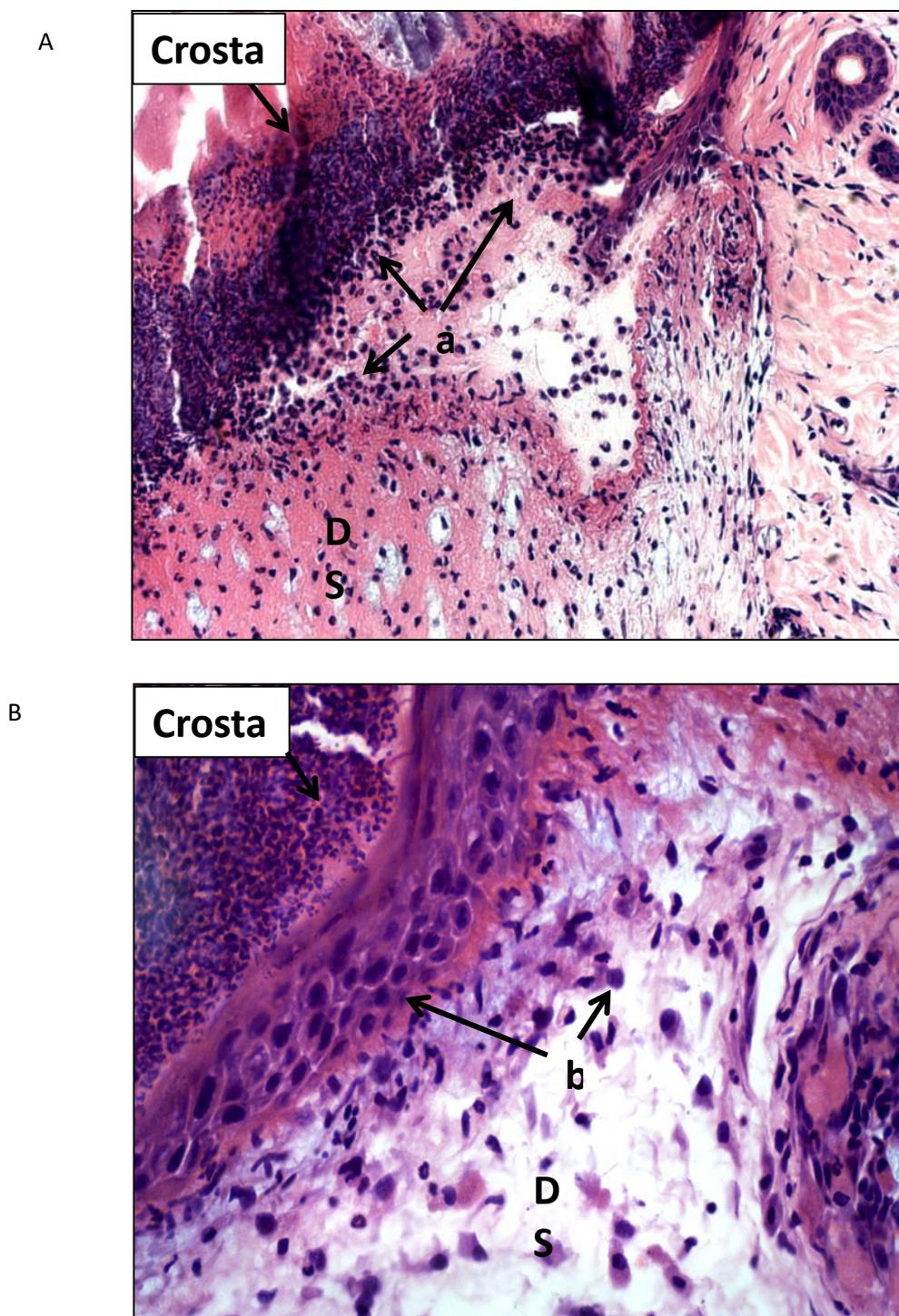
Esse processo ocorreu com maior intensidade nos grupos tratados com hidrogel contendo a fração CpPII, sendo predominante a presença de células mononucleares (TABELA 8 e FIGURA 22).

Tabela 8. Avaliação semi-quantitativa de cortes histológicos no dia 2 e dia 14.

<b>Grupos</b>	<b>Ed</b>	<b>PMN</b>	<b>MNC</b>	<b>PF</b>	<b>NV</b>	<b>RE</b>	<b>U</b>
<b>Dia 2</b>							
<b>Sham</b>	+	++	++	-	-	-	+
<b>Hemi</b>	+	++	++	-	-	-	+
<b>HgCpPII 0.2%</b>	++	++	+++	-	-	-	+
<b>HgCpPII 0.5%</b>	+++	+++	+++	-	-	-	+
<b>Dia 14</b>							
<b>Sham</b>	-	-	-	++	++	+	-
<b>Hemi</b>	-	-	-	+++	++	+	-
<b>HgCpPII 0.2%</b>	-	+	+	+++	+++	+	-
<b>HgCpPII 0.5%</b>	+	+	++	++	+++	+	-

Secções coradas com hematoxilina e eosina no dia 2 e 14 após a cirurgia foram classificadas como leves (+), moderadas (++) e severas (+++) para re-modelação epidérmica e/ou dérmica. Re-epitelização e ulceração foram marcadas como presentes (+) e ausentes (-). Ed: edema; PMN: células polimorfonucleares, MNC: células mononucleares; FP: proliferação de fibroblastos; NV: neovascularização; RE: re-epitelização e U: ulceração. Sham: não recebeu tratamento; Hemi: hidrogel de hemicelulose; HgCpPII 0,2% e 0,5% (mg/ml de fração de proteína CpPII de *Calotropis procera* em hidrogel de hemicelulose).

Figura 22. Infiltrado inflamatório intenso em biópsias de feridas tratadas com hidrogel contendo fração CpPII de proteínas laticíferas



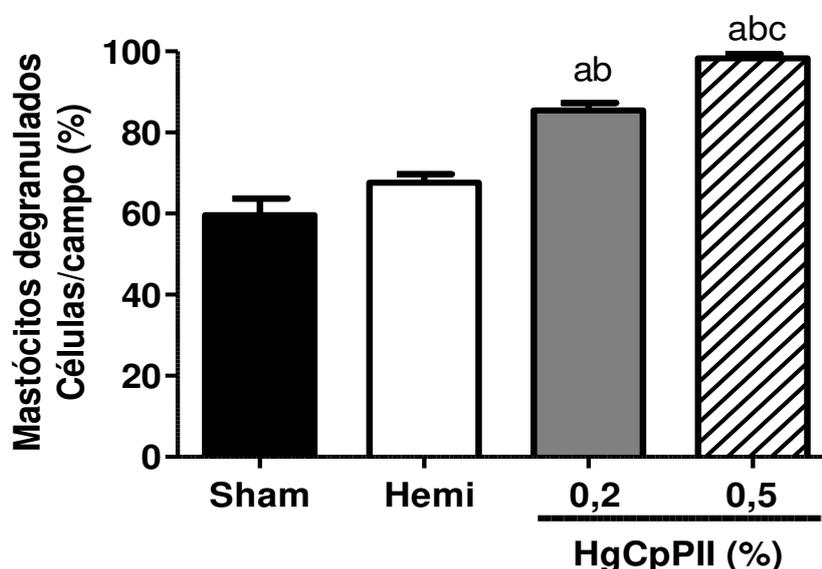
Imagens microscópicas em H&E de seções coletadas de feridas do 2º dia pós-cirurgia. (A) Presença de intenso infiltrado inflamatório (a) na crosta e na derme superior (DS) do grupo tratado com HgCpPII a 0,2%, aumento de 200x. (B) Predominância de células mononucleares em infiltrado inflamatório de feridas excisionais tratadas com HgCpPII 0.5%. Aumento de 400x. Todas as seções histológicas foram coletadas de feridas obtidas no 2º dia após a cirurgia.

### 5.3.2.2 O tratamento tópico com hidrogéis CpPII 0,2% e 0,5% estimulam a degranulação de mastócitos

As lâminas histológicas coradas por azul de toluidina foram confeccionadas com a finalidade de analisar o efeito do tratamento dos hidrogéis contendo CpPII sobre a degranulação dos mastócitos. A avaliação foi feita no 14 após a indução da ferida excisional no tecido correspondente a área lesionada (FIGURA 23).

Os grupos tratados com hidrogéis CpPII a 0,2% e 0,5% apresentaram  $85,49\% \pm 1,76$  e  $98,29\% \pm 1,09$  de mastócitos degranulados respectivamente sendo significativa tal diferença quando comparados aos grupos controles Sham ( $59,59\% \pm 4,16$ ) e Hemi ( $67,67\% \pm 2,03$ ) ( $p < 0,0001$ ). O grupo HgCpPII 0,5% apresentou maior estimulação da degranulação de mastócitos em relação ao grupo HgCpPII 0,2% ( $p < 0,05$ ).

Figura 23. Os hidrogéis de proteínas laticíferas estimulam a degranulação dos mastócitos.

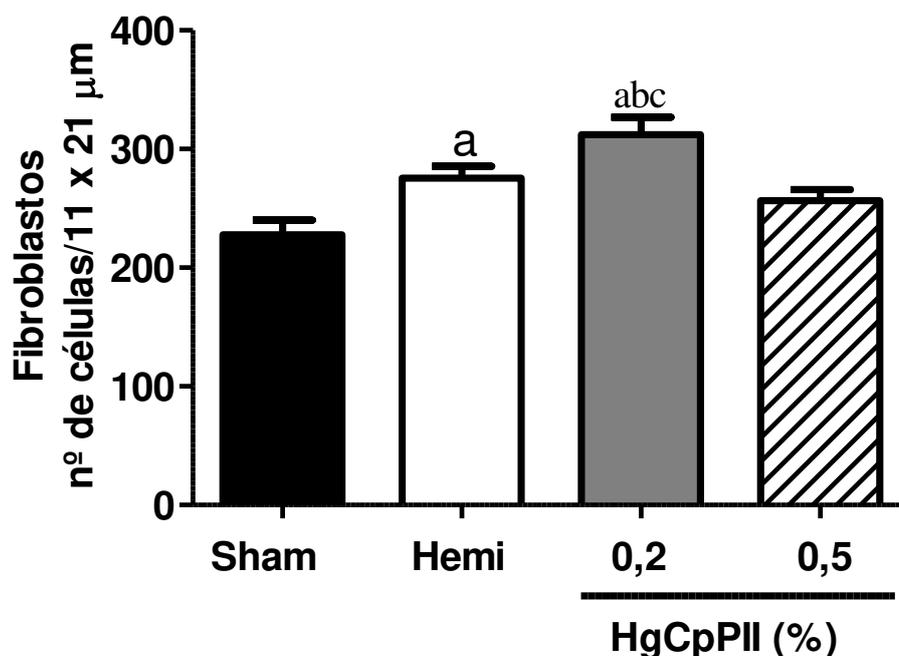


As seções coradas com azul de toluidina foram utilizadas para estimar a degranulação dos mastócitos (aumento de  $400\times$ ) no dia 14 após a cirurgia. Os dados estão expressos como média  $\pm$  média de erro padrão (S.E.M.) do percentual de mastócitos desgranulados. <sup>a</sup> $p < 0,0001$  indicam diferença estatística em comparação com o grupo Sham, <sup>b</sup> $p < 0,0001$  indica diferença estatística comparada com grupo Hemi e <sup>c</sup> $p < 0,05$  em comparação com HgCpPII 0,2% ( $n = 5$  animais/grupo/tempo /experimento, teste ANOVA-Bonferroni).

### 5.3.2.3 O tratamento tópico com HgCpPII 0,2% estimula a fase proliferativa da cicatrização de feridas excisionais

O processo de fibroplasia foi avaliado quantitativamente em lâminas histológicas de feridas excisionais, correspondentes aos dias 14 após a cirurgia (FIGURA 24). Os resultados revelam que HgCpPII 0,2% estimulou maior proliferação de fibroblastos ( $312.3 \pm 14.56$  –  $p < 0,05$ ) quando comparado aos grupos Sham ( $227.9 \pm 12.24$ ) e Hemi ( $275.4 \pm 10.16$ ).

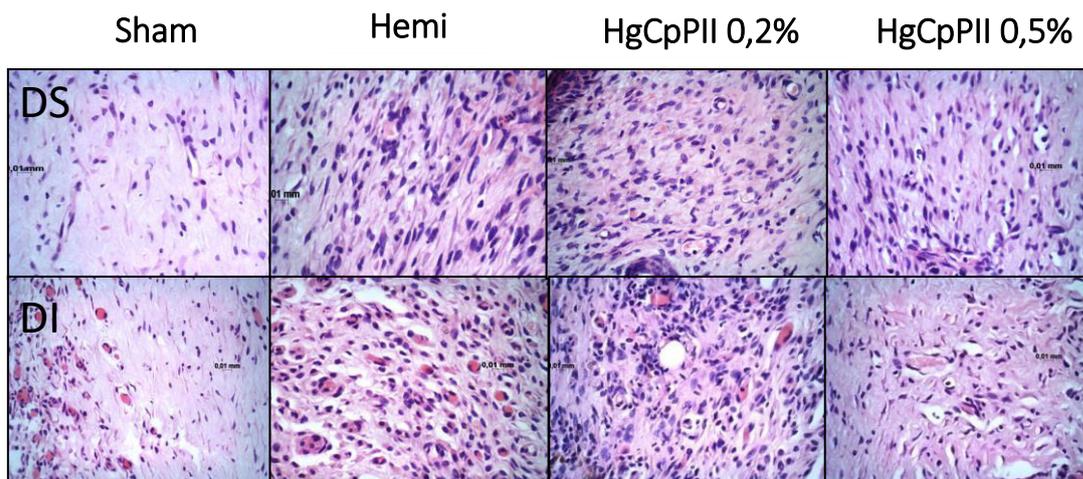
Figura 24. Os hidrogéis de proteínas laticíferas estimulam a fase proliferativa do processo de cicatrização.



Quantificação de fibroplasia nos grupos experimentais no 14<sup>o</sup> dia, pós-cirurgia. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (S.E.M.) do número de fibroblastos. <sup>a</sup> $p < 0,05$  indica diferença estatística em comparação com o grupo Sham, <sup>b</sup> $p < 0,05$  em comparação com grupo Hemi e <sup>c</sup> $p < 0,05$  em comparação com HgCpPII 0,5% (n = 5 animais/grupo/tempo/experimento, teste ANOVA-Bonferroni).

Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas por H&E, no aumento de 400x, foram capturadas para representar o processo de fibroplasia na derme superior (DS) e derme inferior (DI) em todos os grupos experimentais (vide FIGURA 25).

Figura 25. Representação histológica do processo de fibroplasia.

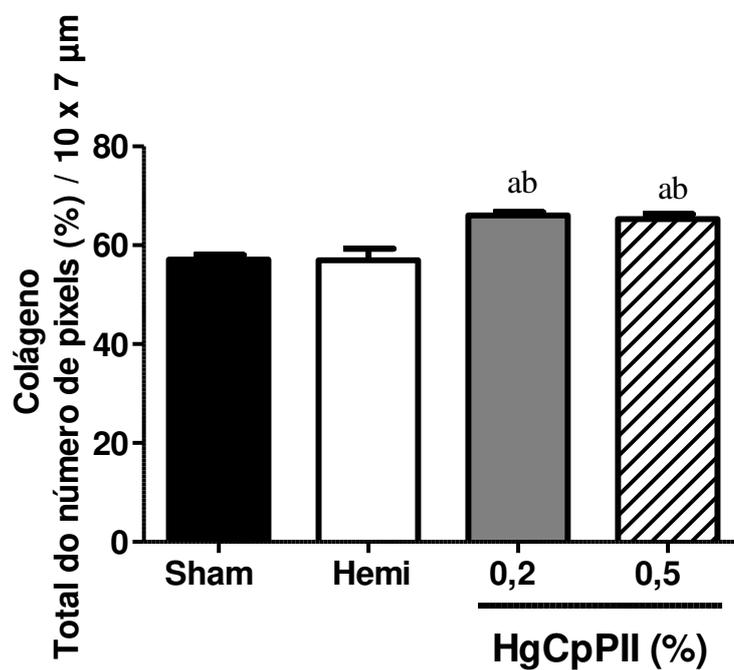


Fotomicrografias de seções histológicas, coradas em H&E, representando a deposição de fibroblastos no dia 14 após a cirurgia (seções acima correspondem a derme superior (DS) e seções para baixo, derme inferior (DI). Aumento de 400x).

#### ***5.3.2.4 Os tratamentos tópicos com hidrogéis CpPII 0,2 e 0,5% intensificam a deposição de colágeno em feridas excisionais***

A colagênese foi avaliada quantitativamente no 14º dias após a indução das feridas excisionais (FIGURA 26). A avaliação quantitativa das seções histológicas mostraram maior deposição de colágeno (DC) nos grupos tratados com hidrogel CpPII a 0,2% e 0,5%, correspondente a 66,04% e 65,31% de deposição de colágeno respectivamente, quando comparados com os grupos controles ( $p < 0.0001$ ).

