



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

LIVIANE MARIA ALVES RABELO

**EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DO CAULE DE *Cassia fistula*
Linn. (CHUVA-DE-OURO) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM
CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2022

LIVIANE MARIA ALVES RABELO

EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DO CAULE DE *Cassia fistula Linn.*
(CHUVA-DE-OURO) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM
CAMUNDONGOS

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Orientador(a): Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

Co-orientador(a): Dra. Tamiris de Fátima Goebel de Souza

Fortaleza

2022

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)

R114e Rabelo, Liviane Maria Alves.

Efeito do extrato hidroalcoólico do caule de Cassia fistula linn. (chuva-de-ouro) sobre o processo de cicatrização em camundongos / Liviane Maria Alves Rabelo. – 2022.

60 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Nylane Maria Nunes de Alencar.

Coorientação: Prof. Dr. Tamiris de Fátima Goebel de Souza.

1. lesões excisionais. 2. fitoterapia. 3. reepitelização. I. Título.

CDD 615

LIVIANE MARIA ALVES RABELO

EFEITO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DO CAULE DE *Cassia fistula Linn.*
(CHUVA-DE-OURO) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM
CAMUNDONGOS

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Msc. Gisele de Fátima Pinheiro Rangel
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Msc. Bianca Moreira Kurita
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*A Jesus Cristo, para que a honra e glória sejam dadas à Ele;
À minha família, por fazer tudo valer a pena.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por enviar Seu Filho Cristo Jesus e dar significado a minha vida que, além do Seu amor incondicional e imerecido, me abençoou e me sustentou na realização deste sonho.

À minha irmã Viviane, por ser o maior exemplo de determinação e força, por ter me direcionado a escolher o curso de farmácia e me apoiado em todos os momentos.

Aos meus pais, Ana Lúcia e Cleber Rabelo, pelo dom da vida e amor incondicional, pelos incentivos e por acreditarem e confiarem na minha formação.

À minha avó Iolanda, que sempre me apoiou, me incentivou e contribuiu para a minha educação durante toda a minha vida.

À minha madrinha Maria (*in memoriam*), que me criou e me deu seu amor, atenção e carinho. Sou eternamente grata por tudo o que fez por mim.

Aos meus irmãos, Ana Patrícia (*in memoriam*), Cleilson, Viviane, Cleber e Clarice, pelo afeto e carinho.

A todos os meus familiares que contribuíram, de alguma forma, para a minha formação, em especial meus tios Romero e Roberto (*in memoriam*).

À minha amiga-irmã Emanuely Ximenes e sua família, por tantos anos de amizade e apoio, que são fundamentais para minha caminhada.

À Nira e sua família, por todo carinho e atenção, me apoiando e acolhendo em seu lar sempre que necessário, sendo essencial para a elaboração deste trabalho.

À Igreja Batista de Montese, em especial à juventude Jubam, por todo apoio, conselhos e momentos felizes. Louvo a Deus pela vida de cada um.

À minha orientadora Profa. Nylane Alencar, na qual tenho imenso orgulho de ser uma das suas alunas, por toda a sua dedicação e oportunidades para evoluir como estudante. Obrigada por abrir as portas para mim, me acolher em um dos momentos mais difíceis da minha vida e me dar confiança e motivação. Tenho profunda admiração pela sua caminhada, força e determinação não apenas para fazer ciência, mas para lutar pelo que é justo.

À minha coorientadora Dra. Tamiris Souza, por me apresentar o mundo da ciência e suas possibilidades, por toda a atenção e esmero ao ensinar protocolos e estratégias dos experimentos durante o meu período de iniciação científica. Sou grata por todo o conhecimento compartilhado sobre ciência e também sobre a vida.

À Dra. Taiana Pierdoná, que iniciou as pesquisas com a *Cassia fistula* em nosso laboratório e implantou a cultura de células. Obrigada por toda contribuição científica e pela

oportunidade de realizar este trabalho. Sinto-me honrada por ter feito parte dos experimentos e por ter aprendido tanto com sua excelência, dedicação e humildade, que, com certeza, impactaram positivamente minha caminhada.

Às pós-graduandas da família LFB, Gisele Rangel, Marília Oliveira, Bianca Kurita Kayanny Ferreira, Luana Carmo, Fernanda Soares e Rachel Meneses por toda a atenção, conhecimentos compartilhados, apoio e carinho durante essa jornada.

Aos queridos técnicos de laboratório Patrícia Sousa e Manuel Monteiro, pela atenção e disposição para ajudar durante os experimentos.

Ao veterinário Wesley Lyeverton, por todo apoio na execução dos experimentos com os animais e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos meus amigos de iniciação científica do nosso laboratório Rebeca Duarte, Anderson Dantas e Brenda Uchôa, por todo apoio e companheirismo.

A todos os funcionários do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM).

Ao Prof. Márcio Ramos, que abriu as portas do Laboratório de Plantas Laticíferas, me apresentou o mundo da ciência e suas possibilidades e me indicou para a orientação da profa. Nylane. Agradeço também aos seus pós graduandos Sandro, Mauro e Daniel pelas instruções e dicas durante esse período.

Ao meu quinteto da faculdade Carol Viana, Ellen Gomes, Thalia Lourenço e Genuína Stephanie, por todos os momentos que enfrentamos juntas, pela força, companheirismo e amizade.

Ao meu grupo das cotadas Lucas Oliveira, Danilo Maciel, Carolina Cruz, Lana Andrade, Ana Letícia, Thaís Moreira, Mariana Frota e Michelle Verde por toda a alegria e ajuda compartilhadas. Vocês foram fundamentais nesse processo.

Aos queridos amigos da UFC Ildelano Costa (*in memoriam*), Larisse Martins, Jonas França, Nayara Lima, Lara Cecília, Adriano Evangelista, Gustavo Gomes, Marília Caminha e Jéssyca Norberto, pelos momentos de amizade e descontração compartilhados.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.
Muito obrigada!

RESUMO

Introdução: O processo cicatricial de lesões cutâneas é complexo e envolve células e mediadores químicos objetivando o reparo do tecido. Quando essas feridas se tornam crônicas, os tratamentos têm alto custo e difícil acesso. Nesse sentido, a fitoterapia é uma alternativa a ser considerada. A *Cassia Fistula* Linn (chuva-de-ouro) é uma planta distribuída na região semi-árida do Brasil e o seu caule é usado na medicina popular para o tratamento de feridas e os seus frutos são comercializados em associação com outras plantas (Tamarine®) como laxante. Estudos anteriores demonstraram o potencial cicatrizante das suas folhas e flores e esse efeito foi observado no extrato hidroalcoólico do caule (ECFC) em experimentos *in vitro*.

Objetivo: Abordar o tratamento de feridas excisionais em camundongos Swiss utilizando um creme contendo ECFC (CrECFC) nas concentrações de 12,5 e 25% p/v.

Métodos: A cicatrização foi avaliada pela mensuração taxa de contração das lesões nos dias 2, 4,7, 9 e 12 após a cirurgia, bem como pela análise histológica e dosagem de mediadores químicos nos dias 2, 7 e 12.