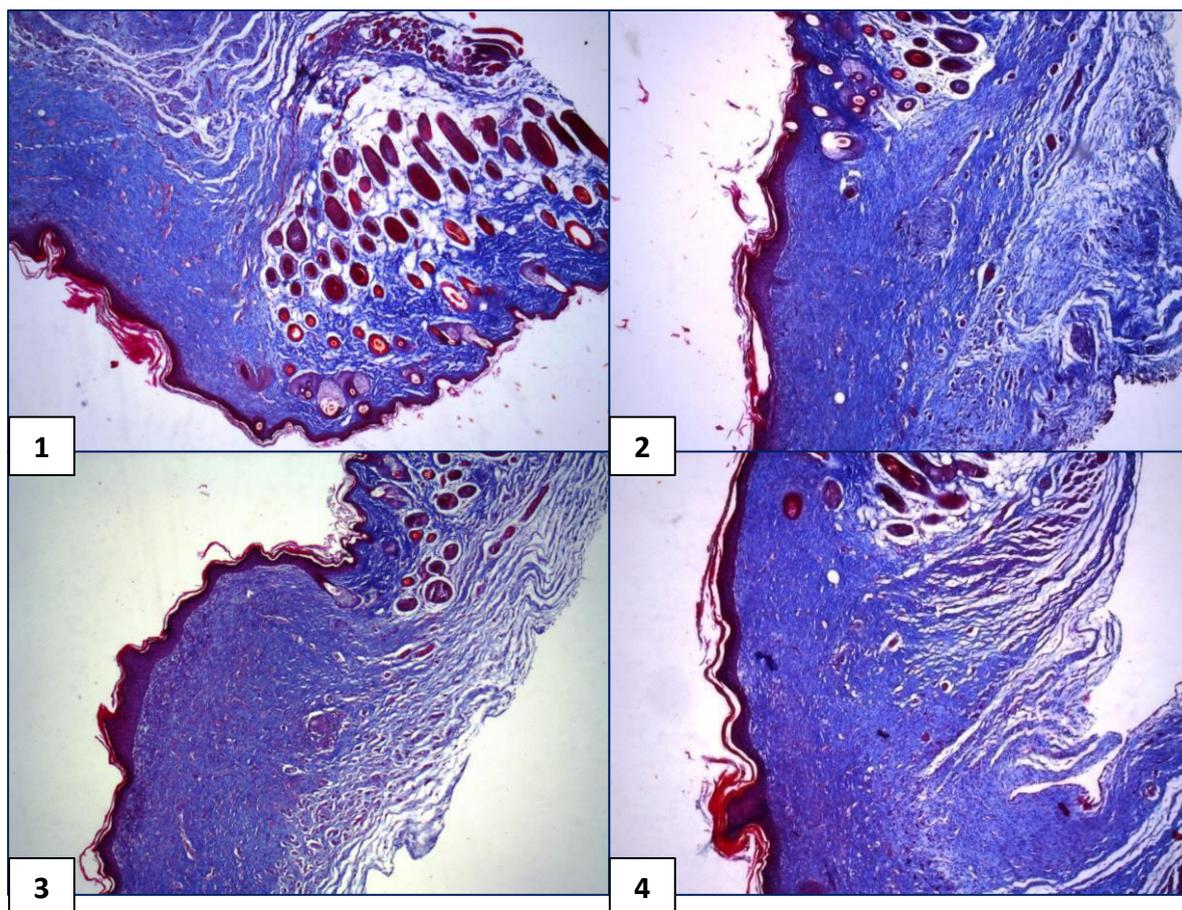
Figura 26. Os hidrogéis de proteínas laticíferas estimulam a colagênese.



Deposição de colágeno nos grupos experimentais no 14<sup>o</sup> dia, pós-cirurgia. Os dados são expressos em percentagem como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.) do número total de pixels para o teor de colágeno. <sup>a</sup> $p < 0,05$  indica diferença estatística em comparação com o grupo Sham, <sup>b</sup> $p < 0,05$  em comparação com grupo Hemi ( $n = 5$  animais/grupo/tempo/experimento, teste ANOVA-Bonferroni).

Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas por Tricrômio de Masson, no aumento de 100x, foram capturadas para representar o processo de colagênese em todos os grupos experimentais. As fibras colágenas foram formadas e dispostas em paralelo a superfície da cama da ferida (FIGURA 27).

Figura 27. Representação histológica do processo de colagênese.



Fotomicrografias de seções histológicas, coradas por Tricômio de masson, representando a deposição de colágeno no dia 14 após a cirurgia. Grupo Sham (1); Grupo Hemi (2); Grupo HgCpPII 0,2% (3) e Grupo HgCpPII 0,5% (4). Aumento de 100x.

### ***5.3.2.5 O tratamento tópico com hidrogéis CpPII 0,2 e 0,5% estimulam o processo de re-epitelização em feridas excisionais***

O exame histológico de amostras de tecido pertencentes a todos os grupos experimentais foi registrado no 14<sup>o</sup> dia após a cirurgia, e estão apresentados na Figura 28. Os dados foram classificados e apresentados na Tabela 8.

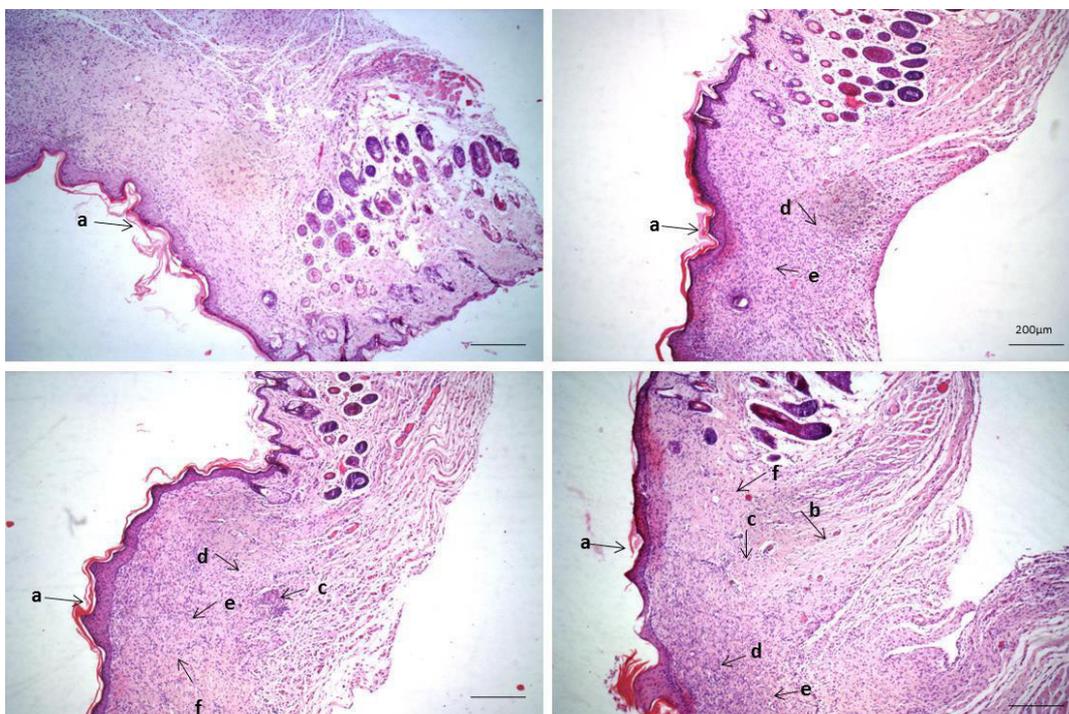
No 14<sup>o</sup> dia, os animais tratados com HgCpPII 0,2% apresentaram tecidos com discreta presença de foco inflamatório remanescente, com predominância de células PMN (FIGURA 28) e intensa proliferação de fibroblastos (TABELA 8)

No grupo HgCpPII 0,5% observou-se apenas uma ligeira formação de edema com presença de inflamação moderada, mas predominância de linfócitos (MNC) próximos aos folículos pilosos, embora pouco significativa (FIGURA 28).

A neovascularização foi mais pronunciada entre os grupos tratados com os hidrogéis quando comparados aos grupos de controle. No entanto, todos os grupos exibiram re-epitelização no dia 14 e não se observou ulceração (TABELA 8).

As setas na Figura 28 indicam a epiderme re-epitelizada com queratina, a formação de novos vasos capilares e a reorganização das fibras colágenas e das papilas dérmicas.

Figura 28. Análises microscópicas de re-epitelização da ferida.

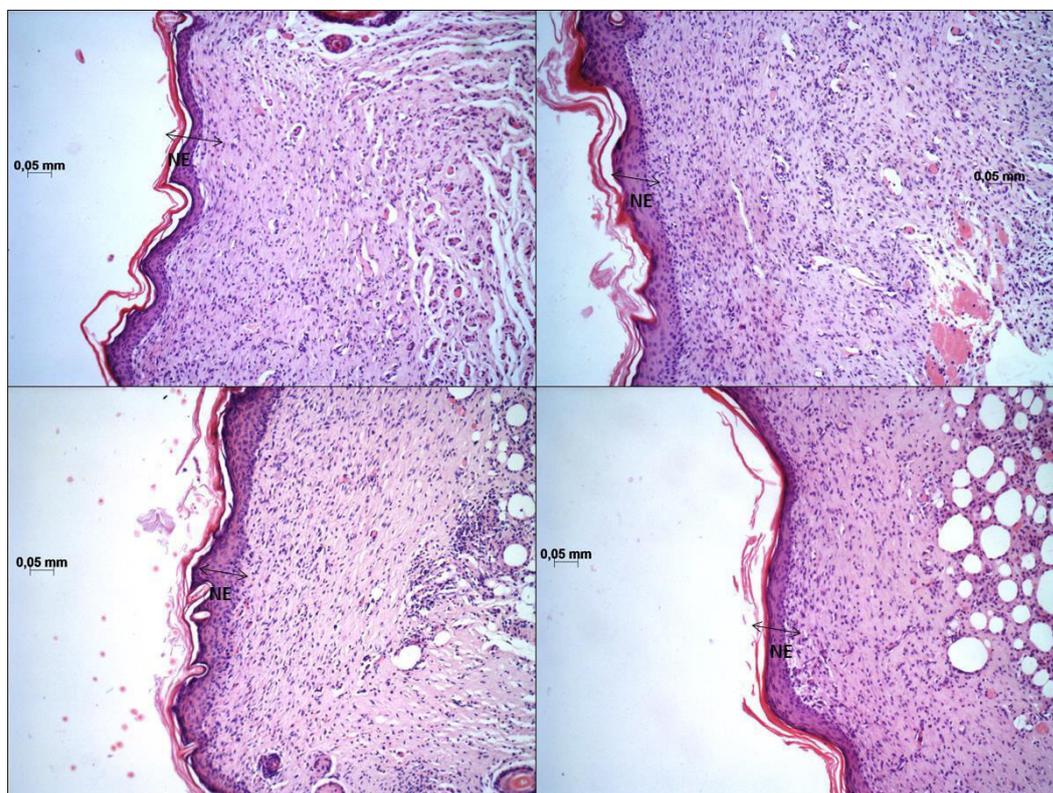


As lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H & E) correspondem aos dados registados no dia 14. (a) re-epitelização da epiderme com queratina; (B) edema; (C) infiltração de células inflamatórias; (D) neovascularização; (E) proliferação de fibroblastos; (F) reorganização das fibras colágenas. Ampliação original: 100 × (Barra de escala: 200 μm). Grupo Sham (A); Grupo Hemi (B); Grupo HgCpPII 0,2% (C) e grupo HgCpPII 0,5% (D).

### 5.3.2.6 O tratamento tópico com HgCpPII 0,2% aumenta a espessura do novo epitélio em feridas excisionais

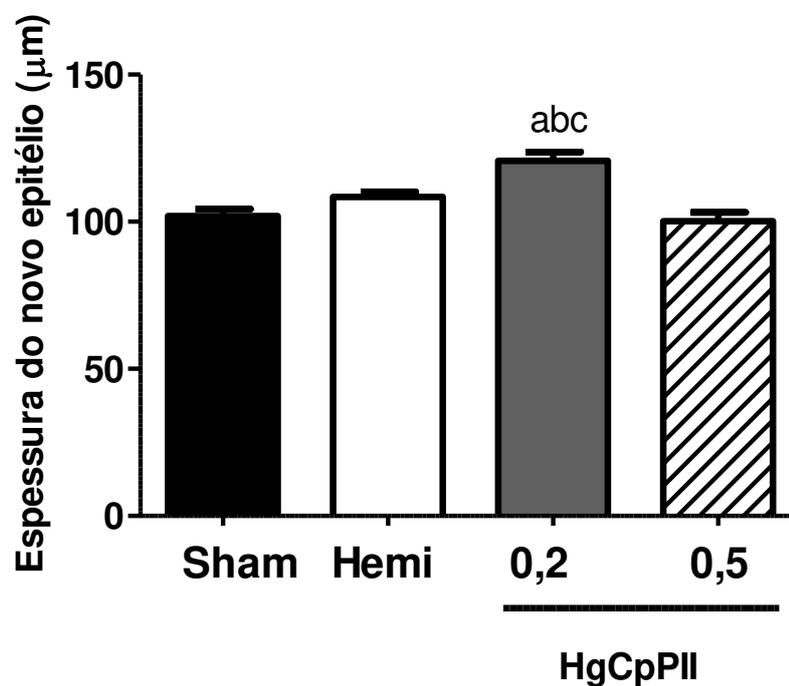
A Figura 29 mostra lâminas histológicas coradas pelo H & E do novo epitélio em diferentes grupos recolhidos no dia 14 pós-operatório e a Figura 24 apresenta os aspectos graduados desses dados. A espessura do epitélio (Figura 30) nos leitos das feridas foi maior no grupo HgCpPII 0,2% ( $120.7 \pm 2.97$ ) diferindo significativamente dos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

Figura 29. Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas com H&E, com ênfase na espessura do novo epitélio (NE).



Foram registradas as imagens de todos os grupos experimentais no 14º dia após a cirurgia (ampliação 40 × - Barra de escala 0,05 mm). Grupo Sham (A); Grupo Hemi (B); Grupo HgCpPII 0,2% (C) e Grupo HgCpPII 0,5% (D). A medida da espessura epitelial média ( $\mu\text{m}$ ) em diferentes grupos no dia 14 após a cirurgia foi calculada e os dados são apresentados na Fig. 24.

Figura 30. O hidrogel CpPII 0,2% aumenta a espessura do novo epitélio no modelo de feridas excisionais.



As medidas da espessura epitelial (µm) em diferentes grupos foram realizadas no dia 14 pós-cirurgia. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (S.E.M) da espessura do novo epitélio. <sup>a</sup>p < 0,0001 indica diferença estatística em comparação com o grupo Sham, <sup>b</sup>p < 0,05 indica diferença estatística em comparação com o grupo Hemi e <sup>c</sup>p < 0,001 indica diferença estatística comparada com o grupo HgCpPII 0,5% - (n = 5 animais / grupo, teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

#### ***5.4 Efeito do tratamento com hidrogel HgCpPII 0,2% sobre os mediadores inflamatórios em feridas excisionais***

A avaliação do efeito dos hidrogéis sobre os mediadores inflamatórios foi realizada nos dias 2 e 7 pós-cirurgia. O hidrogel HgCpPII contendo 0,2% de proteínas laticíferas, foi investigado por ser a menor dose que apresentou atividade biológica no ensaio de cicatrização descrito no protocolo II (Figura 13).

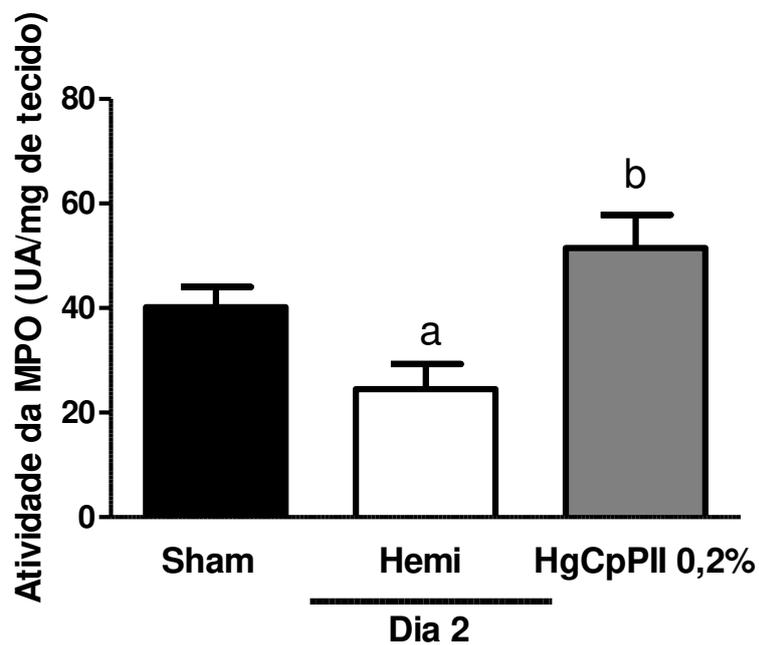
O hidrogel livre de hemiceluloses (Hemi) também foi testado. O grupo Sham, representado por animais que não receberam nenhum tratamento foi utilizado como controle negativo.

Os resultados dos mediadores-alvos (MPO, NO e citocinas pró-inflamatórias IL1- $\beta$  e IL-6) do processo cicatricial produzidos em resposta ao tratamento tópico de hidrogéis Hemi e HgCpPII 0,2% estão apresentados a seguir.

##### ***5.4.1 O tratamento tópico com hidrogel de hemicelulose diminui a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) durante a fase inflamatória da cicatrização em feridas excisionais***

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi mensurada no dia 2 após a indução da lesão (Figura 31). Houve uma significativa redução ( $p < 0,05$ ) na atividade da enzima MPO pelo grupo tratado com hidrogel contendo somente hemicelulose ( $24,47 \pm 4,82$ ) quando comparado ao grupo Sham ( $40,14 \pm 3,86$ ) e HgCpPII 0,2% ( $51,47 \pm 6,36$ ). O grupo HgCpPII 0,2% não diferiu do controle.

Figura 31. As hemiceluloses diminuem a atividade da enzima MPO



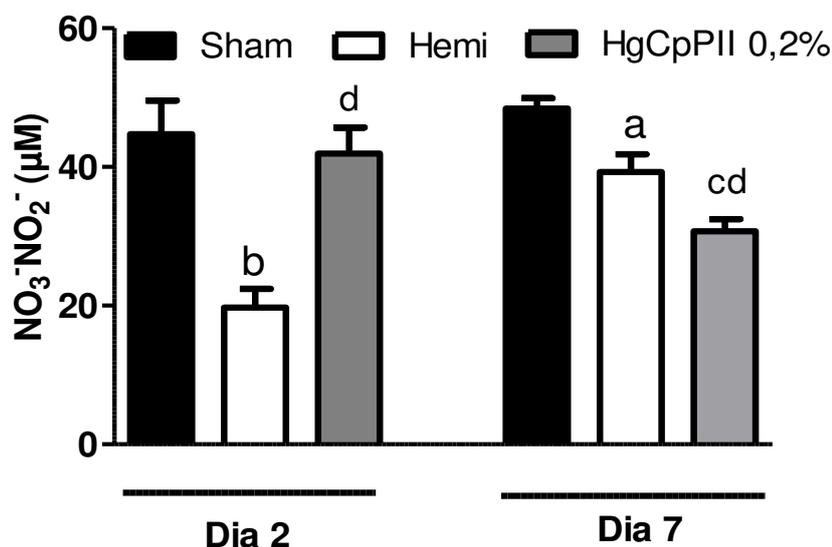
Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) a partir de amostras de feridas no dia 2 após a cirurgia. Os dados são expressos como média  $\pm$  média de erro padrão (S.E.M.) da unidade de atividade de MPO (UA / mg de tecido). <sup>a</sup> $p < 0,05$  indica diferença estatística comparada com o grupo Sham e <sup>b</sup> $p < 0,05$  em comparação com o grupo Hemi ( $n = 5$  animais/grupo/experimento, teste ANOVA-Bonferroni).

#### 5.4.2 O tratamento tópico com hidrogel modula os níveis de nitrito nas fases inflamatórias e proliferativas de feridas excisionais

Os níveis de óxido nítrico (NO) foram determinados indiretamente pela medida de nitrito nas amostras teciduais de feridas excisionais coletadas no dia 2 e 7 (Figura 32). No dia 2, foi observado redução significativa ( $p < 0,05$ ) dos níveis de nitrito no grupo tratado com hidrogel Hemi, contendo somente hemicelulose ( $19,71 \pm 2,69$ ). Não houve diferença entre o grupo Sham ( $44,75 \pm 4,85$ ) e grupo tratado com hidrogel de CpPII a 0,2% ( $41,92 \pm 3,74$ ).

No dia 7, o grupo HgCpPII 0,2% apresentou uma redução dos níveis de nitrito ( $30,70 \pm 1,78$ ) quando comparada ao grupo Sham ( $48,44 \pm 1,49$  -  $p < 0,0001$ ) e Hemi ( $39,29 \pm 2,51$  -  $p < 0,05$ ). O intervalo entre o dia 2 e o dia 7 revelou uma mudança nos níveis de nitrito os quais se apresentaram com níveis aumentados no grupo Hemi e diminuídos no grupo HgCpPII 0,2% ao longo dos dias avaliados ( $p < 0,05$ ).

Figura 32. As hemiceluloses diminuem os níveis de nitrito.



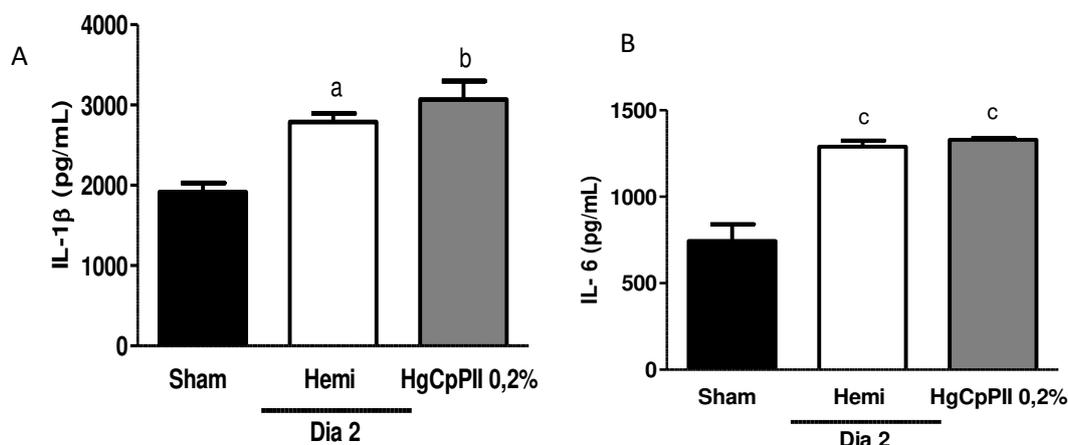
Amostras de feridas nos dias 2 e 7 após a cirurgia foram coletadas para dosagem dos níveis de nitrito. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.) de níveis de nitrito ( $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ) ( $\mu\text{M}$ ), respectivamente. <sup>a</sup> $p < 0,05$ , <sup>b</sup> $p < 0,001$  e <sup>c</sup> $p < 0,0001$  indicam diferença estatística comparada com o grupo Sham e <sup>d</sup> $p < 0,05$  em comparação com o grupo Hemi ( $n = 5$  animais/grupo/experimento, teste ANOVA-Bonferroni).

### 5.4.3 O tratamento tópico com HgCpPII 0,2 % modula a liberação de citocinas

A determinação dos níveis de citocinas foram obtidas a partir de homogenatos de biópsias de feridas excisionais coletadas no 2º dia após a indução da lesão. Os resultados foram expressos em picograma de citocina/mL do sobrenadante/mg de tecido (Figura 33).

Os níveis de IL1- $\beta$  no grupo tratado (3.069 $\pm$ 214,5) e no grupo Hemi (2.789 $\pm$  210,7) mostraram um significativo aumento ( $p < 0,001$ ) comparado ao grupo Sham (1.914 $\pm$  229,8). Foram também avaliados os níveis de IL6 revelando um aumento nos grupos tratado com hidrogel Hemi (1.289  $\pm$  35,06) e CpPII a 0,2% (1.329 $\pm$  18.47) quando comparados ao controle Sham ( $p < 0,001$ ).

Figura 33. Citocinas pró-inflamatórias medidas em feridas.



No dia 2 após a cirurgia, os animais foram sacrificados e os tecidos das feridas excisais foram removidos para determinar os níveis de citocinas IL1- $\beta$  (A) e IL-6 (B) por ELISA. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.) de citocina/mL a partir do sobrenadante / mg de tecido. <sup>a</sup> $p < 0,05$ , <sup>b</sup> $p < 0,001$  e <sup>c</sup> $p < 0,0001$  indicam diferença estatística em comparação com o grupo Sham ( $n = 5$  animais/grupo/tempo/experimento, teste ANOVA-Bonferroni).

#### **5.4.4 O tratamento tópico com hemiceluloses e proteínas fitomoduladoras reduzem a peroxidação lipídica.**

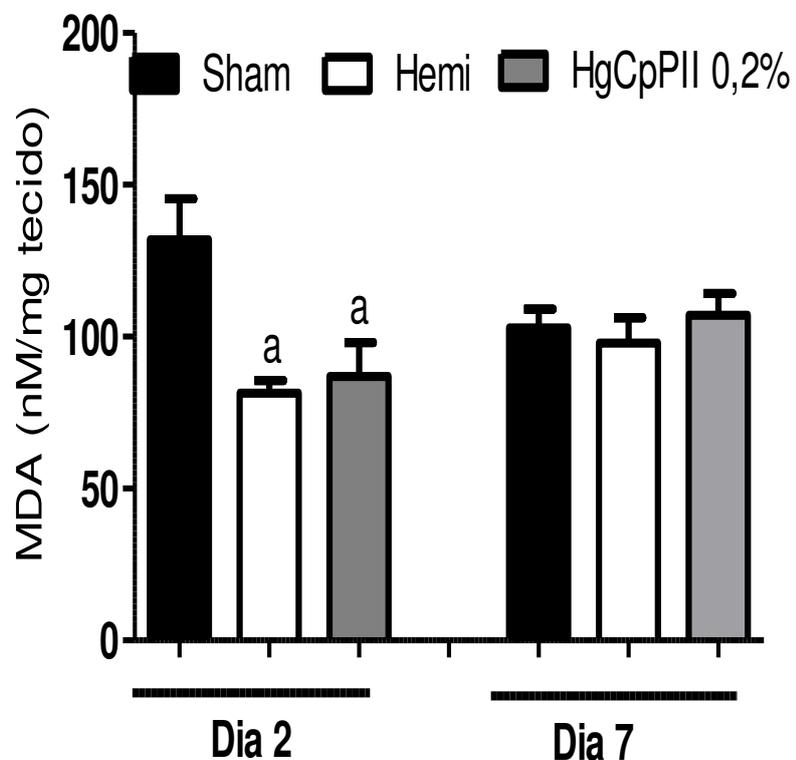
O teste de substâncias ácidas reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) quantifica o malondialdeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo.

O conteúdo de malondialdeído (MDA) de amostras de feridas, como um índice de peroxidação lipídica, foi mensurado nos dias 2 e 7 após cirurgia e está apresentado na Figura 34. Os valores foram expressos como atividade de MDA (nM/mg de tecido).

No dia 2, houve significativa redução no conteúdo de MDA nos grupos tratados com hidrogel Hemi ( $81,50 \pm 4,01$ ) e HgCpPII 0,2% ( $86,88 \pm 11,23$ ) quando comparados ao grupo Sham ( $131,9 \pm 13,56$ ).

No dia 7, não foram observadas diferenças significativas no conteúdo de MDA, entre os grupos. Observou-se uma redução no conteúdo de MDA no dia 7, quando comparado ao dia 2.

Figura 34. Hemiceluloses e proteínas fitomoduladoras reduzem a peroxidação lipídica.



O teor de malondialdeído (MDA) das amostras de feridas, como índice de peroxidação lipídica, foi medido nos dias 2 e 7 após a cirurgia. Os dados são média de três experimentos independentes e são expressos como média  $\pm$  média de erro padrão (S.E.M.) de MDA (nM / mg de tecido). <sup>a</sup>p < 0,05 indica diferença estatística em comparação com o grupo Sham (n = 5 animais/grupo/tempo/experimento, teste ANOVA-Bonferroni).

## **5.5 Proteínas laticíferas livres de hemiceluloses e em hidrogel contendo 20 mM de iodoacetamida promove eficientemente a cicatrização.**

Neste ensaio foram investigados o efeito de amostras de hidrogéis de proteínas laticíferas a 0,2% contendo iodoacetamida a 20 mM bem como o efeito da fração de proteínas laticíferas CpPII livres de hemiceluloses no modelo experimental de cicatrização conforme protocolo III (Figura 14).

Os resultados das análises macroscópica (sinais flogísticos, queda da crosta, progresso da cicatrização durante 14 dias através do percentual de contração da ferida) e análises microscópicas (re-epitelização e síntese do novo epitélio) estão apresentados a seguir.

### ***5.5.1. Aspectos macroscópicos de feridas excisionais sob o tratamento com hidrogéis contendo a fração protéica (CpPII): sinais flogísticos e queda da crosta***

No estudo macroscópico, as feridas foram acompanhadas diariamente quanto aos sinais flogísticos da inflamação, presença de exsudato, crosta e progresso da cicatrização. Os parâmetros flogísticos de edema e hiperemia foram observados no 2º dia relacionados a intensidade e estão apresentados na Tabela 9.

Como apresenta a referida tabela, os grupos tratados com WCpPII 0,2% e HgCpPII-IAA 0,2% apresentaram maior edema ( $p < 0.05$ ) quando comparado ao grupo controle Sham. A hiperemia foi significativa ( $p < 0.05$ ) em WCpPII 0,2% comparada aos outros grupos. No dia 2, todos os grupos apresentaram crosta, mas não havia exsudato nas feridas.

O curso de tempo da queda da crosta estão detalhados na Tabela 10. As crostas das feridas dos animais tratados com WCpPII 0,2% começaram a cair logo com 6 dias da indução da lesão similar ao grupo controle positivo Purilon®, enquanto os grupos tratados com HgCpPII 0,2% e HgCpPII-IAA 0,2% iniciaram a queda dois dias depois comparados ao grupo controle. No entanto, entre o 8º ao 11º dia houve um grande percentual de queda de crosta no grupo HgCpPII-IAA 0,2% comparado aos outros tratamentos.

Tabela 9. Avaliação semi-quantitativa de sinais flogísticos induzidos por WCpPII 0,2% e HgCpPII-IAA 0,2% no dia 2.

Grupos	Edema	Hiperemia	Crosta	Exsudato
Sham	1,5 (1-2)	2 (1-3)	P	A
Purilon®	2 (1-2) <sup>b</sup>	2 (2-3)	P	A
Hemi	1 (0-3)	2 (1-3)	P	A
WCpPII 0,2%	2 (1-3) <sup>c</sup>	3 (2-3)	P	A
HgCpPII 0,2%	2 (0-2)	2 (1-3)	P	A
HgCpPII-IAA 0,2%	1 (1-3) <sup>a</sup>	2 (2-3)	P	A

Os parâmetros de edema e hiperemia foram observados no 2º dia e graduados em escores de 0 a 3 quanto a intensidade (0 - ausente, 1 - leve, 2 - moderado e 3 - intenso). Os resultados foram expressos como mediana e variação, respectivamente. <sup>a</sup>p < 0,05, <sup>b</sup>p < 0,001 e <sup>c</sup>p < 0,0001 indica diferença estatística comparada com o grupo Hemi (n = 15 animais/grupo, Teste Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn). (P) presente e (A) ausente.

Tabela 10. O tratamento com WCpPII 0,2% e HgCpPII-IAA 0,2% (m/v) de proteínas laticíferas aceleram a queda da crosta da ferida.

Dias	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>Grupos</b>									
Sham	0	0	0	0	0	16,66	16,66	33,33	100
Purilon®	16,66	0	0	33,33	50	66,66	83,33	100	-
Hemi	0	0	0	20	40	60	70	80	100
WCpPII 0.2%	11,11	11,11	11,11	11,11	22,22	66,66	100 <sup>abcd</sup>	-	-
HgCpPII 0.2%	0	0	13,3	13,3	33,3	33,3	53,3	86,3	100
HgCpPII-IAA 0.2%	0	0	25	37,5	62,5	87,5	87,5	100 <sup>abd</sup>	-

<sup>a</sup>p < 0,05 indica diferença estatística em comparação com o grupo Sham, <sup>b</sup>p < 0,05 indica diferença estatística em comparação com o grupo Veículo, <sup>c</sup>p < 0,05 indica diferença estatística em comparação com o grupo Purilon e <sup>d</sup>p < 0,05 indica diferença estatística em comparação com grupo HgCpPII 0,2% (n = 15 Animais / grupo, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn).

### **5.5.2. Aspectos macroscópicos de feridas excisionais sob o tratamento com hidrogéis contendo a fração protéica (CpPII): percentual de contração**

A Figura 35 mostra o percentual de contração de feridas tratadas com proteínas laticíferas (CpPII) livres de hemicelulose e com hidrogel contendo iodoacetamida 20 mM. O tamanho das lesões foi mensurado nos diferentes dias de estudo pós-cirurgia (2, 7, 12 e 14), para cálculo da contração da ferida.

No dia 2 pós-cirurgia, os grupos experimentais WCpPII 0,2% e HgCpPII-IAA 0,2% apresentaram percentuais de contração significativos ( $43,38\% \pm 3,02$ ) e ( $41,92\% \pm 2,61$ ) sendo equivalentes ao Purilon® gel ( $44,51\% \pm 3,52$ ) e diferiram ( $p < 0,05$ ) dos grupos controles Sham ( $31,49\% \pm 3,56$ ), Hemi ( $29,66\% \pm 3,66$ ) e HgCpPII 0,2% ( $37,47\% \pm 1,84$ ).

No dia 7 o grupo tratado com Purilon® gel apresentou maior contração ( $81,99\% \pm 4,41$ ) diferindo dos demais grupos ( $p < 0,05$ ). O grupo HgCpPII-IAA 0,2% apresentou contração significativa ( $66,89\% \pm 2,59$ ) em relação aos grupos controle Sham ( $54,12\% \pm 1,15$ ) e grupo Hemi ( $54,84\% \pm 2,73$ ) enquanto o grupo WCpPII 0,2% ( $64,12\% \pm 2,66$ ) diferiu apenas do grupo Sham ( $p < 0,05$ ).

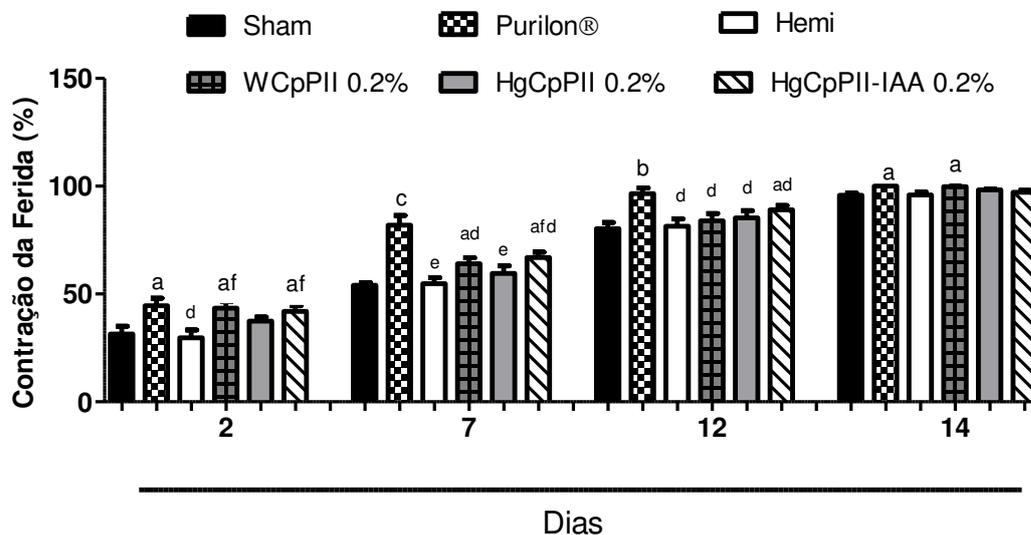
O grupo tratado com HgCpPII 0,2% apresentou o percentual de contração  $59,61\% (\pm 3,43)$ , não diferindo dos tratamentos com CpPII.