Resultados: CrECFC aumentou a taxa de contração das lesões a partir do 7º dia, foi capaz de estimular a formação de um novo epitélio com depósito considerável de queratina que recobriu parcialmente a úlcera e o desenvolvimento de um tecido conjuntivo remodelado. Além disso, diminuiu os níveis de TNF- α e IL-1 β após 2 dias de tratamento e no 7º dia, foi capaz de aumentar os níveis de TGF- β e VEGF em relação ao grupo tratado apenas com o veículo.

Conclusão: Diante desses resultados, sugerimos que o tratamento com CrECFC em feridas cutâneas de animais acelerou a cicatrização e é capaz de impulsionar a realização de estudos clínicos futuros.

Palavras-chave: lesões excisionais; fitoterapia; reepitelização.

ABSTRACT

Introduction: The healing process of skin lesions is complex and involves cells and chemical mediators aimed at tissue repair. When these wounds become chronic, treatments are expensive and difficult to access. In this sense, phytotherapy is an alternative to be considered. Cassia Fistula Linn (golden rain) is a plant distributed in the semi-arid region of Brazil and its stem is used in folk medicine for the treatment of wounds and its fruits are marketed in association with other plants (Tamarine®) as a laxative. Previous studies demonstrated the healing potential of its leaves and flowers and this effect was observed in the hydroalcoholic stem extract (ECFC) in in vitro experiments. Objective: To approach the treatment of excisional wounds in Swiss mice using a cream containing ECFC (CrECFC) at concentrations of 12.5 and 25% w/v. Methods: Healing was evaluated by measuring the rate of lesion contraction on days 2, 4, 7, 9 and 12 after surgery, as well as by histological analysis and dosage of chemical mediators on days 2, 7 and 12. Results: CrECFC increased the rate of contraction of the lesions from the 7th day was able to stimulate the formation of a new epithelium with considerable deposits of keratin that partially covered the ulcer and the development of a remodeled connective tissue. In addition, it decreased the levels of TNF- α and IL-1 β after 2 days of treatment and on the 7th day, it was able to increase the levels of TGF- β and VEGF in relation to the group treated with the vehicle alone. Conclusion: In view of these results, we suggest that treatment with CrECFC in animal skin wounds accelerated healing and is capable of driving future clinical studies.

Keywords: excisional injuries; Phytotherapy; re-epithelialization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - As camadas da pele.....	19
Figura 2 - Fases da cicatrização de feridas cutâneas	23
Figura 3 - Flores de <i>Cassia Fistula</i> Linn.....	30
Figura 4 - Procedimento para a indução de feridas excisionais	29
Figura 5 - Fotografia dos grupos Veículo e CrECFC 12,5 no 2º, 4º, 7º, 9º e 12º dias.	42
Figura 6 - Representação histológica das feridas excisionais após 7 e 12 dias de tratamento com CrECFC	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito de CrECFC sobre a contração de feridas excisionais em camundongos....	41
Gráfico 2 - Níveis de TNF- α após 2 dias de tratamento com CrECFC 12,5 e 25%.....	45
Gráfico 3 - Níveis de IL-1 β após 2 dias de tratamento com CrECFC 12,5 e 25%.....	45
Gráfico 4 - Níveis de IL-10 após 2 dias de tratamento com CrECFC 12,5 e 25%.....	46
Gráfico 5 - Níveis de TGF- β após 2 dias de tratamento com CrECFC 12,5 e 25%	46
Gráfico 6 - Níveis de VEGF após 2 dias de tratamento com CrECFC 12,5 e 25%	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações taxonômicas da <i>Cássia fistula</i> Linn.....	31
Tabela 2 - Parâmetros histológicos para análise da lesão por H&E	39
Tabela 3 - Parâmetros histológicos para análise da evolução da cicatrização por H&E	39
Tabela 4 - Escores histológicos da análise da lesão por H&E.....	43
Tabela 5 - Escores histológicos da análise da evolução da cicatrização por H&E.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFC	Caule de <i>Cassia fistula</i>
ECFC	Extrato hidroalcóolico do caule de <i>Cassia fistula</i>
CrECFC	Creme do extrato padronizado das flores de <i>Cassia fistula</i>
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
Abs	Absorbância
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazólio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
HaCaT	Linhagem de queratinótipos humanos
L929	Linhagem de fibroblastos murinos
RAW 264.7	Linhagem de macrófagos murinos
SRB	Sulfurodamina B
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
H&E	Hematolxilina e eosina
IFN- γ	Interferon gama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
i.p.	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeo S
MEC	Matriz extracelular
NF κ B	Fator nuclear kappa B
RENISUS	Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa

“Você quase sempre consegue desfrutar das coisas se decide com firmeza que isso vai acontecer” – Anne With An E

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1	A pele	19
3.2	Lesões cutâneas	21
3.3	O processo cicatricial em lesões cutâneas	23
3.4	Os tipos de cicatrização	26
3.5	Tratamentos disponíveis para a cicatrização de feridas	27
3.6	Bioprospecção de medicamentos cicatrizantes	27
3.7	<i>Cassia fistula</i> Linn.....	28
3.8	Modelos experimentais para cicatrização de feridas cutâneas	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	Tipo de estudo e delineamento experimental	35
4.2	Material vegetal	35
4.3	Animais	36
4.4	Procedimento cirúrgico de indução de feridas excisionais.....	37
4.5	Grupos experimentais.....	37
4.6	Parâmetros avaliados	38
5	RESULTADOS.....	41
5.1	O tratamento tópico com CrECFC reduziu a área das lesões excisionais	41
5.2	Efeito de CrECFC na remodelação de feridas excisionais em camundongos	42
5.3	Modulação da liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-10, TGF- β e VEGF em feridas excisionais em camundongos após tratamento com CrECFC	45
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICES	60

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e é responsável pela proteção contra agentes externos, prevenção contra a desidratação e regulação da temperatura. Por revestir toda a superfície do corpo, a pele fica naturalmente exposta a diversos agentes agressores que podem causar uma ruptura na sua continuidade e alterar sua estrutura anatômica e/ou sua função fisiológica (LIMA, 2010). Por contribuir diretamente para a homeostase do organismo, a restituição do tecido deve ocorrer em tempo hábil (DENIZ, et al., 2020).

Assim, quando ocorre uma lesão, imediatamente o organismo se prepara para a cicatrização por meio de um processo complexo que abrange quatro fases clássicas, sobrepostas e contínuas que são: hemostasia, inflamação, proliferação celular e remodelação tecidual. Essa dinâmica contempla a ativação e interação de muitos tipos de células, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que têm como objetivo a restituição do tecido cutâneo e dependerá do grau de comprometimento da pele. Dessa fase, a transição da inflamação para a regeneração tecidual pode ser uma das etapas mais críticas (LANDÉN; STÅHLE; GONZALEZ et al., 2016).