No dia 12 pós-cirurgia, os maiores percentuais de contração novamente foram observados no grupo de referência tratado com Purilon® gel ( $96,57\% \pm 2,60$ ) em relação aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Dentre os grupos tratados com CpPII, apenas o grupo HgCpPII-IAA 0,2% apresentou contração significativa ( $89,11\% \pm 1,91$ ) em relação ao grupo controle Sham ( $80,27\% \pm 2,91$ ). Não houve diferença entre os grupos Hemi ( $81,43\% \pm 3,36$ ), WCpPII 0,2% ( $83,88\% \pm 3,46$ ) e HgCpPII 0,2% ( $85,30\% \pm 3,37$ ), e ambos também não diferiram do controle.

No 14º dia de experimento 100% das feridas estavam cicatrizadas no grupo Purilon®. Também se observou maiores percentuais de contração nos grupos tratados com CpPII em relação aos controles. Apenas os grupos Purilon® e WCpPII 0,2%, diferiram do Sham ( $p < 0,05$ ).

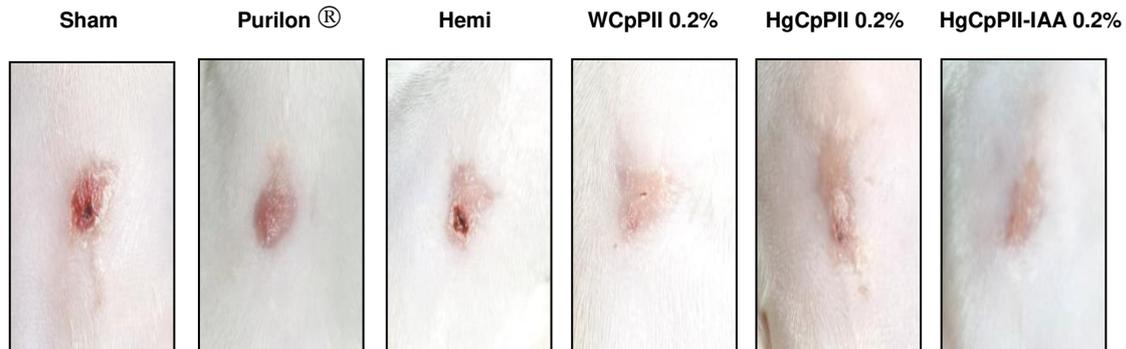
Figura 35. Proteínas laticíferas de *C. procera* aceleraram eficientemente a contração da ferida. Percentual de contração da ferida nos dias 2, 7, 12 e 14 após a cirurgia.



Os dados são expressos como média  $\pm$  média de erro padrão (S.E.M) da contração média da ferida. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.001$  e <sup>c</sup> $p < 0.0001$  indicam diferença estatística em comparação com o grupo Sham, <sup>d</sup> $p < 0.05$  e <sup>e</sup> $p < 0.001$  em comparação com o grupo Purilon®, <sup>f</sup> $p < 0,05$  comparado com o grupo Hemi - (n = 5 animais/grupo, teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

Os aspectos macroscópicos da resolução da cicatrização no 14<sup>o</sup> dia pós-cirurgia estão apresentados na figura 36. Macroscopicamente a maioria das feridas dos grupos analisados apresentaram resolução no 14<sup>o</sup> dia pós-cirurgia.

Figura 36. Proteínas laticíferas livres de hemiceluloses e em hidrogel contendo iodoacetamida 20 mM melhoram eficientemente a cicatrização.



Aspectos macroscópicos da cicatrização no dia 14 após a cirurgia. (Sham) animais não tratados, (WCpPII) animais tratados com proteínas laticíferas a 0,2% (m/v) sem hemiceluloses, (HgCpPII 0,2%) animais tratados com hidrogel de proteínas laticíferas a 0,2%, (HgCpPII-IAA 0,2%) animais tratados com hidrogel de proteínas laticíferas a 0,2% contendo iodoacetamida 20 mM (m/v), animais tratados com hemiceluloses hidrogel (Hemi) e fármaco de referência como controle positivo (Purilon<sup>®</sup>).

### **5.5.3 As proteínas fitomoduladoras favoreceram a síntese do novo epitélio**

A medida da espessura do novo epitélio ( $\mu\text{m}$ ) foi obtida no 14<sup>o</sup> dia pós-cirurgia (Figura 37 A). A figura 37 B, apresenta a performance das proteínas fitomoduladoras sob a síntese do novo epitélio.

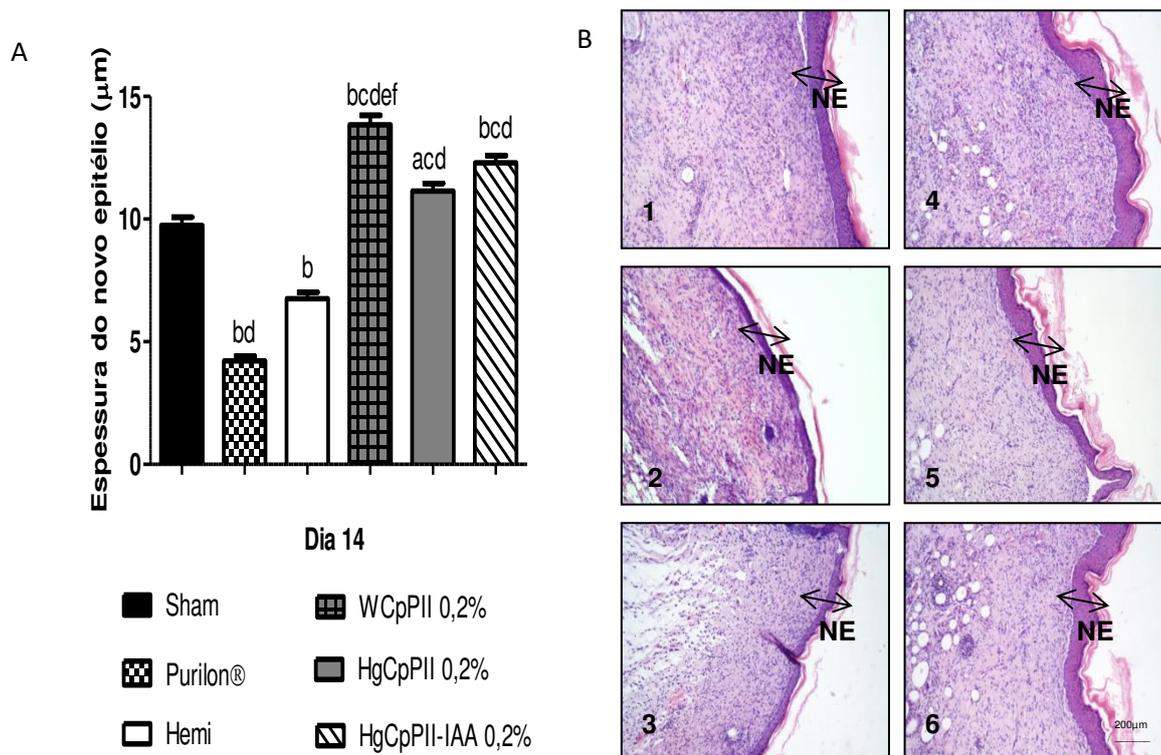
A espessura do novo epitélio foi maior nos grupos tratados com as proteínas fitomoduladoras a 0,2% quando comparados aos grupos sham, purilon e hemi.

Os grupos tratados com WCpPII 0,2%, HgCpPII-IAA 0,2% e HgCpPII 0,2% apresentaram os maiores valores de espessura do novo epitélio:  $13,85\mu\text{m} \pm 0,38$ ;  $12,29\mu\text{m} \pm 0,29$  e  $11,15 \mu\text{m} \pm 0,30$  respectivamente.

Proteínas laticíferas dissolvidas somente em água, (WCpPII 0,2%) diferiram significativamente dos grupos controles e demais grupos tratados com CpPII ( $p < 0,05$ ).

O grupo tratado com HgCpPII-IAA 0,2% não diferiu do grupo tratado com CpPII incorporada em hidrogel (HgCpPII-IAA 0,2%). Este resultado demonstra a eficiente capacidade de CpPII em estimular síntese de novo epitélio (NE) evidente nas imagens de 4 a 6 a nível microscópico da espessura do novo epitélio, representativas dos grupos experimentais (Figura 37 B).

Figura 37. As proteínas fitomoduladoras favoreceram a síntese do novo epitélio.



(A) Medidas da espessura do novo epitélio ( $\mu\text{m}$ ) no dia 14 pós-cirurgia e (B) visões histológicas do novo epitélio (NE). <sup>a</sup> $p < 0,05$  e <sup>b</sup> $p < 0,001$  indicam diferença estatística em comparação com o grupo Sham (1), <sup>c</sup> $p < 0,05$  comparado com o grupo Purilon® (2), <sup>d</sup> $p < 0,05$ , <sup>e</sup> $p < 0,001$  com o grupo HgCpPpII 0,2% e <sup>f</sup> $p < 0,001$  com o grupo HgCpPpII-IAA 0,2% (4) - ( $n = 5$  animais/grupo, teste ANOVA seguido por teste de Bonferroni). (5) animais tratados com hidrogel de proteínas laticíferas a 0,2% (HgCpPpII 0,2%) e (6) animais tratados com hidrogel de proteínas laticíferas contendo iodoacetamida 20 mM a 0,2% (HgCpPpII-IAA 0,2%).

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, todas as amostras de hidrogel apresentaram valores de microorganismos viáveis dentro dos limites permitidos pela legislação. O critério aceito para a qualidade microbiológica de formulações não-estéreis é de  $10^3$  UFC/g para bactéria e até  $10^2$  UFC/g para fungos de acordo com a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010).

De fato, ambos os materiais, hemiceluloses e proteínas laticíferas, foram cuidadosamente manipuladas sobre condições assépticas para o preparo das formulações. Seguiu-se criteriosamente o mesmo protocolo para todos os hidrogéis formulados e testados nos ensaios subsequentes. Durante o controle de qualidade, testes físico-químicos e microbiológicos devem ser realizados nas formulações (PINTO; KANEKO, 2010; REBELLO, 2004).

Conforme regulamento sanitário, as boas práticas de fabricação do produto em todas as etapas, garante a segurança e qualidade dos produtos, uma vez que essas substâncias são aplicadas na pele (BRASIL, 2008).

Considerando que a contaminação microbiana de um produto pode acarretar alterações em suas propriedades físicas e químicas e ainda caracteriza risco de infecção para o usuário (RIBEIRO, 2010; REBELLO, 2004), os produtos farmacêuticos de uso tópico que não têm como requerimento serem estéreis, devem estar sujeitos ao controle de contaminação microbiana (PINTO; KANEKO, 2010).

É importante destacar que o crescimento microbiano deve ou não causar modificações visíveis na formulação. A perda da estabilidade deve ocorrer por quebra da emulsão, alteração nas características físico-químicas, e mudanças na cor, odor e consistência do produto. Qualquer alteração física, química ou microbiológica do produto pode impactar na qualidade, segurança e eficiência do produto final e, portanto, pode afetar, direta ou indiretamente, a saúde dos pacientes (KUMAR *et al.*, 2011).

Os resultados do estudo físico-químico e macroscópico desde a elaboração até o armazenamento da formulação por um período de tempo revelaram que os hidrogéis são biocompatíveis, estáveis e não possuem capacidade de corrosão da pele.

A análise da formulação após 24 h de preparo é uma recomendação da ANVISA (BRASIL, 2004), o que assegura o resfriamento e acomodação estrutural do produto após sua fabricação. Alves *et al.*, (2007), obtiveram valores de pH em torno de 7,0 em seu estudo envolvendo um gel hidrofílico.

O estudo do pH é útil para avaliar se a formulação é biocompatível e não causa corrosão na pele considerando que o estrato córneo apresenta resistência a alterações de pH, tolerando uma variação de 3 a 9 (AULTON, 2005).

Segundo Ferreira (2008), valores de pH entre 5 e 7, para formulações tópicas, evitam possíveis irritações cutâneas. O pH é um parâmetro prático para avaliar a estabilidade química da amostra durante o armazenamento, uma vez que variações de pH podem indicar que houve degradação e/ou contaminação microbológica ao longo do tempo (SMART; SPOONER, 1972).

A estabilidade dos hidrogéis foi estimada por medição da atividade proteolítica total de CpPII num período de curso de tempo. As proteases são o principal marcador molecular dessa amostra e a sua atividade foi tomada como a referência de estabilidade ao armazenamento a 4 e 25 °C. Em todos os hidrogéis testados, a atividade proteolítica a pH 6,0 era significativamente mais elevada do que a atividade proteolítica a pH 5,0. A atividade proteolítica do gel contendo apenas hemiceluloses foi também mensurada, comprovando sua ausência.

A perda de atividade proteolítica do hidrogel HgCpPII 0,2% foi mensurada durante 30 dias de armazenamento em diferentes temperaturas (4 °C e 25 °C) para investigar a melhor condição de armazenamento da formulação. Os resultados também indicaram que o HgCpPII 0,2% armazenado a 25 °C apresentou perda significativa de atividade proteolítica após a primeira semana de elaboração e armazenamento em comparação com o hidrogel armazenado a 4 °C. A atividade medida após 30, 90, 180 e 365 dias de armazenamento a 4 °C foi progressivamente reduzida atingindo um mínimo de 61,23% de atividade após um ano.

A estabilidade ambiental e biológica de hidrogéis para aplicações biomédicas também foi estudado por Roy *et al.*, (2013). As propriedades organolépticas, macroscópicas e retenção de atividade das amostras foram avaliadas sob diferentes temperaturas de armazenamento. O armazenamento dos hidrogéis a 5°C±2°C (sob refrigeração) foi a condição de armazenamento mais

apropriada evidenciado pela manutenção dos parâmetros avaliados, que não variaram significativamente ao longo de 180 dias (Roy *et al.*, 2013)..

A avaliação do hidrogel CpPII durante 1 ano, demonstra a maior estabilidade da formulação ao armazenamento a 4°C. As hemiceluloses atuaram satisfatoriamente como bom veículo uma vez que a formulação não apresentou alterações macroscópicas e conseguiu manter a bioatividade das proteínas laticíferas a 0.2%. A análise da estabilidade foi útil para compreender a estrutura, função e desempenho da formulação.

Roy *et al.*, (2013), ressalta a necessidade de dar atenção a apropriadas condições de armazenamento dos hidrogéis preparados para aplicações na saúde pois contribuem para a maior estabilidade, sendo fator essencial para manutenção da qualidade, segurança e eficácia do produto.

No presente trabalho utilizou-se as galactomananas de *C. pulcherrima* sendo a fonte de hemiceluloses como suporte para as proteínas fitomodulatórias. Após a formulação do hidrogel, a eficácia para o uso tópico do mesmo foi avaliada pela biocompatibilidade dérmica, estimativa da contração, parâmetros histológicos e bioquímicos.

Ensaio de toxicidade dermal aguda são utilizados para definir os efeitos adversos induzidos, por dose única ou múltipla da amostra teste, durante um curto período de administração (DRAIZE, 1959). Portanto, a irritação dérmica foi avaliada nesse estudo durante as primeiras 6 horas de aplicação do produto e depois a cada 7 dias consecutivos através da presença de edema por desafio cutâneo com a menor dose de hidrogel que apresentou atividade farmacológica.

Em ensaio agudo de irritabilidade dermal, o hidrogel elaborado, não mostrou-se irritante. Apenas no ensaio com aplicações múltiplas diárias em pele escarificada, o grupo de animais que recebeu o hidrogel HgCpPII 0,2%, apresentou maior espessura cutânea. Isso foi evidente do primeiro até o 3º dia do teste quando comparado aos grupos controles ( $p < 0,05$ ).

Os resultados foram corroborados com outros achados através de observação de edema intenso e hiperemia indicando que HgCpPII 0,2% estimula a inflamação nesse primeiro período pós-lesão. Após o 4º dia de tratamento, a espessura da pele dos animais permaneceu constante em todos os grupos ( $p > 0,05\%$ ).

O Índice de Irritação Primária (IIP) após a avaliação do hidrogel HgCpPII 0,2% sobre pele intacta e pele escarificada indicou que HgCpPII 0,2% não foi irritante, sugerindo ser adequado para uso dérmico, neste modelo experimental.

Os resultados dos testes de irritabilidade aliados aos ensaios de cicatrização já descritos, também indicam que uma maior concentração de proteínas do látex, como o hidrogel HgCpPII 0,5% não testado neste ensaio de irritabilidade, possa apresentar IIP superior ao encontrado para HgCpPII 0,2% devido as reações inflamatórias mais intensas observadas no ensaio de cicatrização conforme protocolo II, podendo ser classificado como substância irritante neste modelo experimental.

A irritação dérmica é um ponto limitante no desenvolvimento da fórmula de aplicação tópica orientada e isso é especialmente crítico para promoção da cicatrização de feridas (KO *et al.*, 2010). Ademais, uma elevada concentração de proteases em feridas pode causar irritação da pele intacta ao redor e resultar em eritema intenso e descamação (ROCHA *et al.*, 2005), o que não foi observado em nosso estudo.

O processo de cicatrização inicia-se por uma fase inflamatória aguda exibindo os sinais flogísticos (GOLDMAN, 2004). Esse processo pode durar de quatro a seis semanas e é medido por vários parâmetros, tais como formação de matriz extracelular, aumento da contração da ferida, presença de fibroblastos e colágeno, neovascularização, processos de re-epitelização e remodelamento de colágeno (BOYCE ; WARDEN, 2002; MANSOURZADEH *et al.*, 2015).

No ensaio de cicatrização testando duas concentrações de hidrogel de CpPII (0,2% e 0,5% m/v) conforme protocolo II, verificou-se macroscopicamente, que todos os grupos analisados apresentaram margens de feridas limpas e sem exsudação durante o período de exame. Isso foi indicativo de que não ocorreu proliferação microbiana.

No período inflamatório, o edema cutâneo e hiperemia foram mais intensos nas feridas tratadas com HgCpPII 0,5% em relação aos grupos controle. Este grupo também acelerou a queda da crosta da ferida logo no 6º dia. Foi observado, neste grupo, que as feridas sem crosta apresentaram-se com aspecto bastante hiperêmico permanecendo evidente até o dia 10. Isso foi sugestivo de um processo inflamatório mais intenso e prolongado (STADELMANN *et al.*, 2008).

O aspecto macroscópico das feridas tratadas com hemiceluloses sugeriu menor inflamação e foi comparável ao grupo Sham.

Proteínas laticíferas de *C. procera* também foram estudadas na cicatrização de feridas experimentais por Figueiredo *et al.*, (2012). No estudo, as proteínas totais do látex, fração LP, foram incorporadas em uma biomembrana sintética de álcool polivinil (*BioMem PVA/PL*) e a eficácia na cicatrização foi determinada. Animais implantados com biomembrana contendo proteínas a 0,2% também apresentaram moderado edema em relação ao grupos controles, mas sem diferença na hiperemia.

Embora no nosso estudo, tenha ocorrido a queda precoce das crostas das feridas no grupo tratado com HgCpPII 0,5%, a maioria das feridas do grupo tratado com HgCpPII 0,2% estava sem crosta no dia 13<sup>o</sup> pós-cirurgia sendo este resultado significativo quando comparado aos animais tratados com hidrogéis HgCpPII 0,5%, Hemi e grupo controle. A crosta é resultado da ferida após uma perturbação anatômica e funcional da pele geralmente associado com hemorragia, contração vascular, coagulação, preenchimento tecidual e ativação de células inflamatórias (LIM *et al.*, 2009).

Na superfície da ferida, o coágulo que seca forma uma crosta que é composta por sangue, restos celulares desvitalizados e partículas de tecidos. Após a resposta celular entre 24 a 48 horas as células migram da membrana basal até o local afetado por mitose e vão preenchendo o espaço (FEESS *et al.*, 2016). Enquanto as células epiteliais se deslocam há liberação da enzima proteolítica colagenase para dissolver a ligação na base da crosta e facilitar a sua migração. Uma vez que a ponte epitelial está completa a crosta é posteriormente separada da superfície da ferida (HEDLUND 2005; HOSGOOD, 2006; PAVLETIC, 2010).

Analisando-se a contração da ferida, observa-se que este parâmetro progrediu mais rapidamente nos animais tratados com HgCpPII 0,2% em comparação com os grupos de controle. Desde o 2<sup>o</sup> dia após indução da lesão o grupo com menor concentração de proteases apresentou redução significativa da área não-cicatrizada, conseqüentemente maior contração da ferida. Esta atividade de contração pode ser atribuída a presença de miofibroblastos no tecido de granulação (ROZAINI *et al.*, 2005) que foi observado em nosso estudo após o 2<sup>o</sup> dia de indução da lesão. Assim, a maior taxa de contração nos grupos de tratamento sugerem que HgCpPII estimula a formação de tecido de granulação

com maior quantidade de miofibroblasto (ALJADY *et al*, 2000; ROZAINI *et al.*, 2005).

HgCpPII 0,5% reforçou o fechamento da ferida apenas no dia 10. Neste modelo de ferida experimental, pensou-se que ambos os hidrogéis fossem eficientes para promover a cicatrização, porém, pela avaliação macroscópica, o tratamento com hidrogel HgCpPII a 0,2% demonstrou uma atividade mais eficaz.

É importante destacar que a proteólise parece ser essencial tanto na fase inflamatória como na fase de remodelamento para a cicatrização normal das feridas (KYRIAKIDES; MACLAUHLAN, 2009). Os resultados obtidos com as duas concentrações de CpPII sugerem que neste modelo de ferida uma maior concentração de proteases foi útil no início da fase cicatricial, promovendo a proteólise do tecido o que acelerou a fase inflamatória, favorecendo o desprendimento da crosta das feridas. Esse resultado foi confirmado nos animais do grupo HgCpPII a 0,5%, pois suas crostas tenderam a cair mais rápido quando comparado ao grupo HgCpPII a 0,2%. A medida que o progresso da cicatrização ultrapassou esse estágio, e o processo de cicatrização atingiu o 13º dia, foi significativa a queda de crosta dos animais tratados com hidrogel contendo uma menor concentração de protease. Portanto, os resultados macroscópicos obtidos sugerem que HgCpPII a 0,2% atuou de forma mais efetiva na fase proliferativa para a resolução da cicatrização.

No exame histológico no 2º dia pós-cirurgia, foi houve a presença de infiltrado inflamatório próximo a crosta e na derme papilar além de intensa presença de linfócitos nas margens da ferida dos grupos tratados com hidrogel contendo a fração CpPII. O grupo tratado somente com hemiceluloses (Hemi) apresentou discreto edema e menor infiltrado de células inflamatórias. A neovascularização e proliferação de fibroblastos foi mais pronunciada entre os grupos tratados com os hidrogéis contendo CpPII quando comparados ao grupos Hemi e controle. No 14º dia pós-cirurgia, embora fossem observados tecidos com discreta presença de foco inflamatório remanescente nos grupos tratados com HgCpPII 0,2% e HgCpPII 0,5%, este achado não foi significativo, uma vez que todos os grupos exibiram re-epitelização no dia 14 e não havia mais ulceração.

A atividade proteolítica do hidrogel CpPII, pode ter ativado componentes da matriz após lesão (KYRIAKIDES; MACLAUHLAN, 2009), contribuindo para a proliferação de células de forma mais equilibrada neste

modelo de ferida com a concentração de hidrogel a 0,2% de CpPII. Desta perspectiva, a eficácia do hidrogel de proteínas laticíferas a 0,2% neste modelo de ferida com aspecto macroscópico sem tecido necrótico e/ou infecção, pode ser explicada. É importante ressaltar que a escolha da abordagem utilizada como a concentração mais adequada de proteases no uso clínico vai depender do tamanho, localização, tipo de ferida e das características macroscópicas do tecido como presença de exsudato ou infecções (FERREIRA, 2010), sendo uma sugestão de amplas aplicações o uso do hidrogel com diferentes concentrações de CpPII.

A relação entre as propriedades inflamatórias das proteases presentes no látex de *Calotropis procera* foi estudada por Ramos *et al.*, (2012). O estudo realizado com camundongos avaliou a eficácia da atividade proteolítica, em manter a homeostase da coagulação na sepse e concluiu que as proteases cisteínicas presentes no látex desta planta estavam envolvidas nesse processo.

No estudo, o hidrogel contendo a fração CpPII de proteínas do látex de *C. Procera* parece ter envolvimento desde a fase da hemostasia na cascata de coagulação, contribuindo positivamente na formação de fibrina, ativação de células inflamatórias e liberação de mediadores-alvos favorecendo o processo cicatricial nos grupos tratados. A formação do coágulo de fibrina é, portanto, um passo importante na promoção do início das fases inflamatória e de reparação da ferida uma vez que imediatamente após a injúria da pele, a hemostasia é atingida através da vasoconstrição, ativação mediada por plaquetas da cascata intrínseca da coagulação, terminando na formação de um coágulo de fibrina. Neste processo também há a liberação de citocinas pró-inflamatórias a partir de tecido danificado e o coágulo recém-formado atuam como potentes sinais quimiotáticos para recrutar neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos para a ferida (ÖZTÜRK; ERMERTCAN, 2011; PORTOU *et al.*, 2015).

Um efeito notável observado no uso dos hidrogéis foi o incremento na espessura epitelial na fase proliferativa da cicatrização. A espessura do epitélio nos leitos das feridas foi maior no grupo HgCpPII 0,2% ( $p < 0,05\%$ ). Este resultado sugere que os animais deste tratamento atingiram uma cicatrização mais completa. Um aumento na espessura da pele está relacionada com a intensa atividade de queratinócitos. Isso indica que o hidrogel estimulou a proliferação de

células epiteliais o que resultou na construção de um epitélio mais denso, provavelmente composto de mais camadas de células (HU *et al.*, 2014).

A análise macroscópica do grupo HgCpPII 0,2% foi coerente com os achados histológicos através da re-epitelização mostrando aceleração do processo cicatricial. A aceleração da cicatrização ocorre pela contração da ferida, angiogênese, formação de tecido de granulação e também pela presença da epitelização (LIU *et al.*, 2011).

Yang *et al.*, (2016) avaliaram mudanças morfológicas na regeneração da epiderme em tecidos normais e tecidos cicatrizados. Os referidos autores observaram maior proliferação de queratinócitos, compondo várias camadas na epiderme cicatrizada do que na pele normal. Foi evidenciado ainda, alterações na membrana basal, e a epiderme do tecido cicatricial era obviamente mais espessa do que a da pele sem lesão. Nesse sentido, os autores concluíram que durante o processo de cicatrização da pele, alterações na formação da membrana basal deve afetar a proliferação de queratinócitos, a remodelação epitelial e tecidual, o que resulta na formação da cicatriz.

O processo de fibroplasia e a deposição de colágeno são eventos iniciados nas fases proliferativa e de remodelação do processo de cicatrização (BURLANDO; CORNARA, 2013). Esses eventos foram apresentados em lâminas histológicas de feridas excisionais ao dia 14 após a cirurgia. A avaliação quantitativa das seções sugeriu que HgCpPII 0,2% proporcionou melhor estímulo para fibroplasia, como evidenciado por maior número de fibroblastos quando comparado aos grupos de controle ( $p < 0,05$ ).

No entanto, observou-se que a deposição de colágeno em HgCpPII 0,2% foi semelhante a HgCpPII 0,5% e maior ( $p < 0,0001$ ) se comparada aos controles. Fibroblastos são células importantes do processo de reparo, devido sua proliferação na ferida, o colágeno emerge e resulta em rápida cicatrização (THORNE, 2013). Sugere-se que as proteases da fração CpPII presentes nos hidrogéis 0,2% e 0,5% atuam no remodelamento da matriz extracelular MEC e também deve ter contribuído para aumentar a inflamação e hiperemia e nos grupos tratados com CpPII.

Durante o debridamento do tecido há quebra de componentes da matriz extracelular e da membrana basal os quais liberam peptídeos ativos que estimulam o processo inflamatório e angiogênese, favorecendo a formação de

tecido de granulação e a queda precoce da crosta. Todos esses fatores aliados a atividade de proteólise do tecido nas fases tardias da cicatrização contribuem para o remodelamento da nova matriz cicatricial. (DEMIDOVA-RICE *et al.*, 2011).

Os mediadores inflamatórios e marcadores de estresse oxidativo da resposta cicatricial ao tratamento tópico com hidrogéis foram investigados. Hidrogéis contendo somente hemiceluloses (Hemi) e hidrogel contendo CpPII 0,2% foram estudados em feridas excisionais. HgCpPII 0,2% foi escolhida por ser a menor dose que apresentou atividade biológica e melhor performance no ensaio anterior de cicatrização. Neste estudo, a fase inflamatória foi caracterizada pelo aumento da atividade da MPO, medida no dia 2, indicando a presença de neutrófilos ativados nas feridas do grupo tratado. Vale ressaltar que as hemiceluloses reduziram a infiltração de neutrófilos em feridas enquanto as proteínas do látex a aumentaram.

Após indução de uma ferida ocorre a formação de um tampão de plaquetas que limita o sangramento e estimula a liberação de citocinas. Este evento que inicia a cascata de coagulação, promove a amplificação e recrutamento de células para o desbridamento de tecido não viável. Os neutrófilos ativados e atraídos da corrente sanguínea são aprisionados no tampão plaquetário em resposta aos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas como TGF- $\beta$  e PDGF (KOKANE *et al.*, 2009; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Essas células polimorfonucleares iniciam o debridamento enzimático realizando fagocitose do tecido morto e criando um ambiente hostil para bactérias, usando espécies reativas de oxigênio. Os neutrófilos também liberam interleucina 1 (IL1- $\beta$ ), uma citocina com dupla função atuando tanto como pró-inflamatória e estimulando a proliferação de queratinócitos (CHILDS; MURTHY 2017).

Em relação aos níveis de nitrito, seu aumento observado no dia 2 é devido ao influxo de neutrófilos. Na fase proliferativa, a produção de NO não é mais suportada pelos neutrófilos, mas pela presença de macrófagos no tecido presentes do tecido no dia 7. O NO é principalmente pelos neutrófilos ativados na fase inflamatória (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003), é inteiramente corroborada por essa observação. No dia 7, quando o pico da inflamação foi superado, o nível de NO reduziu sendo principalmente liberado por outras células

inflamatórias, como mastócitos e macrófagos que foram atraídos pelos neutrófilos (ORTEGA; GOMEZ *et al.*, 2013).

O óxido nítrico é um importante mediador do reparo normal de feridas. A síntese e acumulação de NO foi correlacionada com a deposição de colágeno em feridas (SCHÄFFER *et al.*, 1996). Park *et al.*, (2013), demonstraram que o excesso ou baixas concentrações de NO no ambiente da ferida é prejudicial para a acumulação de colágeno.

Os resultados dos níveis de NO produzidos no dia 2 e 7 pós-cirurgia podem estar relacionados com a maior produção de colágeno observada nos grupos tratados com CpPII a 0,2% e 0,5%, quando comparados aos grupos controle. Assim, um nível adequado de NO dentro do ambiente da ferida é requerido para síntese fisiológica de colágeno (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Os mastócitos têm sido reconhecidos por participar em diferentes aspectos do processo de cicatrização e atuarem nas diferentes fases contribuindo também com os eventos de contração, angiogênese e re-epitelização durante o reparo da ferida (OSKERITZIAN, 2012; WULFF; WILGUS, 2013). Em feridas tratadas durante 14 dias com HgCpPII, o número de mastócitos degranulados foi superior, sendo mais intenso em animais que receberam maior concentração de proteínas do látex (HgCpPII 0,5%).

O intenso infiltrado inflamatório também foi observado nas seções histológicas de feridas tratadas com CpPII, no dia 2 e pode estar relacionado a ação direta ou indireta dos mastócitos nas diferentes fases da cicatrização de feridas (WULFF; WILGUS, 2013). Os mastócitos contribuem para o processo inflamatório, quando degranulam liberam histamina nos estágios iniciais da cicatrização. Também há a produção de citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 que ativam a proliferação de fibroblastos e a síntese de fibras de colágeno nas fases posteriores da cicatrização (WILGUS, 2008). Os mastócitos foram reconhecidos primeiramente como células envolvidas no processo alérgico (PUXEDDU *et al.*, 2003).

Atualmente são documentados em realçar a inflamação através da vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, ativação e/ou recrutamento de células imunes circulantes de forma direta e também podem contribuir indiretamente pela liberação de alguns mediadores, incluindo histamina,

estimulando a produção de mediadores pró-inflamatórios por queratinócitos (WULFF; WILGUS, 2013).

Assim, a performance da cicatrização observada nos grupos tratados com HgCpPII, que apresentaram maior deposição de colágeno pode estar diretamente relacionada com o envolvimento da degranulação de mastócitos e ativação de diferentes mediadores da fase inflamatória que atuam nas fases posteriores da cicatrização.

Nesse contexto, a determinação dos níveis de ambas citocinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) no dia 2, nos tecidos tratados com HgCpPII 0,2%, concorda com essa observação apresentando-se com níveis maiores que o controle, provavelmente, estimuladas através da sinalização de mastócitos degranulados.

Proteínas do látex também participaram ativamente da fase inflamatória da cicatrização, promovendo degranulação de mastócitos, ativação de macrófagos, recrutamento de neutrófilos e liberação de mediadores inflamatórios (óxido nítrico, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (RAMOS *et al.*, (2016).

Figueiredo *et al.*, (2014) avaliou aspectos histológicos de feridas excisionais tratadas com proteínas do látex e encontrou maior número de fibroblastos e deposição de colágeno quando comparado aos grupos controle no 14<sup>o</sup> dia. A conclusão do estudo realizado ressalta o potencial pró-inflamatório das proteínas laticíferas e sua capacidade estimuladora da fibroplasia e colagênese.

Importa destacar que as hemiceluloses diminuíram a atividade de MPO e estimularam a liberação de IL-1 e IL-6 no dia 2. Por conseguinte, as hemiceluloses apresentaram uma atividade anti-inflamatória no início do processo de cicatrização (provavelmente reduzindo a infiltração de neutrófilos).

Este grupo também promoveu a liberação de mediadores inflamatórios (IL-1 $\beta$  e IL-6), envolvidos na remodelação dos tecidos na fase posterior do processo de cicatrização.

É provável que as hemiceluloses de *C. pulcherrima* tenham servido eficientemente como veículo para a liberação das proteínas fitomodulatórias, atuando em sinergia como hidrogel e modulando os níveis mediadores-alvos do processo de cicatrização.

O estresse oxidativo é frequentemente um evento fisiológico secundário associado à inflamação (DUNNILL *et al.*, 2015). O malondialdeído

(MDA) é fisiologicamente formado como um produto de peroxidação de lípidos de membrana e é um marcador eficiente de estresse oxidativo (YATES *et al.*, 2017). O MDA foi medido em feridas de tecido como reativos contra TABS.

Conforme relatado nos resultados, o MDA foi aumentado no dia 2, no pico da inflamação aguda. Contudo, o hidrogel evitou esse incremento no dia 2 e o estresse oxidativo foi reprimido no dia 7. Por conseguinte, o hidrogel também foi eficiente na inibição de dano oxidativo que poderia contribuir para acelerar o processo de cicatrização. Deve-se notar que o estresse oxidativo foi evitado nos grupos tratados com hemiceluloses e não foi mais incrementado quando as proteínas fitomoduladoras foram incorporadas no gel.