As feridas podem ser classificadas em agudas ou crônicas de acordo com seu tamanho, profundidade e localização. (LEE; HANSEN, 2009). As lesões agudas destroem a integridade do tecido, mas fecham espontaneamente, seguindo uma progressão ordenada, cumprindo um tempo de 4 a 6 semanas (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017). Já as feridas crônicas atingem tecidos mais profundos e têm o processo de cicatrização mais lento, demandando mais de 12 semanas devido a um estado de inflamação prolongada, que resulta em uma incapacidade cicatricial (HAN; CEILLEY, 2017).

As feridas crônicas causam muitos transtornos ao paciente, que, somado à dor e ao incômodo que compromete as suas atividades diárias, abre porta de entrada para infecções, podendo gerar uma piora no quadro clínico do acometido. Ressalta-se também que esta condição produz altos índices de morbidades e danos psicossociais, gerando altos gastos com a saúde, pois demanda profissionais e materiais constantemente. O impacto psíquico, social e econômico da cronificação de lesões impulsiona a busca por novas opções terapêuticas eficazes (MENKE, 2007; SMRKOLJ, 2009).

Atualmente, há um arsenal de produtos farmacêuticos sintetizados para a cicatrização de feridas. No entanto, as opções disponíveis têm um custo elevado, além da dificuldade ao acesso, não atendendo a demanda real que necessita desses produtos. Com isso, muitos

pacientes ficam sem o tratamento adequado para sua condição e seu quadro clínico pode ser agravado. Diante dessa problemática, a fitoterapia vem como uma proposta considerável e interessante por ser de baixo custo e fácil obtenção (LEMOS, 2008).

A base da investigação de ativos medicinais iniciou desde os primórdios, quando o homem utilizou produtos naturais como recurso para a cura dos seus males e injúrias e as plantas eram utilizadas para a cicatrização de feridas na forma de cataplasmas, com o intuito de estancar hemorragias e favorecer o processo cicatricial (PIRIZ, 2014). O conhecimento popular sobre plantas medicinais impulsionou a análise da eficácia curativa dos materiais botânicos utilizados e a investigação de novos compostos com potencial farmacológico e, nesse contexto, é crescente a pesquisa por extratos ou moléculas purificadas oriundas de produtos naturais que possam ser utilizadas como fitoterápicos ou fitofármacos.

A *Cassia fistula L.* é uma planta comumente encontrada em regiões tropicais, inclusive no Nordeste do Brasil e é utilizada na medicina popular como laxante e doenças de pele, como a hanseníase. O extrato padronizado dos seus frutos é comercializado no Brasil em associação com outras espécies como medicamento fitoterápico (Tamarine®) por sua atividade laxativa. Em estudos anteriores, evidenciou-se que o extrato das folhas apresentou atividade antimicrobiana e foi capaz de acelerar a cicatrização de feridas cutâneas. Já o extrato das flores apresentou atividade antioxidante, cicatrizante, antimicrobiana e aumentou a capacidade da produção de colágeno (KUMAR, et al., 2006; MARTINS, 2019; GUPTA et al., 2000).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou anteriormente que o extrato hidroalcoólico do caule de *Cassia fistula* (ECFC) reduziu os danos causados pelo estresse oxidativo em fibroblastos murinos L929 e diminuiu a produção de NO, IL-1 β e TGF- β em macrófagos RAW 264.7 (Costa, 2019). Além disso, apresentou efeito antioxidante pelo método do DPPH e indutor da proliferação e atividade indutora da migração de queratinócitos humanos HaCaT em modelo de cicatrização *in vitro*, que pode ser explicada pela diminuição da expressão de E-caderina (DUARTE, 2021).

Diante desses achados, os testes em animais são imprescindíveis para evidenciar o potencial cicatrizante do ECFC e são fundamentais para o seguimento de ensaios clínicos em seres humanos. Propõe-se, portanto, utilizar o modelo de feridas excisionais, que consiste na remoção cirúrgica da epiderme e derme cutâneas, para assim, ser possível avaliar a complexidade ambiente da lesão, analisando todas as fases da cicatrização e observando uma variedade de células e mediadores químicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico do caule de *Cassia fistula* (ECFC) sobre a cicatrização de lesões cutâneas experimentais utilizando camundongos Swiss fêmeas.

2.2 Objetivos específicos

- Elaborar um creme contendo ECFC;
- Avaliar macroscopicamente o efeito do Creme de ECFC (CrECFC) em feridas excisionais em camundongos;
- Avaliar a contração da ferida no 2º, 4º, 7º, 9º e 12º dias pós lesão;
- Mensurar os mediadores inflamatórios nos 2º, 7º e 12º dias da cicatrização do tecido;
- Avaliar os parâmetros histológicos: queratinização, angiogênese, hiperemia, infiltrado inflamatório, presença de fibroblastos e reepitelização em feridas excisionais em camundongos.

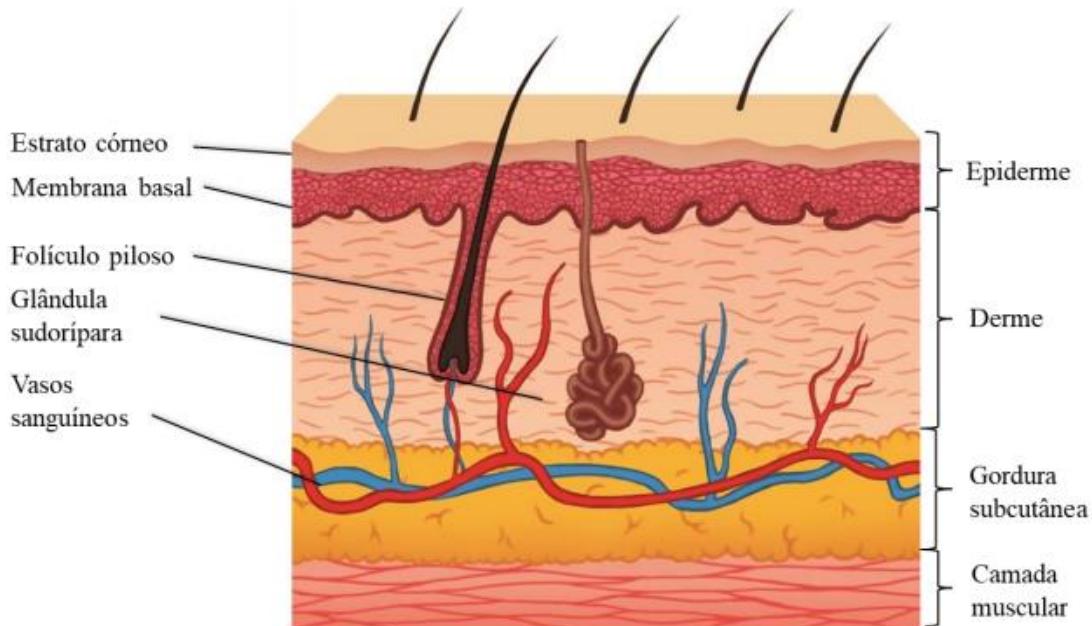
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, possuindo cerca de 1,85 m² de área de superfície, o que corresponde a cerca de 15% do peso corporal (DENIZ, et al., 2020). Situa-se na interface entre o corpo e o meio ambiente, cumprindo, principalmente, um papel de barreira física e atuando contra agentes químicos, físicos e biológicos. Além disso, está envolvida em funções sensoriais como o toque, mudanças de temperatura, pressão, dor e detecção de danos teciduais (BRAGAZZI et al., 2019; KOLARSICK; GOODWIN, 2011).