Num conjunto adicional de experimentos, os efeitos de cicatrização de CpPII foram testados aplicando a amostra isenta das hemiceluloses nas feridas. Isso poderia informar se as proteínas eram independentemente ativas. Macroscopicamente, CpPII, dissolvido em água (WCpPII 0,2%), eficientemente acelerou a cicatrização, em comparação com Sham e foi semelhante ao HgCpPII 0,2%. Essa hipótese foi confirmada pela classificação da contração da ferida. Além disso, quando CpPII foi inibido com IAA e incorporado ao gel, o hidrogel HgCpPII-IAA 0,2% atuou de forma semelhante a HgCpPII 0,2%, indicando que não somente a atividade proteolítica da amostra poderia estar envolvida na performance cicatricial.

Outras proteínas já identificadas na fração CpPII poderiam estar atuando nesse processo como as osmostinas (FREITAS *et al.*, 2011), porém, estudos adicionais são necessários para suplantar esta hipótese e investigar o mecanismo de ação. Além disso, as proteínas dessa fração também poderiam agir como estímulo antigênico para as células imunoinflamatórias que modulam o processo cicatricial.

As análises finais de desempenho envolveram a comparação direta de HgCpPII 0,2% com um fármaco comercial (Purilon®) que é um hidrogel de uso tópico composto por carboximetilcelulose e alginato de cálcio.

Uma significativa diferença no percentual de contração da ferida foi encontrado nos dias 2, 7 e 12 para o grupo tratado com HgCpPII-IAA 0,2% quando comparado ao controle. Os resultados obtidos podem ser explicados devido ao tratamento com hidrogéis criar um ambiente úmido no leito da ferida que é importante para estimular sua contração (GHADI *et al.*, 2016). Chakavala *et al.*,

(2012) demonstraram a atividade cicatrizante de uma formulação composta de 0,75% de quitosana.

O hidrogel foi eficiente em acelerar a cicatrização de feridas induzidas por queimadura (CHAKAVALA *et al.*, 2012). Os hidrogéis combinam características da cicatrização de feridas úmidas com boa absorvência e são transparentes para permitir o monitoramento da cicatrização (ARCHANA *et al.*, 2016). Entre as novas formulações a serem aplicadas na pele danificada, os hidrogéis mostram a superioridade, uma vez que podem proporcionar um ambiente úmido para a ferida/queimaduras e ao mesmo tempo liberar o fármaco incorporado para a ferida (SUNG; YONG., 2010).

A espessura do novo epitélio, examinada por histologia, no dia 14, foi então tomada como referência de proteção/resistência e reparação tecidual completa. Os dados revelaram que apesar de terem promovido uma contração mais rápida da ferida, Purilon® não ajudou a desenvolver novo epitélio sendo comparável ao Sham.

As hemiceluloses não estimularam a síntese do epitélio. Em vez disso, de alguma forma o inibiu em comparação com Sham. No entanto, todos os grupos tratados com as proteínas fitomoduladoras estando ou não incorporados ao gel de hemicelulose (WcpPII 0,2%, HgCpPII 0,2%, HgCpPII-IAA 0,2%) favoreceram notavelmente a nova síntese de epitélio exibindo um aumento evidente da sua espessura. Esses resultados apontam para a eficácia das proteínas fitomoduladoras do látex no reparo da ferida, como relatado anteriormente (RAMOS *et al.*, 2016). Além disso, a fórmula testada neste estudo realizou melhor reparação da ferida do que a droga de referência, em termos de completude do processo histológico.

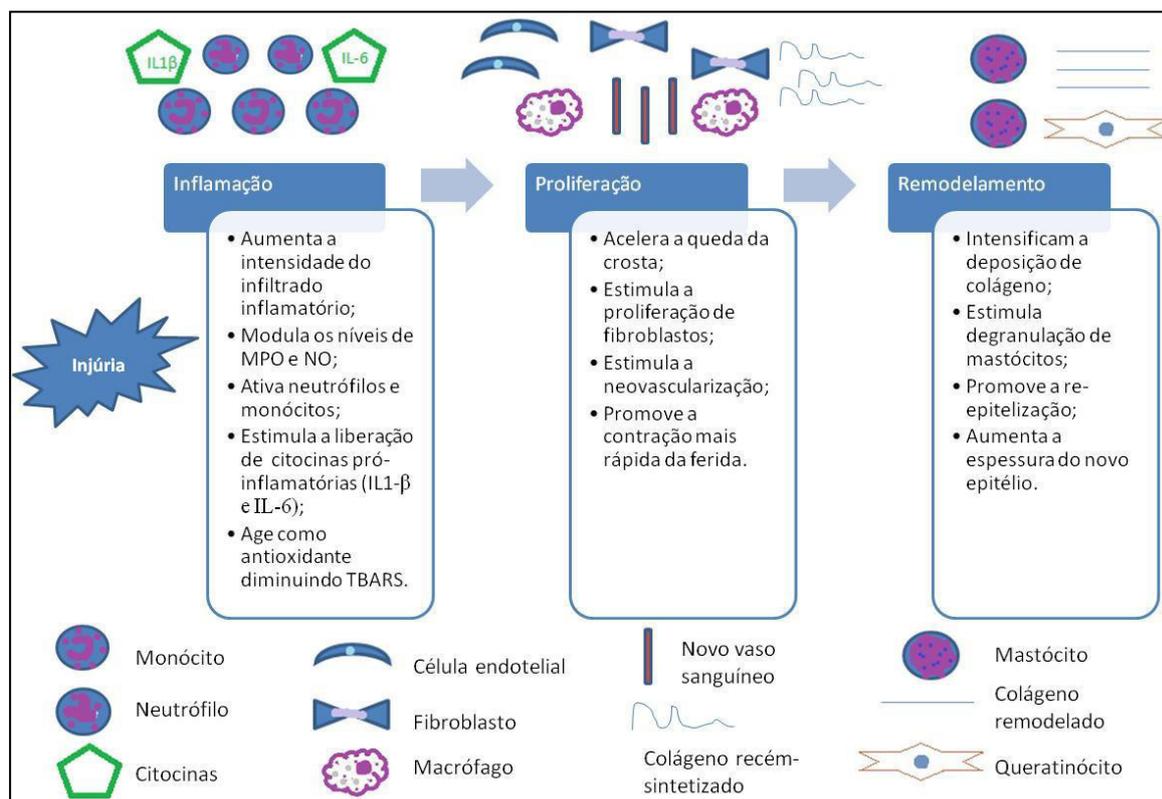
A literatura relata abundantemente os polissacarídeos propostos como veículos para a liberação de fármacos não tóxicos (FERREIRA *et al.*, 2009), exibindo efeitos farmacológicos (COURA *et al.*, 2017), associados à cicatrização de feridas (GHADI *et al.*, 2016).

Embora as hemiceluloses de *C. pulcherrima* pareçam contribuir para o desempenho dos hidrogéis como veículo, serão necessários mais estudos para entender melhor o papel que desempenha na formulação para fins cicatrizantes.

Contudo, abaixo apresenta-se um resumo dos principais resultados obtidos no modelo estudado com a aplicação tópica do hidrogel de proteínas

laticíferas de *C. procera*. Destacou-se as células, mediadores-alvos envolvidos e possíveis ações das proteínas fitomoduladoras CpP11, em cada estágio da cicatrização (Fig. 38).

Figura 38. Ações do hidrogel de proteínas laticíferas CpP11 de *C. procera* nas diferentes fases da cicatrização de feridas e seus mediadores-alvos.



MPO: mieloperoxidase; NO: óxido nítrico; IL: interleucina; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

O grande desafio deste trabalho foi desenvolver um hidrogel com ação fitomoduladora para acelerar a cicatrização de feridas. Tal trabalho gerou conhecimento farmacêutico e farmacológico através da ação sinérgica de constituintes de duas espécies de plantas encontradas em nossa região, *Calotropis procera* e *Caesalpinia pulcherrima* (VASCONCELOS *et al.*, 2018). Ademais, os resultados obtidos revelam um produto natural alternativo para tratar feridas. Este trabalho contribui para a inovação de bioprodutos sendo relevante e adequado para a geração de patente para aplicações biomédicas (CALO; KHUTORYANSKIY, 2015).

## 7 CONCLUSÃO

Este estudo trata da formulação de um hidrogel composto de hemiceluloses e proteínas fitomoduladoras extraídas de látex. Neste modelo de cicatrização de feridas, o grupo tratado topicamente com hidrogel HgCpPII a 0,2% demonstra uma atividade de cicatrização mais eficaz do que o grupo HgCpPII a 0,5%. As proteínas latíferas estimulam o processo inflamatório da fase cicatricial através de MPO, NO, IL1- e IL6 e reduzem a peroxidação lipídica. O hidrogel CpPII estimula os mastócitos e promove o processo cicatricial.

O ensaio de cicatrização subsequente com HgCpPII-IAA0,2% revelou que mesmo com a atividade proteolítica inibida o hidrogel CpPII permaneceu com atividade de cicatrização, indicando que o efeito das proteínas do látex não está apenas associado com a atividade proteolítica das proteínas laticíferas.

O teste de irritabilidade demonstrou que o hidrogel de hemiceluloses como veículo, não é uma substância inerte quando aplicado a pele danificada. Ele também atua estimulando o processo inflamatório através dos sinais clínicos observados e quantificados, além de liberar importantes mediadores que contribuem para a cicatrização dos tecidos.

O hidrogel não induziu irritação dérmica e estimulou eficientemente a cicatrização de feridas através da modulação de alguns aspectos da fase inflamatória, aumentando a fase proliferativa e melhorando a remodelação do tecido, atingindo a completude do reparo da ferida.

As hemiceluloses, inicialmente propostas como veículo de liberação, para as proteínas fitomoduladoras, estavam envolvidas, pelo menos em parte, na modulação do processo.

O estudo conclui ainda que a fórmula basal seria interessante para uma prospecção mais profunda da composição ideal em termos de fixação e absorção da pele.

## REFERÊNCIAS

AAMI. Standards and Recommended Practices. Biological Evaluation of Medical Devices. **Association for the Advancement of Medical Instrumentation**, v. 4, Supplement. 1997.

ABBA, D., INABO, H. I., YAKUBU, S. E., OLONITOLA, O. S. Contamination of herbal medicinal products marketed in Kaduna Metropolis with selected pathogenic bacteria. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 70-77. 2009.

AKKOL, E. K.; KOCA, U.; PEŞİN, I.; YILMAZER, D.; TOKER, G.; YEŞİLADA, E. Exploring the wound healing activity of *Arnebiadensiflora* (Nordm.) Ledeb. by in vivo models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124 n. 1, p.137-141. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.019>>.

ALBUQUERQUE, P.; COELHO, L. C.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO DA CUNHA, M. G. Approaches in biotechnological applications of natural polymers. **AIMS Molecular Science**, v. 3, n. 3, p. 386-425. 2016.

ALENCAR, N. M. N.; DA SILVEIRA BITENCOURT, F.; DE FIGUEIREDO, I. S. T.; LUZ, P. B.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; ARAGÃO, K. S.; RAMOS, M. V. Side-Effects of Irinotecan (CPT-11), the Clinically Used Drug for Colon Cancer Therapy, Are Eliminated in Experimental Animals Treated with Latex Proteins from *Calotropis procera* (Apocynaceae). **Phytotherapy Research**, v. 31, n.2, p. 312-320. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ptr.5752>>.

ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, J. S.; RIBEIRO, R. A. ; RAMOS, M. V. Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: Peritonitis, Paw edema and Hemorrhagic cystitis. **Planta Medica (Stuttgart)**, v. 70, n.12, p. 1144-1149. 2004.

ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, J. S.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; VALE, M. R.; ETCHELLES, J. P.; RAMOS, M. V. Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society** . [et Al.], v.55, n.12, p.559-564. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00011-006-6025-y>>.

ALJADI, A. M.; KAMARUDDIN, M. Y.; JAMAL, A.M.; MOHD-YASSIM, M. Y. Biochemical study on the efficacy of MalaysianHoney on inflicted wounds: an animalmodel. **Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences**, v.13, n. 3, p.125-132. 2000.

ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.341, p.215-220. 2007.

ANDERSON. Biological responses to materials. **Annu Rev Mater Res**, v. 31, p. 81-110. 2001.

ANDRADE, C. T.; AZERO, E. G.; LUCIANO, L.; GONÇALVES, M. P. Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. **International journal of biological macromolecules**, v. 26, n. 2, p. 181-185. 1999.

ANDRADE, T. A. M.; IYER, A., DAS, P. K.; FOSS, N. T.; GARCIA, S. B.; COUTINHO-NETTO; J.; FRADE, M. A. C. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 10, p.1036-1047. 2011.

ARCHANA, D.; DUTTA, P. K.; DUTTA, J. Chitosan: a potential therapeutic dressing material for wound healing. In **Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine**, p. 193-227). Springer India. 2016.

ARNHOLD, J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry (Mosc)**, v.69, p. 4-9, 2004.

ASTM (Am. Soc.Test. Mater., Annu. Book ASTM Stand.) 1999.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre. Artmed, 2005.

BABIOR, B.M. Phagocytes ad Oxidative Stress., **Am J Med.**, v.109, p. 33-44, 2000.

BARANOWSKY, A.; MOKKAPATI, S.; BECHTEL, M.; KRÜGEL, J.; MIOSGE, N.; WICKENHAUSER, C.; NISCHT, R. Impaired wound healing in mice lacking the basement membrane protein nidogen 1. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 29, n.1, p.15-21. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.09.004>>.

BAZZO, GC.; PEZZINI, BR.; ZÉTOLA, M.; NUNES, GC.; PETERS, E. The importance of evaluating the microbiological quality of raw materials used in compounding pharmacies. **ANFARMAG**, v. 56, p.10. 2006.

BLEE, T.H.; COGBILL, T.H.; LAMBERT, P.J. Hemorrhage associated with vitamin C deficiency in surgical patients. **Surgery**, v. 131, p. 408-412. 2002.

BOATENG, J. S.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N. E.; ECCLESTON, G. M. **Wound healing dressings and drug delivery systems: a review**. J Pharm Sci, v. 97, n. 8, p. 2892–2923. 2008.

BOYCE, S. T.; WARDEN, G. D. Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. **The American journal of surgery**, v.183, n. 4, p. 445-456. 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(02\)00813-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(02)00813-9)>.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254. 1976.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>>. Acesso em: 19 de jun. de 2017.

BRASIL. **Brazilian Pharmacopoeia**. Brasília: ANVISA, 5ª ed. p.258-270. 2010.

BRASIL. **Guide to quality control of cosmetic products**. Brasilia, n. 1 p. 121. 2008.

BROUGHTON, G. 2.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plast Reconstr Surg**, n. 117. 2006.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 10, p. 2675-2685. 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S141381232012001000017&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141381232012001000017&lng=en&nrm=iso)>.

BRUNO-MORENO, F.; SOMBRA BASÍLIO DE OLIVEIRA, R.; DE AZEVEDO MOREIRA, R.; PINTO LOBO, M. D.; TEIXEIRA DE FREITAS, C. D.; VIANA RAMOS, M.; OLIVEIRA MONTEIRO-MOREIRA, A. C. Crystallization and X-ray diffraction analysis of an antifungal laticifer protein. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 69 (Pt 6), p. 646-649. 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1107/S1744309113011378ED>>.

BURITI, F. C. A.; DOS SANTOS, K. M. O.; SOMBRA, V. G.; MACIEL, J. S.; TEIXEIRA SÁ, D. M. A.; SALLES, H. O.; EGITO, A. S. Characterisation of partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 512-521. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.015>>.

BURLANDO, B.; CORNARA, L. Honey in dermatology and skin care: a review. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.12, n. 4, p.306-313, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jocd.12058>>.

CALO, E.; KHUTORYANSKIY, V.V. **Biomedical applications of hydrogels**: a review of patents and commercial products. *Eur Polym J*; v. 65, p. 252–267. 2015.

CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two- electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. **Biochemical Journal**, v. 336, p. 395-404, 1998.

CERQUEIRA, M. A.; PINHEIRO, A. C.; SOUZA, B. W. S.; LIMA, Á. M. P.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; VICENTE, A. A. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers**, v.75, n. 3, p.408-414, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.07.036>>.

CHAKAVALA, SR.; PATEL NG.; PATE NV.; THAKKAR VT.; PATEL KV.; GANDHI TR. Development and in vivo evaluation of silver sulfadiazine loaded hydrogel consisting polyvinyl alcohol and chitosan for severe burns. **J Pharm BioallSci**, v. 4, p. 54-60. 2012.

CHAKHAIRNAR, A. K.; BHAMARE, S. R.; & BHAMARE, H. P. *Calotropis procera*: an ethnopharmacological update. **Advance Research in Pharmaceuticals and Biologicals**, v. 2, n. 2, p. 142-156. 2012.

CHAPEKAR MS. **J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomat**, v. 33, p.199-203. 1996.

CHAUDHARY, P.; AHAMAD, S.; & KHAN, N. A. A review on medicinal utility of *Calotropis procera*. **World Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 3, n.1, p. 335-342. 2017.

CHAUDHARY, P.; DE ARAÚJO VIANA, C.; RAMOS, M. V.; KUMAR, V. L. Antiedematogenic and antioxidant properties of high molecular weight protein sub-fraction of *Calotropis procera* latex in rat. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 6, n.2, p.69-73. Disponível em: <<https://doi.org/10.4103/0976-0105.152098>> 2015.

CHAUDHARY, P.; RAMOS, M. V.; VASCONCELOS, M. DA S.; KUMAR, V. L. Protective Effect of High Molecular Weight Protein Sub-fraction of Calotropis procera Latex in Monoarthritic Rats. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 2, p. 147-151. Disponível em: <<https://doi.org/10.4103/0973-1296.182151>> 2016.

CHEN, J. C.; CHEN, H. M.; SHYR, M. H.; FAN, L. L.; CHI, T. Y.; CHI, C. P.; CHEN, M. F. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. **Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi**, v.99, n.3, p.213-218, 2000.

CHILDS, D. R.; MURTHY, A. S. Overview of Wound Healing and Management. **Surgical Clinics of North America**, v.97, n. 1, p.189-207, 2017. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2016.08.013>>.

CIGHETTI, G.; DEBIASI, S.; PARONI, R.; ALLEVI, P. Free and total malondialdehyde assessment in biological matrices by gas chromatography-mass spectrometry: what is needed for an accurate detection. **Analytical Biochemistry**, v.266 n. 2, p.222–229, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/abio.1998.2952>>.

COURA, C. O.; CHAVES, H. V.; DO VAL, D. R.; VIEIRA, L. V.; SILVEIRA, F. D.; DOS SANTOS LOPES, F. M. L.; BENEVIDES, N. M. B. Mechanisms involved in antinociception induced by a polysulfated fraction from seaweed Gracilaria cornea in the temporomandibular joint of rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, 76–84. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.017>> 2017.

CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **European Journal of Pharmacology**, v.129, n.1–2, p.65–76, 1986.

CURI, R.; PEREIRA, L. M.; BALBINO, C. A. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, 2005.

DAFNA KESSELMAN, D.; KOSSOVER, O.; MIRONI-HARPAZ, I.; SELIKTAR, D. Time-dependent cellular morphogenesis and matrix stiffening in proteolytically responsive hydrogels. **Acta Biomaterialia**, v 9, n 8, p. 7630-7639. 2013.

DA-LOZZO, E. J., MOLEDO, R. C. A., FARACO, C. D., ORTOLANI-MACHADO, C. F., BRESOLIN, T.M. B., SILVEIRA, J. L. M. Curcumin/xanthan-galactomannan hydrogels: Rheological analysis and biocompatibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, p. 279–284. 2013.

DE FREITAS A, M. G., BAUAB, T. M. Microbial quality of medicinal plant materials. **Latest research into quality control**, Akyar I (Ed.), InTech, p. 67-81. 2012.

DE MORAES SOARES, G., DOS SANTOS, L. M., ONOFRE, F. R., SILVA, S. P., FABIAO, C. D., & ROCHA, A. D. S. R. Microbiologic quality of hand creams in Pelotas, Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9 n.18, p.1275-1280. 2015.

DE OLIVEIRA, N. D. C. ; Ralph, M. T. ; Batista, J. E. C. ; Silva, D. M. F. ; Gomes-Filho, M. A., Alencar, N. M., ... & Lima-Filho, J. V. Latex protein extracts from Calotropis procera with immunomodulatory properties protect against experimental infections with Listeria monocytogenes. **Phytomedicine**, v. 23, n. 7, p. 745-753. 2016.

DEMIDOVA-RICE, T. N.; GEEVARGHESE, A.; HERMAN, I.M. Bioactive peptides derived from vascular endothelial cell extracellular matrices promote microvascular

morphogenesis and wound healing in vitro. **Wound Repair and Regeneration**, v.19, n.1, p.59-70. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00642.x>>.

DOGRA, S.; REENA, R. Venous Leg Ulcer: Topical Treatment, Dressings and Surgical Debridement. **Indian Dermatology Online Journal**, v.5, n.3,p.371–373, 2014.Disponível em: <<https://doi.org/10.4103/2229-5178.137820>>.

DRAIZE, J. H. Dermal toxicity in appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics. **Association of Food and Drug Officials of the United States**, Austin, Texas, 1959.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.82, n. 3, p.377–390, 1944.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.186, p.421- 431, 1990.

DUBEY, N.K.; KUMAR, R.; TRIPATHI, P. **Global promotion of herbal medicine: India's opportunity**. Curr. Sci., v 86, p. 37-41. 2004

DUNNILL, C.; Patton, T.; BRENNAN, J.; BARRETT, J.; DRYDEN, M.; COOKE, J.; GEORGOPOULOS, N. T.. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **International Wound Journal**. 2015.

DUREJA, H.; KAUSHIK, D.; GUPTA, M.; KUMAR, V.; LATHER, V. **Cosmeceuticals: An emerging concept**. Indian J. Pharm. 37, 155–159, 2005.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p.435-450, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442003000400012>>.

DUTOK, C. M. S.; BERENQUER-RIVAS, C. A.; RODRIGUEZ-LEBLANCH, E.; PEREZ-JACKSON, L.; QUEIROZ. Acute toxicity and dermal and eye irritation of the aqueous and hydroalcoholic extracts of the seeds of "zapote" *Pouteriamammosa* (L.) Cronquist. **The Scientific World Journal**, v. 2015, e642906, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2015/642906>>.

DUTRA, M. G. **Plantas Medicinais, Fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás**. [dissertação]. Anápolis. UniEvangélica. 2009.

EDMAN M.D. Nutrient and cardenolide composition of solvent extracted **Calotropis procera**. J.agri. Food. Chem, v. 313, p. 509-513. 1983.

EGOROV, A. V.; MESTECHKINA, N. M.; SHCHERBUKHIN, V. D. Composition and structure of galactomannan from the seed of *Gleditsia ferox* Desf. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.40,n. 3, p.314-318. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/B:ABIM.0000025959.89870.c7>>.

EGOZI, E. I.; FERREIRA, A. M.; BURNS, A. L.; GAMELLI, R. L.; DIPIETRO, L. A. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v.11, n. 1, p.46-54, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2003.11108.x>>.

EMING SA. 12.5. 1 Etiology and pathophysiology. **Therapy Skin Dis**, v. 288, p. 735-736. 2010.

FDA Blue Book Memor. G95-1: FDA-modified version of ISO 10,993-1, **Biological evaluation of medical devices** - Part 1. Evaluation and testing, 1995.

FEES, S.; KURFISS, K.; FEDKIW, R. P.; MICHELS, D. L. Accurate simulation of wound healing and skin deformation. **In Proceedings of the ACM SIGGRAPH/Eurographics Symposium on Computer Animation**, p. 129-137. Eurographics Association. 2016.

FERREIRA, A. M. O uso de papaína no tratamento de feridas. In: MALAGUTTI W.; KAKIHARA, C.T. (orgs.). **Curativos, estomias e dermatologia: uma abordagem multiprofissional**. 1ª ed. São Paulo: Martinari, p.149-161. 2010.

FERREIRA, L. M.; BLANES, L.; GRAGNANI, A.; VEIGA, D. F.; VEIGA, F. P.; NERY, G. B.; OKAMOTO, R. Hemicellulose dressing versus rayon dressing in the re-epithelialization of split-thickness skin graft donor sites: a multicenter study. **Journal of Tissue Viability**, v. 18, n. 3, p. 88-94. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.itv.2009.06.001>>.

FIGUEIREDO, I. S. T.; OLIVEIRA, R. S. B.; FREITAS, L. B. N.; PINHEIRO, R. S. P.; BRITO, G.A.C.; RAMOS, M. V.; ALENCAR, N. M. N. Wound healing modulation by a biomembrane of laticifers proteins from *calotropisprocera* (ait.) R. Br. In: International congress on natural products research, 2012, New York. **Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research**, v. 78. p. 1027-1310. 2012.

FIGUEIREDO, I. S. T.; RAMOS, M. V.; RICARDO, N. M. P. S.; GONZAGA, M. L. DA C.; PINHEIRO, R. S. P.; DE ALENCAR, N. M. N. Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. **Process Biochemistry**, v. 49,n. 3, p. 512-519. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.015>>.

FOWLER, J.F.; WOOLERY-LOYD, H.; WALDORF, H.; SAINI, R. Innovations in natural ingredients and their use in skincare. **J. Drugs Dermatol**, v. 9, p. 72–81. 2010

FRADE, M. A. C.; SALATHIEL, A. M.; MAZZUCATO, E. L.; NETTO, J. C.; FOSS, N. T. A natural biomembrane as a new proposal for the treatment of pressure ulcers. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v. 34, n. 3, p. 137-142.B. 2006.

FREITAS, A. P. F.; BITENCOURT, F. S.; BRITO, G. A. C.; DE ALENCAR, N. M. N., RIBEIRO, R. A.; LIMA JÚNIOR, R. C. P.; VALE, M. L. Protein fraction of *Calotropis procera* latex protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis associated with downregulation of pivotal pro-inflammatory mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 10, p. 981-990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00210-012-0778-3>>. 2012.

FREITAS, C. D. T.; NOGUEIRA, F. C. S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; DOMONT, G. B.; RAMOS, M. V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant physiology and biochemistry**, v. 49, n.7, p. 738-743. 2011.

FREITAS, C. D. T.; OLIVEIRA, J. S.; MIRANDA, M. R. A.; MACEDO, N. M. R.; SALES, M. P.; VILLAS BOAS, L. A.; RAMOS, M. V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry: PPB**, v.45, n. 10-11, p.781-789. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.07.020>>.

FREITAS, D. C.; CRUZ, W. T.; PORFÍRIO, C. T.; SILVA, M. Z., OLIVEIRA, J. S.; CARVALHO, C. P.; RAMOS, M. V. Identification and characterization of two germin-like proteins with oxalate oxidase activity from *Calotropis procera* latex. **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 1051-1061. 2017.

GHADI,R.; JAIN,A.; KHAN,W.; DOMB, A.J. Microparticulate polymers and hydrogels for wound healing. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, p. 203-225. 2016.

GHOSH, P.K.; GABA, A. Phyto-extracts in wound healing. **J. Pharm. Pharm. Sci**, v.16, p. 760-820. 2013.

GOLDBERG, S. R.; DIEGELMANN, R. F. Basic Science of Wound Healing. In *Critical Limb Ischemia*. **Springer International Publishing**, p. 131-136. 2017.

GOLDMAN, R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. **Advances in Skin Wound Care**, v.17, n. 1, p. 24–35. 2004.

GONEN WADMANY, M.; GOLDSHMID, R.; SELIKTAR, D. Biological and mechanical implications of PEGylating proteins into hydrogel biomaterials. **Biomaterials**, v. 32, n. 26, p. 6025-6033. 2011.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, n. 1, p.131-138. 1982.

GUPTA, S.; GUPTA, B.; KAPOOR, K.; SHARMA, P. Ethnopharmacological potential of *Calotropis procera*. An overview. **Int Res J Pharm**, v. 3, n. 12, p. 19-21. 2012.

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

HALL, L.W.; CLARK, K.W. **Veterinary anaesthesia**. 9<sup>a</sup> ed. 1991.

HALLIWEL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food Chemistry Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617. 1995.

HEDLUND, C.S. Cirurgia do Sistema tegumentar. In: FOSSUM T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 2<sup>a</sup> ed. Roca: São Paulo, p.135-230. 2005.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **Veterinary Clinics, Small Animal Practice**, v.36, p.667-85, 2006.

HOSSEINKHANI. A.; FALAHATZADEH. M.; RAOOFI. E.; ZARSHENAS. M.M. An evidence-based review on wound healing herbal remedies from reports of traditional Persian medicine. **J Evid Based Complementary Altern Med**, v. 22, n. 2, p. 334-343. 2016.

HU, M. S. M.; RENNERT, R. C.; MCARDLE, A.; CHUNG, M. T.; WALMSLEY, G. G.; LONGAKER, M. T.; LORENZ, H. P. The role of stem cells during scarless skin wound healing. **Advances in wound care**, v.3, n. 4, p.304-314, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/wound.2013.0471>>.

ISO (Int. Stand. Organ.) Geneva, Switz. 10,993, Biological evaluation of medical devices. **Tests for irritation and sensitization**; ISO 1993. 10,993-11.

IUONUT, M. A. M.; DINDELEGAN, G. C.; CIUCE, C. Proteases as biomarkers in wound healing. **TMJ**, v. 61, p. 65-73. 2011.

JEEVANANDHAM, S.; DHACHINAMOORTHY, D.; BANNOTH CHANDRA SEKHAR, K. Drug Release Studies from *Caesalpinia pulcherrima* Seed Polysaccharide. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR**, v. 10, n. 3, p. 597-603. 2011.

JIA, Y.; ZHAO, G.; JIA, J. Preliminary evaluation: the effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, n. 2, p.181-189. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.008>>.

JORGE, M. P.; MADJAROF, C.; RUIZ, A. L.T. G.; FERNANDES, A. T.; RODRIGUES, R. A. F.; SOUSA, I. M. O.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 361-366. 2008.

KISMANN, K.G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. **BASF**. 2ª ed, São Paulo. 1999.

KLEMM. D.; HEUBLEIN. B.; FINK H.P. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angew Chem Int. ed.** 44, p. 3358-3393. 2005.

KNEIFEL, W., CZECH, E., KOPP, B. Microbial contamination of medicinal plants- A review. **Planta Medica**, v. 68, p. 5-15. 2002.

KO, G. M.; ROSENKRANZ, A.; BERTONCINI, C. R. A.; JURKIEWICZ, N. H. FRANCO, M. G.; JURKIEWICZ, A. Methods of acute biological assays in guinea-pigs for the study of toxicity and innocuity of drugs and chemicals. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 251-263. 2010.

KOKANE D. D.; MORE R.Y.; KALE. M. B.; NEHETE. M.N.; MEHENDELE. P.C, et al. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **J Ethnopharmacol**, v. 124, p 311-315. 2009.

KOOP, H. S., DE FREITAS, R. A., DE SOUZA, M. M., SAVI-JR, R., & SILVEIRA, J. L. M. Topical curcumin-loaded hydrogels obtained using galactomannan from *Schizolobium parahybae* and xanthan. **Carbohydrate polymers**, v.116, p. 229-236. 2015.

KUMAR V. L.; ARYA S. Medicinal uses and pharmacological properties of *Calotropis procera*. In: Govil JN.; Singh VK, Arunachalam C, editors. **Recent progress in medicinal plants**, vol. 11. Houston, Texas: Studium Press LLC, p. 373-388. 2006.

KUMAR, M. S.; KIRUBANANDAN, S.; SRIPRIYA, R.; SEHGAL, P. K. Triphala promotes healing of infected full-thickness dermal wound. **The Journal of Surgical Research**, v.144, n. 1, p. 94-101. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.02.049>>.

KUMAR, N. A.; RAJAN, V. T.; CHETTY, C. M. A review on stability studies an overview. **Int. J. Rev. Life Sci**, v. 1, p. 105-111. 2011.

KUMAR, V.L.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, p. 123-125. 1994.

KUMAR, VIJAY L.; CHAUDHARY, PRIYANKA.; RAMOS, MARCIO V. ; MOHAN, MADAN.; MATOS, MAYARA P. V. Protective Effect of Proteins Derived from the Latex of *Calotropis procera* against Inflammatory Hyperalgesia in Monoarthritic Rats. **PTR. Phytotherapy Research**, p. n/a-n/a, 2011.

KUMAR, VIJAYL ; CHAUDHARY, PRIYANKA ; DE ARAÚJO VIANA, CAROLINA; RAMOS, M. V . Antiedematogenic and antioxidant properties of high molecular weight protein sub-fraction of *Calotropis procera* latex in rat. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 6, p. 69-73, 2015.

KYRIAKIDES, T.R.; MACLAUHLAN, S. The role of thrombospondins in wound healing, ischemia, and the foreign body reaction. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v.3, p. 215-225. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12079-009-0077-z>>.

LANGONE, J.J. Immunotoxicity Testing Guidance, Draft Document, **Office of Science and Technology**, 1998.

LEE, J. H.; KIM H. G. ; LEE, W. J. Characterization and tissue incorporation of cross-linked human acellular dermal matrix. **Biomaterials**, v. 44, p. 195-205. 2015.

LEITE, A.P.; OLIVEIRA, B.G.R.B.; SOARES, M.F.; BARROCAS, D.L.R. Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v.33. p.198-207. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1983-14472012000300026>>.

LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Bras. Nutr. Clín.**, v.18, n.2, p.60-65, 2003.

LEVENSON, S.M. et al. The healing of rat skin wounds. **Ann. Surg**, v. 161, p. 293-308. 1965.

LI, P.; ZHAO, J.; CHEN, Y.; CHENG, B.; YU, Z.; ZHAO, Y.; JIN, S. Preparation and characterization of chitosan physical hydrogels with enhanced mechanical and antibacterial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1383-1392. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.016>>.

LIM, J.; ALI, Z. M.; SANDERS, R. A.; SNYDER, A. C.; EELLS, J. T.; HENSHEL, D. S.; III, J. B. W. Effects of low-level light therapy on hepatic antioxidant defense in acute and chronic diabetic rats. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 23, n. 1, p. 1-8, 2009.

LIMA, R. C. S.; SILVA, M. C. C.; AGUIAR, C. C. T.; CHAVES, E. M. C.; DIAS, K. C. F.; MACEDO, D. S.; DE SOUSA, F. C. F.; CARVALHO, K. M.; RAMOS, M. V.; VASCONCELOS, S. M. M. Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. **Epilepsy & Behavior** (Print), v. 23, p. 1-7, 2012.

LIMA, R.; LIMA, N.; CHAVES, E.; LEAL, L.; PATROCINIO, M.; LOBATO, R.; RAMOS, M. V.; SOUSA, F. C. F.; CARVALHO, K.; VASCONCELOS, S. Central Nervous System Activity of Acute Administration of Latex Proteins from *Calotropis procera* in Mice. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**: an international forum for evidence based practices, v. 7, p. 9-12, 2010.

LIMA FILHO, JOSE V.; PATRIOTA, JOYCE M.; SILVA, AYRLES F.B.; FILHO, NICODEMOS T.; OLIVEIRA, RAQUEL S.B.; ALENCAR, NYLANE M.N.; RAMOS, MÁRCIO V. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal

infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 327-334, 2010.

LIU, S.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; LU, W.; HUANG, X.; XIE, H.; DENG, Z. et al. Synergistic angiogenesis promoting effects of extracellular matrix scaffolds and adipose-derived stem cells during wound repair. **Tissue Engineering Part A**, v.17, n. 5-6, p.725-739. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0331>>.

LORENZ, H. P.; LONGAKER, M. T.. Wounds: biology, pathology, and management. In **Essential Practice of Surgery**, p. 77-88. Springer, New York, NY. 2003

LOVVORN, H.N. et al. Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair. **J Pediatr Surg**, v. 34, p. 218-223. 1999.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and Macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.** v.15, p.323-350.1997.