A pele também é essencial para a troca de fluidos, sais, gases, calor e colabora com o eixo neuro-imuno-endócrino, com seus variados tipos celulares presentes nas diversas camadas que a compõem, formando redes complexas de comunicação multicelular, contribuindo, dessa forma, com a homeostase do organismo (NEJATI; KOVACIC; SLOMINSKI, 2013). É estruturada em três camadas principais, sendo essas: epiderme, derme e hipoderme (Souza, 2019).

Figura 1 - As camadas da pele



Fonte: SOUZA, 2019.

3.1.1 Epiderme

A epiderme é a camada mais externa da pele e está subdividida em porção basal, espinhosa, granulosa e córnea e, na região da palma dos pés e das mãos, além das quatro subdivisões citadas, há o extrato *lucidum*, localizado especificamente entre a camada granular e a camada cornificada. Além disso, a epiderme possui um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, composto por 95% de células do tipo queratinócitos, dispostas nas diferentes subdivisões, atuando como barreira física e produzindo queratina, uma proteína fibrosa filamentosa que dá firmeza, proteção e permeabilidade à pele (BERNARDO, *et al.*, 2019; JIANG Y, *et al.*, 2020).

Além dos queratinócitos, há outras células especializadas, como os melanócitos, que são responsáveis pela produção de melanina, um pigmento envolvido na fotoproteção da pele e células imunológicas, como as células de Langerhans, um tipo de célula dendrítica responsável pelo reconhecimento e apresentação de agentes estranhos a outras células especializadas do sistema imune, e os Linfócitos T, principalmente do tipo TCD8+, presentes no estrato basal e espinhoso, atuando como primeira linha de defesa contra agentes microbianos invasores por meio de mecanismos citotóxicos (NESTLE, *et al.*, 2009).

Na subcamada seguinte, a granulosa, os queratinócitos apresentam-se de forma achatada e sintetizam queratina e lipídeos (BERNARDO, *et al.*, 2019). À medida que vão se proliferando e alcançando as camadas mais externas, vão perdendo a oferta de nutrientes da derme e se tornando células mais diferenciadas e menos viáveis.

Há, então, a perda do núcleo e formação da subcamada mais externa, a córnea e esta será composta por corneócitos, que são células ricas em proteínas reticuladas imersas em uma matriz lipídica, contendo colesterol, ácidos graxos e ceramidas. Essa barreira hidrofóbica impede a perda de água por evaporação, bem como previne a entrada de inconvenientes, como patógenos ou artefactos exógenos. Por ser constantemente impactada pelo ambiente externo, a renovação da epiderme é um processo contínuo ao longo da vida, levando, em média, 48 dias (NJUYEN, SOULIKA, 2019; LIN; ZHONG; SANTIAGO, 2018).

3.1.2 Derme

A camada subsequente à epiderme é a derme. Geralmente, possui uma espessura de 2 mm e é composta por um tecido conjuntivo vascular, compreendendo vasos sanguíneos,

capilares que fornecem a nutrição da epiderme, vasos linfáticos, terminações nervosas, anexos da pele, como ductos sudoríparos, glândulas sebáceas alveolares e músculos ligados aos folículos pilosos. Além disso, possui fibras de colágeno e elastina, sendo responsável pela maior parte da resistência mecânica da pele (SOUZA, 2019).

A derme é subdividida em papilar e a reticular e não há delimitação definida entre as subcamadas. A derme papilar é a camada mais superficial, possuindo aproximadamente 300-400 µm de espessura. Essa porção contém papilas com estruturas microvasculares e neurais que se projetam até a epiderme, promovendo a entrega de nutrientes (SHIRSHIN, et al., 2017; WONG, et al., 2016).

A derme reticular, por sua vez, é mais espessa quando comparada à anterior devido à densa concentração de fibras colágenas e fibras reticulares entrelaçadas, abrangendo os apêndices cutâneos. Contemplando as duas camadas, há fibroblastos, que são as células estruturais da derme e sua principal função é secretar componentes da matriz extracelular, como colágeno, fibras elásticas e proteoglicanos (NJUYEN, SOULIKA, 2019; CHAMBERS; VUKMANOVIC-STEJIC, 2020). Além desses também há células imunológicas como macrófagos, linfócitos e mastócitos.

3.1.3 *Hipoderme*

A hipoderme é a última camada da pele, situada logo abaixo da derme. É também conhecida como camada subcutânea. As células predominantes são os adipócitos, mas também são encontradas células mantenedoras, como fibroblastos e macrófagos, imersos em um tecido conjuntivo frouxo rico em proteoglicanos e glicosaminoglicanos. É, portanto, um reservatório de gordura e fonte de energia para o organismo, que além de promover a retenção de líquidos no local, previne a perda de calor e protege os órgãos internos (EDWARDS, 2005). Essa camada também auxilia na ligação da pele ao músculo esquelético e se espessa quando o indivíduo ganha peso (TSAKOVSKA, et al., 2017; WONG, et al., 2016; CHAMBERS; VUKMANOVIC-STEJIC, 2020).

3.2 Lesões cutâneas

Lesões ou feridas cutâneas são descritas como qualquer distúrbio na estrutura normal da pele que pode causar ruptura na continuidade do tecido cutâneo-mucoso, alterando sua estrutura anatômica ou fisiológica. A classificação clínica dessa condição leva em consideração

o tempo de cicatrização, portanto, elas são divididas em feridas agudas e crônicas. O processo de tratamento é semelhante em ambos os tipos de lesões (HAN; CEILLEY, 2017).

3.2.1 Lesões cutâneas agudas

As feridas agudas são consideradas quando há a perda da integridade do tecido, mas a restauração é espontânea, seguindo uma progressão oportuna e ordenada, durando entre 4 e 6 semanas (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017). Elas podem ser causadas por lesões traumáticas, abrasões, queimaduras ou podem ser consequência de procedimentos cirúrgicos, mudanças extremas de temperatura, contato com produtos químicos, exposição à radiação ou infecção. Normalmente, a extensão da lesão pode influenciar diretamente no tempo de cicatrização.

Com isso, as lesões agudas também podem ser classificadas de acordo com seu tamanho, profundidade e localização (LEE; HANSEN, 2009). As lesões superficiais, como pequenos cortes ou abrasões cicatrizam rapidamente e não causam prejuízos significativos ao acometido. No entanto, quando há a perda da integridade da pele atingindo camadas mais profundas, como a derme papilar, há a formação de úlcera, podendo resultar em desabilidades ou até mesmo óbito (CLARK et al., 2007).

3.2.2 Lesões cutâneas crônicas

As feridas crônicas, ao contrário das agudas, requerem um tempo de cicatrização retardado a mais de 12 semanas. Isso ocorre devido a um estado de inflamação prolongado, que pode estar associado a irregularidades na inflamação, grande extensão da ferida, exposição a infecções, ou presença de fatores agravantes, como idade, diabetes, doença vascular e câncer associados ou não, afetando negativamente o processo de reparo de feridas, que resulta em uma incapacidade cicatricial.

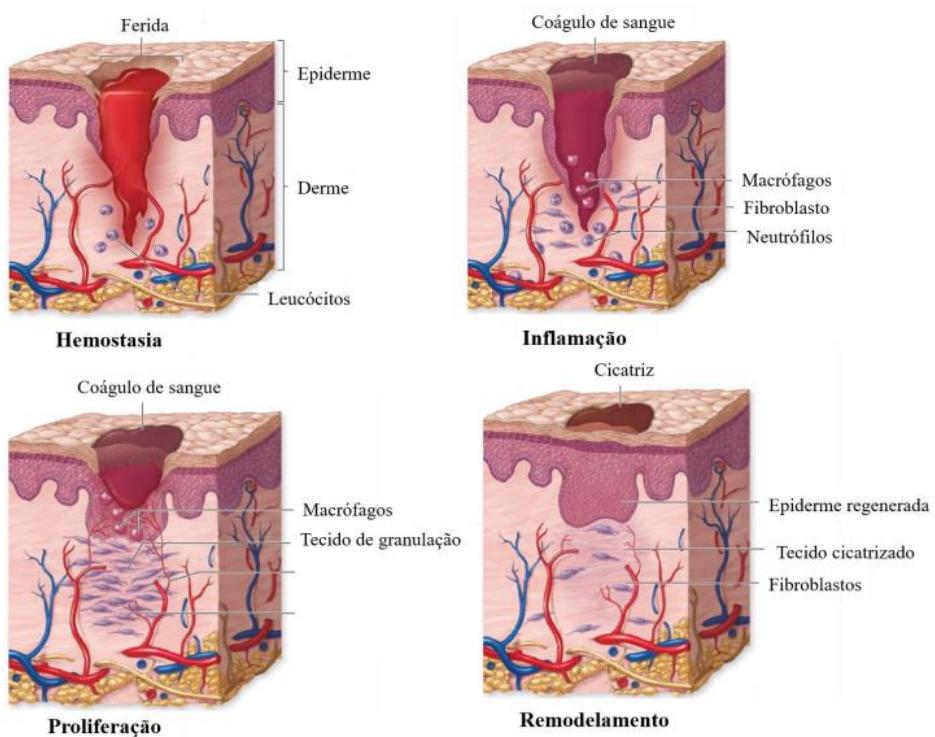
Alguns tipos de feridas que tem uma cicatrização complexa e lenta são as úlceras de pernas ou pé, isquêmicas, venosas, arteriais, úlceras diabéticas e úlceras de pressão. Além disso, pode haver ainda a formação de cicatrizes hipertróficas, conhecidas como quelóides. Os mecanismos subjacentes à formação de cicatrizes em lesões crônicas ainda são pouco compreendidos, e faltam opções de tratamentos eficazes para essas situações (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2016). É valido acrescentar que, conforme essas feridas

cronificam, os pacientes tendem a viver com a reincidência destas, e casos mais graves podem levar à morte.

3.3 O processo cicatricial em lesões cutâneas

A cicatrização de feridas da pele consiste em um processo dinâmico complexo que ocorre imediatamente após a lesão e há a interação de muitos tipos de células, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. (GONZALEZ et al., 2016). A reconstituição do tecido cutâneo pode ser desenvolvida pelo mecanismo de regeneração ou reparação. A regeneração é a reconstituição do tecido perdido por outro morfológicamente idêntico. Já a reparação é a substituição das células lesionadas por um tecido fibrótico vascularizado, formando uma cicatriz (TAKEO; LEE; ITO, 2015). O processo normal de cicatrização feridas ocorre em quatro fases clássicas, sobrepostas e contínuas, que são: hemostasia, inflamação, proliferação celular e remodelação tecidual (figura 2).

Figura 2 - Fases da cicatrização de feridas cutâneas



Fonte: Adaptado de PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2005.

3.3.1 A fase de hemostasia

Imediatamente após a lesão inicial, começa a fase de hemostasia para sanar o sangramento por meio da formação de um tampão hemostático ou coágulo. Isso ocorre por meio da vasoconstricção dos vasos, estimulados pela norepinefrina e serotonina, bem como da ativação da cascata plaquetária e do complemento, formando um coágulo hemostático composto principalmente de fibrina, fibronectina, vitronectina, trombospondina, eritrócitos e plaquetas.

Com a desgranulação das plaquetas, bem como os subprodutos da proteólise da fibrina e outros componentes da matriz, sinais quimiotáticos são liberados e há o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da ferida, dando início a fase inflamatória (BERGMEIER; HYNES, 2012; WANG; CARRIM; NI, 2015).

3.3.2 A fase inflamatória

Na fase inflamatória, as células do sistema imune removem os detritos celulares, limpam o fluxo inicial de bactérias contaminantes e liberam citocinas pró-inflamatórias que dão início às cascadas de sinalização que ativam os fibroblastos e queratinócitos locais a começarem o processo de reparo tecidual. (SU; RICHMOND, 2015). Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem no local da lesão. Eles realizam a limpeza inicial e produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) que são essenciais para prevenir infecções (IBRAHIM et al., 2018).

Logo em seguida, os macrófagos se acumulam no ambiente inflamado e permanecem vários dias, atuando na digestão de microrganismos sobreviventes, remoção de neutrófilos mortos e debris celulares, degradação do tampão de fibrina e liberação de óxido nítrico (NO) (DELAVARY, B.M. et al., 2011). Eles também secretam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento endotelial (EGF), TGF- β , PDGF e VEGF. Os fatores de crescimento impulsionam a proliferação de fibroblastos e queratinócitos na fase proliferativa. Dessa forma, os macrófagos são células-chave para estruturar a transição da inflamação para a proliferação celular (KOH; DIPIETRO, 2011b; RODRIGUES et al., 2018).

3.3.3 A fase proliferativa

Durante a fase proliferativa, os fibroblastos que migraram para o local se diferenciam em miofibroblastos, que são especializados na produção de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e colágeno para compor o tecido de granulação. O colágeno é essencial nesta etapa, pois ele proporciona força e integridade ao tecido neoformado, de modo que, se for depositado de forma escassa, a cicatriz se torna frágil e a ferida pode reabrir (SIEMIONOW; EISENMANN-KLEIN, 2010).

Com isso, os queratinócitos se proliferam intensamente, se diferenciam e se estratificam em camadas, recompondo a barreira epitelial (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; KONDO; ISHIDA, 2010), enquanto os miofibroblastos se contraem para diminuir o tamanho da ferida. As células endoteliais estão multiplicando simultaneamente ao longo de todas as fases da cicatrização, a fim de revascularizar o tecido lesado, fornecer o suprimento sanguíneo apropriado e reforçar o tecido que sofreu a injúria. Há, portanto, uma intensa atividade celular para a formação de uma nova matriz que sustente o tecido recém formado (GONZALEZ et al., 2016; SINNO; PRAKASH, 2013).