MAMBOYA, E. A. F. Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.8, n. 2, p.99-104, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2012.99.104>>.

MANSOURZADEH, A.; MEHRI, S. N.; NOURANI, M. R. Role of Tissue Scaffolds in Skin Wound Healing: A Systematic Review. **Journal of Applied Tissue Engineering**, v. 2, n. 1. 2015.

MARINHO, P. C.; NETO-FERREIRA, R.; JOSE DE CARVALHO, J. **Evaluation of therapeutic intervention with a natural product in Cutaneous wound healing: The use of capybara oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** 2013.

MATSUMURA, Y. A Histopathological and Immunohistochemical Study of Wound Healing Mechanism and Biological Effect of Low-Energy Laser Irradiation in Type 2 Diabetic Model Mice. **International Journal of Oral-Medical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1-13. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.5466/ijoms.6.1>>.

MCCARTY, S. M.; PERCIVAL, S. L. Proteases and Delayed Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 8, p.438-447. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/wound.2012.0370>>.

MEDHI, B.; PURI, A.; UPADHYAY, S.; KAMAN, L. Topical application of honey in the treatment of wound healing: a metaanalysis. **JK Science**, v.10n. 4, p.166-169. 2008.

MOGOSANU, G.D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **Int J Pharm**, v. 463, n. 2, p. 127-136. 2014.

MONETTA L. Uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**. Brasília, v. 40, p. 66-73. 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0034-71671987000100012>>.

NOURSADEGHI, M.; TSANG, J.; HAUSTEIN, T.; MILLER, R. F.; CHAIN, B. M.; KATZ, D. R. Quantitative imaging assay for NF-kappaB nuclear translocation in primary human macrophages. **Journal of Immunological Methods**, v.329, n. 1-2, p.194-200. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.10.015>>.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. 2000. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>>.

OLIVEIRA, J. S.; COSTA LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCA, N. M.; MARINHO FILHO, J. D.; FIGUEIREDO, I. S.; RAMOS, M. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 382, p. 139-149. 2010.

OLIVEIRA, J. S.; PEREIRA, D. B.; FREITAS, C. D. T.; MARINHO FILHO, J. D. B.; MORAES M. O.; PESSOA, C.; RAMOS, M. V. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait) R. Br. **Toxicol In Vitro**, v. 21, p. 1563-1573. 2007.

OLIVEIRA, RAQUEL S. B.; FIGUEIREDO, INGRID S. T.; FREITAS, LYARA B. N.; PINHEIRO, RACHEL S. P.; BRITO, GERLY ANNE C. ; ALENCAR, NYLANE M. N.; RAMOS, MARCIO V.; RALPH, MARIA T.; LIMA FILHO, JOSE. V. Inflammation induced by phytochemical proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. **Inflammation Research**, v. 1, p. 1-5, 2012.

OPALENIK, S.R.; DAVIDSON, J.M. Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. **FASEB J**, v. 19, p. 1561-1563. 2005.

ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 5, p.661-674. 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1002/emmm.201202382>>.

OSKERITZIAN, C. A. Mast cells and wound healing. **Advances in wound care**, v. 1, n. 1, p. 23-28. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/wound.2011.0357>>.

OZTÜRK, F.; ERMERTCAN, A. T. Wound healing: a new approach to the topical wound care. **Cutaneous and ocular toxicology**, v.30, n. 2, p. 92-99, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/15569527.2010.539586>>.

PAL, K.; BANTHIA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Hydrogels for biomedical applications: a short review. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**. 2007.

PARIHAR, G.; BALEKAR, N. *Calotropis procera*: A phytochemical and pharmacological review. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3. 2016.

PARK, J. E.; ABRAMS, M. J.; EFRON, P. A.; BARBUL, A. Excessive nitric oxide impairs wound collagen accumulation. **Journal of Surgical Research**, v. 183, n. 1, p. 487-492. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2012.11.056>>.

PARK, J.E.; BARBUL, A.B. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am. J. Surg.**, v. 187, p. 11-16, 2004.

PAVLETIC, M.M. Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery. 3<sup>a</sup> ed. **Wiley-Blackwell**. Iowa, p.357-378. 2010.

PIERCE GF, TARPLEY JE, YANAGIHARA D, MUSTOE TA, FOX GM, THOMASON A. Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. **Am J Pathol**, v.140, p. 1375-1388. 1992.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M. **Biological control of quality pharmaceutical, cosmetic and related products**. São Paulo: Atheneu. 2010.

PORSANI, M. Y. H.; CARVALHO, L. A. R.; PEREIRA, C. S.; PALUDETTI, M.; ZANGERONIMO, M. G.; PEREIRA, L. J. The use of papain gel cream and sunflower oil in promoting healing in a wound in dogs: three case reports. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 5, p.1201-1206. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-4162-8561>>.

PORTOU, M. J.; BAKER, D.; ABRAHAM, D.; TSUI, J. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review. **Vascular pharmacology**, v.71, p.31-36, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2015.02.007>>.

PRATA, M. B.; HADDAD, C. M.; GOLDENBERG, S.; SIMÕES, M. DE J.; MOURA, L. A. R. DE.; TRABULSI, L. R. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em rato. **Acta cir. bras**, v.3, n. 2, p.43-48. 1988.

PUXEDDU, I.; PILIPONSKY, A. M.; BACHELET, I.; LEVI-SCHAFFER, F. Mast cells in allergy and beyond. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 35, n. 12, p. 1601-1607. 2003.

RAHMAN M.A.; WILCOCK, C.C. A Taxonomic revision of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae). **Nordic. J. Botany**, v. 11, n. 3, p. 240-246. 1991.

RAMOS, M. V.; AGUIAR, V. C.; MACEDO, N. M. R.; OLIVEIRA, J. S.; OLIVEIRA, R. S. B.; ALENCAR, N. M. N. Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 115-122. 2007.

RAMOS, M. V.; ARAÚJO, E. S.; JUCÁ, T. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; VASCONCELOS, I. M.; MOREIRA, R. A.; MORENO, F. B. New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 211-219. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.001>>.

RAMOS, M. V.; DE ALENCAR, N. M. N.; DE OLIVEIRA, R. S. B.; FREITAS, L. B. N.; ARAGÃO, K. S.; DE ANDRADE, T. A. M.; de Figueiredo, I. S. T. Wound healing modulation by a latex protein-containing polyvinyl alcohol biomembrane. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 7, p. 747-756. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00210-016-1238-2>>.

RAMOS, M. V.; PEREIRA, D. A.; SOUZA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D.; CAVALHEIRO, M. G.; CARVALHO, A. F. Potential of laticifer fluids for inhibiting *Aedes aegypti* larval development: evidence for the involvement of proteolytic activity. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 805-812. (2009a). Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000600001>>.

RAMOS, M. V.; FREITAS, C. D. T. ; VASCONCELOS, S. M. M.. Antinociceptive activity of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Holanda, v. 99, p. 125-129. 2005.

RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, THALLES B. ; FREIRE, EDER A. ; SALES, MAURICIO P. ; SOUZA, DIEGO P. ; ARAUJO, ELIANE S. ; FREITAS, CLEVERSON D. T.. The

defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. *Anthropod-plant interactions* (Online), v. 4, p. 57-67, 2010.

RAMOS, M. V.; VIANA, C.A.; SILVA A. F.; FREITAS, C.D; FIGUEIREDO, I.S.; OLIVEIRA, R.S. *et al.* Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin-and plasmin-like activities. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacol**, v.385, p.455-63, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00210-012-0733-3>.

RAMOS, MARCIO V.; OLIVEIRA, JEFFERSON S.; FIGUEIREDO, JOZI G.; FIGUEIREDO, INGRID S.T.; KUMAR, VIJAY L.; BITENCURT, FLAVIO S.; CUNHA, F.Q.; OLIVEIRA, RAQUEL S.B.; BOMFIM, LIEZELOTTE R.; LIMA-FILHO, JOSE VITOR; ALENCAR, N. M. Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 1-10. 2009 (b).

RAPPOLEE, D.A.; MARK, D.; BANDA, M.J.; WERB, Z. Wound macrophages express TGF- $\alpha$  and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. **Science**, v. 241, p. 708-712. 1988.

RASIK AM, RAGHUBIR, R; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M. P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H. K.; KULSHRESTHA, D. K. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **J Ethnopharmacol**, v. 68, p. 261-266. 1999.

RATAJCZAK, M.; KUBICKA, M. M.; KAMIŃSKA, D.; SAWICKA, P.; DŁUGASZEWSKA, J. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 303-307. 2015.

REBELLO, T. **Guide to cosmetic products**. São Paulo: Senac, 7. 2004.

REISS, M. J.; HAN, Y. P.; GARCIA, E.; GOLDBERG, M.; YU, H.; GARNER, W. L. Matrix metalloproteinase-9 delays wound healing in a murine wound model. **Surgery**, v.147. n. 2, p. 295-302, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.surg.2009.10.016>>.

REX, J. R. S.; MSA MUTHUKUMAR, N.; PAULRAJ, M. S. Plant-Derived Compounds for Wound Healing- A Review. **Organic & Medicinal Chem IJ**, v. 5, n. 1: 555653. DOI: 10.19080/OMCIJ.2018.04.555653. 2018.

REXTHANGAPAZHAM, R. L.; SHARAD, S.; MAHESHWARI, R.K. Phytochemicals in Wound Healing. **Adv. Wound Care** (New Rochelle), v. 5, n. 5, p. 230-241. 2016.

RIBEIRO, A. S., ESTANQUEIRO, M., OLIVEIRA, M. B., & SOUSA LOBO, J. M. Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. **Cosmetics**, v. 2, n. 2, p. 48-65. 2015.

RIBEIRO, G. R. **Cosmetology applied to Derma-Stetics**. São Paulo: Pharmabooks, v. 2. 2010.

RICHERS, D. W. Macrophage involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R. A. F. (Ed.) **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Plenum, p. 143-168. 1996.

RINAUDO M. Main properties and current applications of some polysaccharides asbiomaterials. **Polymlnt**, v. 57, p. 397-430. 2008.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S. **Patologia**: Bases Patológicas das doenças. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2010.

ROCHA, R.P.A.; GURJÃO, W.S.; BRITO JUNIOR, L.C. Avaliação morfológica da cicatrização de lesões ulcerativas assépticas tratadas com soluções de papaína. In: **CONGRESSO VIRTUAL HISPANOAMERICANO DE ANATOMIA PATOLÓGICA**. 7ª ed, 2005.

ROGERO, S. O.; MALMONGE, S. M.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; MIYAMARU, L.; CRUZ, Á. S. Biocompatibility study of polymeric biomaterials. **Artificial organs**, v. 27, n. 5, p. 424-427. 2003

ROMANA SOUZA, B.; OTRANTO, M.; VIEIRA, A. M.; FILGUEIRAS, C. C.; FIERRO, I. M.; MONTE ALTO COSTA, A. Rotational stress-induced increase in epinephrine levels delays cutaneous wound healing in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 3, p. 427-437. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.11.012>>.

ROY, N.; SAHA, N.; SÁHA, P. Stability study of novel medicated hydrogel wound dressings. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 62, n. 3, p. 150-156. 2013.

ROZAINI, M. Z.; ZUKI, A. B. Z.; NOORDIN, M. M.; NORIMAH, Y.; NAZRUL-HAKIM, A. Macroscopic evaluation of burn wounds healing progress treated with different types of honey. **Pakistan Journal of Biological science**, v.8, n. 5, p. 672-678. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.3923/pjbs.2005.672.678>>.

SADAVA, E. E.; KRPATA, D. M.; GAO, Y., ROSEN, M. J.; NOVITSKY, Y. W. Wound healing process and mediators: Implications for modulations for hernia repair and mesh integration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.102, n. 1, p. 295-302. 2014.

SAFIEH GARABEDIAN, B.; KANAAN, S. A.; JALAKHIAN, R. H.; JABBUR, S. J.; SAADÉ, N. E. Involvement of interleukin-1 beta, nerve growth factor, and prostaglandin-E2 in the hyperalgesia induced by intraplantar injections of low doses of thymulin. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.11, n. 3, p.185-200. 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/brbi.1997.0491>>.

SANCHEZ NETO, R.; BARONE, B.; TEVES, D.C. et al. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2 por cento. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.8, p.18-23. 1993.

SCHÄFFER, M. R.; TANTRY, U.; GROSS, S. S.; WASSERKRUG, H. L.; BARBUL, A. Nitric oxide regulates wound healing. **Journal of Surgical Research**, v.63, n. 1, p. 237-240, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/jsre.1996.0254>>.

SCHEFFER, M. C.; MING, L. C.; ARAÚJO, A. J. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT C.O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro** [on-line]. Petrolina: Embrapa Semi-Arido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999. **Versão**, v. 1, Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catpub.html>>. Acesso em: 03 mai 2017.

SEO, C. S.; LEE, Y. K.; KIM, Y. J.; JUNG, J. S.; JAHNG, Y.; CHANG, H. W.; SON, J. K. Protective effect of lignans against sepsis from the roots of *Saururus chinensis*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 523-526. 2008.

SHUKLA O.P.; KRISHNAMURTI C.R: Properties and partial purification of bacteriolytic enzyme from the latex of *Calotropis procera* (Madar). **J.Sci. indust.Res.** 20c, p. 109-112. 1961.

SILVA, L. M. A. **Galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima*: biossíntese, estrutura e aplicação em matrizes cromatográficas**, 2005, 175 f. Tese (Doutorado em bioquímica) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2005.

SILVA, M.A.P.; MEDEIROS-FILHO, S. Morfologia de fruto, semente e plântula de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Ciência Agronômica**, v.37, n.3, p.320-325, 2006.

SMART, R.; SPOONER, D. F. Microbiological spoilage in pharmaceuticals and cosmetics. **J Soc Cosmet Chem**, v. 23, p. 721-737. 1972.

SOUZA, D. G.; CASSALI, G. D.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **British Journal of Pharmacology**, v.134, n. 5, p. 985-994. 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704336>>.

STADELMANN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **Am J Surg**, v 176, p, 26-38, 1998.

SUDESH, G.; BHAWANA, G.; KARISHMA, K.; POOJA, S. Ethnopharmacological potential of *Calotropis procera*: an overview. **International Research Journal of Pharmacy**. 2012.

SUNG J S, YONG C. Gel characterization and in vivo evaluation of minocycline wound dressing with enhanced wound healing. **Int. J. Pharm**, v. 392, p. 232-240. 2010.

SZABOWSKI, A et al. C-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. **Cell**, v. 103, p. 745-755, 2000.

THAKUR, R.; JAIN, N.; PATHAK, R.; SANDHU, S. S. (2011). Practices in wound healing studies of plants. **Evidence-based complementary and alternative medicine**. 2011.

THBAHRAMSOLTANI, F.R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. **Arch Dermatol Res**. Jun 4. 2014.

THOMBRE, N. A.; GIDE, P. S.. Rheological characterization of galactomannans extracted from seeds of *Caesalpinia pulcherrima*. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 547-554. 2013 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.051>>.

THORNE CH. **Grabb and Smith's plastic surgery**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2013.

VASCONCELOS, M. S.; SOUZA, T. F. G.; FIGUEIREDO, I. S.; SOUSA, E. T.; SOUSA, F. D.; MOREIRA, R. A.; ALENCAR, N. M. N.; LIMA FILHO, J. V.; RAMOS, M. V. A phytomodulatory hydrogel with enhanced healing effects. **Phytotherapy Research**. London, v. 32, p. 688-697, Feb. 2018.

VASCONCELOS, M.S.; GOMES ROCHETTE, N. F.; DE OLIVEIRA, M. L. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; TOMÉ, A. R.; MAIA DE SOUSA, F. Y.; DE MELO, D. F. Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) in mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 12, p.1648- 1655. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1535370215576299>>.

VELLOSA, J.C.R.; BARBOSA, V.F.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, p.119-130, 2007.

VIANNAZHOU, S.; KOH, H.; GAO, Y.; GONG, Z.; LEE, E.J.D.; Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. **Life Sci**, vol. 74, p. 935-968, 2004.

WELLER, K.; FOITZIK, K.; PAUS, R.; SYSKA, W.; MAURER, M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. **The FASEB Journal**, v.20, n. 13, p.2366-2368. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1096/fj.06-5837je>>.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 835-870. 2003.

WESTBY, M. J.; NORMAN, G.; DUMVILLE, J. C.; STUBBS, N.; CULLUM, N. Protease-modulating matrix treatments for healing venous leg ulcers. **The Cochrane Library**. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/14651858.CD011918>>.

WILGUS, T. A. Immune cells in the healing skin wound: influential players at each stage of repair. **Pharmacological research**, v.58, n. 2, p.112-116, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.07.009>>

WILLIAMS, D. Definitions in biocompatibility: Proceedings of a Concensus Conference of the European Society for Biomaterials. **London: Elsevier Science**, 1987.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **American Journal of Surgery**, v.183, p.406-412, 2002.

WOOLF, N.: Basic and Systemic Pathology. W.B. Saunders Company, Chap.8 the natural history of inflammation II: **Wound healing**, p 75-83. 1998.

WULFF BC, PARENT AE, MELESKI MA, et al. Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. **J Invest Dermatol** , v. 132, p. 458-465. 2012.

WULFF, B. C., & WILGUS, T. A. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 8, p. 507-510. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/exd.12169>>.

YANG, S. W.; GENG, Z. J.; MA, K.; SUN, X. Y.; FU, X. B. Comparison of the histological morphology between normal skin and scar tissue. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v.36, p.265-269. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11596-016-1578-7>>

YATES, S. A.; DEMPSTER, N. M.; MURPHY, M. F.; MOORE, S. A. Quantitative analysis of malondialdehyde-guanine adducts in genomic DNA samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/rcm.7843>>. 2017.

YOUNAN, G.J.; HEIT, Y.I.; DASTOURI, P, et al. Mast cells are required in the proliferation and remodeling phases of microdeformational wound therapy. **Plast Reconstr Surg**, v. 128, p. 649-658. 2011.