3.3.4 A fase de remodelamento

A fase de remodelação tem o objetivo de estruturar o novo epitélio e formar o tecido cicatricial e pode durar até dois anos após a lesão. Nesta fase, a matriz extracelular começa a amadurecer e os feixes de colágeno aumentam de diâmetro e dão resistência à ferida. Além da deposição de colágeno, há a organização das fibras colágenas, levando ao aumento da contração que havia começado na fase inflamatória (GONZALEZ et al., 2016). O amadurecimento da ferida induz a apoptose dos fibroblastos e macrófagos, diminuindo sua densidade no local da cicatriz.

Com o tempo, o crescimento dos capilares cessa, o fluxo sanguíneo e a atividade metabólica no local da ferida diminui. O resultado final é uma cicatriz completamente madura com um número reduzido de células, diminuição dos vasos sanguíneos e alta resistência à tração (STRONG; NEUMEISTER; LEVI, 2017). Um processo cicatricial ideal envolveria uma rápida hemostasia, inflamação adequada, proliferação, diferenciação e migração de células, angiogênese, reepitelização e remodelamento tecidual.

Porém, prolongamentos e interrupções nos eventos fundamentais de cada fase podem atrasar ou ocasionar feridas crônicas que não cicatrizam (GUO; DIPIETRO, 2010). Estes podem advir de inúmeras fisiopatologias, como edema, isquemia, hipóxia tecidual, infecção, necrose e desequilíbrios dos fatores de crescimento, bem como outros fatores, incluindo doenças metabólicas pré-existentes e estado nutricional. Esses fatores agem alterando o ambiente de reparo da ferida, desde o atraso no influxo de células inflamatórias e migração de fibroblastos, deposição de colágeno e estabelecimento da matriz extracelular. (VELNAR, et al., 2009).

3.4 Os tipos de cicatrização

3.4.1 Cicatrização por primeira intenção

A cicatrização por primeira intenção é o processo considerado para feridas sem perda de tecido e não infectadas, semelhantes a incisões cirúrgicas, cuja as bordas são aproximadas por suturas (LABLER et al., ATTINGER et al., 2006; GREENHALGH, 1998). Dessa forma, o exemplo menos complicado de reparação de feridas, com uma perda limitada de células epiteliais e do tecido conjuntivo, preservando todo o arcabouço tecidual, incluindo matriz extracelular, células produtoras de colágeno e fatores de crescimento. Quando há união imediata das bordas da ferida e manutenção asséptica, a cicatriz evolui em 4 a 10 dias de forma linear (VELNAR et al., 2009).

3.4.2 Cicatrização por segunda intenção

A cicatrização por segunda intenção ocorre quando há a perda de todas as camadas da pele, incluindo a epiderme, derme e camada subcutânea e suas bordas não são suturadas. Esse processo se contrasta marcadamente com o que ocorre com as incisões, pois neste caso, o objetivo é preencher a extensa perda tecidual (LABLER et al., 2006). O processo de reparo é, portanto, mais complexo, podendo durar dias a meses e é marcado pela produção de densas quantidades de tecido de granulação. Nesse caso, essa camada granulada é muito importante para agir como uma barreira a infecções, oferecendo uma base para a migração de queratinócitos e reformulação do epitélio. Além disso, essa camada é responsável pela fibroplasia, que é a deposição de colágeno, promovendo, assim a contração da ferida, por meio de movimentos centrípetos da pele ao redor da lesão (VELNAR et al., 2009).

3.5 Tratamentos disponíveis para a cicatrização de feridas

Os curativos tradicionais são feitos utilizando ataduras, algodões e gazes. O objetivo é absorver o exsudato das feridas e mantê-las secas como forma de prevenir a invasão de bactérias no local da ferida. No entanto, pesquisas realizadas nas últimas décadas demonstraram que, na verdade, é um ambiente úmido que favorece o processo de cicatrização. Ainda assim, somente o curativo não é suficiente para intensificar o processo de cicatrização e a combinação de curativos depende do tipo da ferida a ser tratada (BOATENG, 2008).

O mercado farmacêutico atual oferece inúmeros produtos para a cicatrização de feridas e representa, atualmente, uma indústria multibilionária em todo o mundo. Há a venda e o desenvolvimento de curativos de diferentes tipos de materiais e objetivos específicos de tratamento que dependem do tipo de ferida (MURRAY et al., 2019). Com o objetivo de estimular uma resposta celular local, há vários produtos inovadores, como hidrogéis, espumas, hidrocolóides (carboximetilcelulose), alginato, colágeno, celulose, algodão e filmes para tratar feridas e queimaduras. Porém, esses produtos são em geral de alto custo e, portanto, indisponíveis para a maioria das pessoas que precisam desses recursos.

3.6 Bioprospecção de medicamentos cicatrizantes

Atualmente, o foco das pesquisas na área de cicatrização é a busca por novas substâncias com potencial cicatrizante e o desenvolvimento de curativos e formas farmacêuticas menos dispendiosas de igual ou superior eficiência para aumentar a acessibilidade e atender a real demanda por esses recursos. Somado a isso, é importante que esses produtos sejam biocompatíveis e biodegradáveis para fornecerem condições ideais para a cicatrização de feridas e melhorarem a qualidade de vida dos pacientes acometidos (MOURA et al., 2013).

O Brasil detém em torno de 15 a 20% da biodiversidade total do mundo dividida em seis biomas: Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Pampa. São cerca de 60.000 espécies de vegetais catalogadas, no entanto, apenas 1.100 foram avaliadas e determinadas suas propriedades medicinais e 8% estão sendo estudadas para a pesquisa de compostos bioativos (SIMÕES, 2003; BRASIL, 2011).

As descobertas científicas e avanços tecnológicos envolvendo ativos vegetais vêm se intensificando nos últimos anos. A maioria origina-se de estudos etnofarmacológicos, que consideram o conhecimento tradicional que foi passado entre as gerações. Esse saber

impulsionou o desenvolvimento de protótipos de fármacos convencionais e medicamentos fitoterápicos (VIANA, 2009). A continuidade dessas pesquisas envolve testes para a comprovação da segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos produzidos a partir de plantas medicinais, bem como a pesquisa por novos ativos com propriedades medicinais.

Muitas plantas medicinais têm ganhado destaque na cicatrização de feridas, como: *Aesculus hippocastanum* (Castanha-da-Índia), *Anacardium occidentale* (Cajueiro), *Arctium lappa* (Bardana), *Calendula officinalis* (Calêndula), *Casaelpinia férrea* (Pau-ferro), *Casearia sylvestris* (Guaçatonga), entre outras nativa da região Nordeste, como a Aloe Vera (Babosa) e o *Symphytum officinale* (Confrei), que estão dentre as plantas que compõem a lista proposta pela RENISUS (BRASIL, 2010; BUENO et al., 2016).

Desde a pré-história, as plantas com potencial cicatrizante eram utilizadas na forma de emplastos naturais que tinham o objetivo de estancar hemorragias e favorecer a cicatrização. Muitas dessas plantas eram também ingeridas, para ter o seu efeito sistêmico (PIRIZ et al, 2014). Os medicamentos fitoterápicos usados no tratamento de feridas têm como principais objetivos a desinfecção, o desbridamento e até mesmo o fornecimento de um ambiente úmido que estimule os processos de cicatrização natural (KARADI et al., 2009). Somando-se a isso, esses ativos vegetais ganham ainda mais relevância por serem facilmente metabolizados no organismo e eliminados sem grandes dificuldades.

3.7 Modelos experimentais para cicatrização de feridas cutâneas

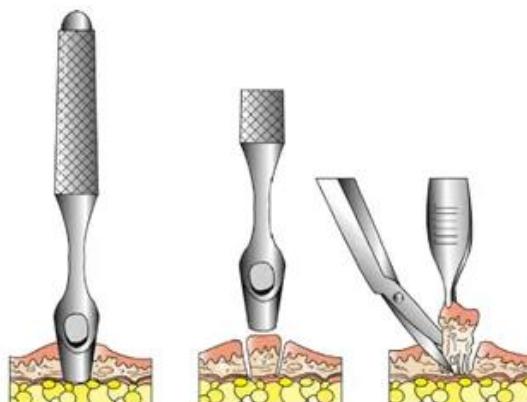
Os modelos experimentais de cicatrização são essenciais para a investigação de novas moléculas promissoras para o tratamento de feridas e obrigatórios para o seguimento dos estudos clínicos. Esses protocolos oferecem o ambiente da lesão em toda a sua complexidade, integrando uma variedade de células e oferecendo a possibilidade de analisar todas as fases de reparo, incluindo inflamação, proliferação, reepitelização e remodelação.

Atualmente, existe uma variedade de modelos pré-clínicos padronizados possíveis utilizando coelhos, porcos, ratos e camundongos. As técnicas podem abranger queimaduras, feridas excisionais, incisionais, além da possibilidade de explorar lesões agudas ou crônicas, e associadas a algum fator agravante como feridas diabéticas e infeccionadas (MASSON-MEYERS, et al., 2020).

3.7.1 Feridas excisionais

As feridas excisionais são geradas pela remoção cirúrgica das primeiras camadas da pele: epiderme e derme. As bordas da pele não são suturadas, dessa forma, requerem cicatrização por segunda intenção. O material e as técnicas necessárias para usar este modelo são relativamente simples e práticos. É possível utilizar um punch cirúrgico, que é um objeto na forma de cilindro, que possui uma superfície cortante que, no momento da biópsia, é girado de modo a aprofundar-se na pele, removendo o tecido, podendo chegar até à derme, como ilustrado na figura 4. O tamanho e a quantidade das lesões obtidas podem variar de acordo com o tipo de lesão e animal escolhido.

Figura 3 - Procedimento para a indução de feridas excisionais



Fonte: Vail & Withrow, 2007.

Com esse modelo, o leito da ferida pode ser facilmente acessível para aplicação de formas farmacêuticas tópicas como cremes ou pomadas, células, biomateriais e curativos e, dessa forma, investigar seu efeito cicatrizante (VELNAR et al., 2009).

Este método é ideal para a investigação da dinâmica da cicatrização, pois permite avaliar a hemorragia, inflamação, área da lesão, formação de tecido de granulação, reepitelização, angiogênese e remodelação tecidual. Também é possível registrar fotografias regularmente ao longo do tempo e acompanhar o fechamento da ferida. A área das feridas pode ser mensurada regularmente com o auxílio de um paquímetro digital, e o cálculo pode ser realizado através da seguinte equação: $A = \pi \cdot R \cdot r$ onde “A” representa a área, “R” o raio maior e “r” o raio menor da ferida (PRATA et al., 1988). Com isso, pode ser obtido a taxa de contração da lesão utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de contração (\%)} = (\text{área inicial} - \text{área dia } X) \div (\text{área inicial}) \times 100$$

Para análise histológica, os animais são anestesiados e eutanasiados e as biópsias das feridas podem ser coletadas nas diferentes fases da cicatrização para o processamento e análise da evolução epitelial, características do leito de granulação, recrutamento de células, vascularização, alterações da matriz e organização do colágeno (GOTTRUP F, et. al; 2000).

Nesse modelo também é possível induzir duas ou mais feridas em vez de uma única, ampliando a oferta de material para mais análises ou permitindo que cada animal seja seu próprio controle. No entanto, é preciso se atentar pois essa prática pode gerar variáveis de confusão em relação aos efeitos sistêmicos do tratamento ou contaminação cruzada de feridas com compostos de teste (MASSON-MEYERS, et al., 2020).

3.8 *Cassia fistula* Linn.

3.8.1 Informações botânicas

A *Cassia fistula* Linn é conhecida popularmente como cassia-imperial, canafistula e chuva-de-ouro. É considerada uma árvore de médio porte, podendo atingir de 8 a 15 metros de altura. Esta espécie é muito apreciada pela beleza de suas flores, que têm coloração amarela e permanecem nos períodos de setembro à dezembro. É uma planta que cresce à sombra e desenvolve-se em baixa quantidade de suplemento e solo raso (SANTOS; TEIXEIRA, 2001) (Figura 3).

Figura 4 - Flores de *Cassia Fistula* Linn



Fonte: Martins, 2019.

Sementes e meios vegetativos são seus dois métodos de germinação (SIDDIQUA et al., 2018). A cor da casca de uma árvore jovem é cinza-esverdeada e torna-se marrom escura após a maturação. As folhas consistem em folíolos que emparelham 2-5 cm de comprimento e contêm cerca de 3-8 duetos de babados reversos. As suas flores são de cor amarelo dourado e formam cachos de comprimento de 40 cm. Cada parte desta planta é reconhecida por suas propriedades medicinais (SANORIA, 2020). A sua classificação taxonômica está apresentada na tabela a seguir:

Tabela 1 - Informações taxonômicas da *Cássia fistula* Linn

Reino	<i>Plantae</i>
Subdivisão	<i>Spermatophyta</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Subclasse	<i>Rosidae</i>
Ordem	<i>Fabales</i>
Família	<i>Fabaceae</i>
Gênero	<i>Cassia</i>
Espécie	<i>fistula</i>

Fonte: Rahmani, 2015.

O gênero Cassia (*Leguminosae*) é constituído por mais de 600 espécies incluindo arbustos, árvores e ervas. É nativa da Índia, Sri Lanka e distribuída em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, incluindo a região semi-árida do Brasil (AGARKAR; JADGE, 1999).

3.8.2 Uso popular

A *Cassia fistula* Linn é amplamente utilizada na medicina popular como laxante e para tratar doenças de pele. A polpa do fruto vem sendo usada como laxante e purgante (ROCAS, 2002; ORWA et al., 2009) e os ativos extraídos das folhas apresentaram atividade antirreumática e o seu suco é popularmente utilizado em feridas cutâneas (BHAKTA, 1999). A decocção da casca do caule é utilizada no tratamento da hanseníase, principalmente para a lavagem das feridas na pele.

Na medicina tradicional persa, a planta é utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias e relacionadas ao pênfigo vulgar, uma condição autoimune rara, na qual a pele e o revestimento das mucosas são recobertos de bolhas de diversos tamanhos (ATARZADEH et al., 2017; MOZAFFARPUR et al., 2012).

3.8.3 Caracterização química

A caracterização química das mais variadas partes da planta é essencial para avaliar a eficácia da sua utilização por meio dos seus constituintes distribuídos. As raízes contêm glicerídeos como ácidos linoleico, oleico, esteárico e palmítico e traços de ácidos caprílico e mirístico (ABU, et al., 1999). A casca do caule contém lupeol, β -sitosterol e hexacosanol (SEN AB, 1968), compostos antraquinônicos já foram encontrados nos galhos e compostos fenólicos e flavonoides no caule (SIDDHURAJU; MOHAN; BECKER, 2002; ZHOU, et al., 2017; ZHAO, Y et al. 2016). Em extratos do caule obtidos pelos métodos de percolação e soxhlet, foi identificado a presença de alcalóides, flavonóides, taninos e antraquinonas (SILVA, 2018).

A vagem contém glicosídeo de reína e ácido ferúlico, álcool cerílico, antraquinona e tanino (CHOPRA RN et al., 2006; LEE ET AL., 2001). As folhas contêm heptacosanil-5-hidroxipentadec-2-enoato, octacosan-5 e 8-diol (SINGH RS et al., 2005). O extrato perclórico das folhas apresentou um alto teor de fenóis totais (KHAN, 2013). As flores contêm kaempferol, tetrâmero de leucopelargonidina, reína, fistulina e triterpeno (KUMAR, 1966). A análise fitoquímica do extrato das flores de *Cassia fistula*, demonstrou a presença de diversos metabólitos secundários como: flavonóides, ácidos fixos fortes, chalconas, auronas e quinonas (MENEZES, 2009).

3.8.4 Propriedades farmacológicas

Um estudo realizado com o extrato metanólico das folhas de *C. fistula* demonstrou efeito cicatrizante em feridas excisionais e incisionais de uma pomada produzida a partir do extrato foliar de duas concentrações 5% e 10% p/p, sendo significativamente eficaz em ambos os modelos de feridas testadas quando comparadas ao fármaco padrão, nitrofurazona (BHAKTA, 1998).

Também foi apresentado efeito antioxidante na casca do caule, folhas e flores, e poupa de *C. fistula*, sendo a maior atividade observada na casca do caule, que possui uma maior quantidade de constituintes fenólicos (SIDDHURAJU; MOHAN; BECKER, 2002). O efeito antioxidante dos extratos aquoso e metanólico da casca de *C. fistula* também foi observado por meio da inibição da peroxidação lipídica iniciada por CCl₄ e FeSO₄ em homogenatos de fígado e rins de ratos wistar, bem como no método do DPPH, e ao reduzir níveis de NO e radical hidroxila em métodos *in vitro* (ILAVARASAN; MALLIKA; VENKATARAMAN, 2005).

Foi demonstrado que extratos e frações do caule, folhas e flores de *C. fistula* possuem atividade antibacteriana significativa contra bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes*, e bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (DURAIPANDIYAN, 2007). Pesquisadores demonstraram que o extrato das folhas de *C. fistula* apresenta efeito antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e melhor capacidade de regeneração tecidual e fechamento de feridas infectadas, também demonstrada por parâmetros histopatológicos (KUMAR, 2006).

No Brasil o extrato padronizado dos frutos de *C. fistula* é comercializado como medicamento fitoterápico (Tamarine®) em associação com outras espécies por suas propriedades laxativas. O teor de ácido trans-cinâmico é utilizado como marcador químico para garantir a qualidade e eficácia terapêutica do referido medicamento (SOARES, 2008).

O extrato hexânico da casca do caule também mostrou atividade hipoglicêmica em ratos diabéticos e o extrato metanólico da casca do caule apresentou atividade antiinflamatória contra inflamação induzida por carragenina e também alta atividade antioxidante, quando comparado com os extratos das flores, folhas e frutos (KAINSA, KUMAR, RANI, 2012).

Estudos demonstraram que a alta atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do pó da polpa da fruta de *C. fistula*, provavelmente se deve ao seu alto teor de compostos fenólicos e flavonóides (RAJAGOPAL et al., 2013). Além disso, os flavonóides presentes no extrato da polpa dos frutos de *C. fistula* demonstraram efeito anti-inflamatório ao regular a atividade das espécies reativas de oxigênio (ANITHA; MIRUTHULA, 2014).

Segundo Martins (2019), o extrato etanólico das flores (ECFF) apresentou atividade antioxidante pelo método do DPPH, bem como reduziu o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em fibroblastos L929. Em macrófagos RAW 264.7 foi capaz de reduzir os níveis de nitrito, modular a liberação de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-10 e do fator de crescimento TGF- β após ativação com LPS. Além disso, apresentou atividade cicatrizante em modelo de feridas excisionais em camundongos.

Costa (2020) demonstrou que o extrato hidroalcólico do caule (ECFC), na concentração de 100-400 μ g/mL apresentou atividade de inibição do radical DPPH em torno de 88,5 % e 91,71 %, evidenciando sua atividade antioxidante comparada à vitamina E (87,3%). Outro estudo avaliou o extrato metanólico desta parte também exibiu atividade antioxidante por pelo mesmo método (ILAVARASAN; MALLIKA; VENKATARAMAN, 2005). Na literatura

também é possível observar o potencial antioxidante nas folhas (THABIT et al., 2018), frutos e sementes (IRSHAD et al., 2012).

ECFC (100-400 µg/mL) incubado por 24h sobre fibroblastos murinos L929, foi capaz de diminuir a produção de NO, IL-1 β e TGF- β em macrófagos, apresentando dessa forma atividade antioxidante e antiinflamatória (COSTA, 2020). Supõe-se, portanto, que a terapia antioxidante utilizando o ECFC contribua significativamente para o processo de reparo de feridas cutâneas relacionadas ao estresse oxidativo (KANT et al., 2014).

Além disso, foi observado um efeito proliferativo e indutor da migração celular de ECFC (100-400 µg/mL) incubado por 24h, 48 e 72h em células HaCaT no modelo de *scracht*, um ensaio de migração celular com o agente antimitótico Mitomicina C, sendo estes efeitos atribuídos à diminuição da expressão da molécula de adesão E-caderina na superfície das células e aumento da expressão gênica de β -catenina e p63, que estão envolvidas na resposta de migração, proliferação e diferenciação celular na cicatrização (DUARTE, 2021).

Costa (2020) demonstrou que ECFC (50 – 200µg/mL) não apresentou citotoxicidade após 24h de incubação em macrófagos RAW 264.7 ativados ou não por LPS pelo método SRB e apresentou um efeito protetor após 24h de incubação nas doses 100-400 µg/mL em fibroblastos murinos L929 estressados por H₂O₂ pelo método de SRB. Duarte (2021), demonstrou que o ECFC (25-400 µg/mL) não apresentou citotoxicidade em nenhuma concentração testada no ensaio do SRB nos tempos de 24, 48 e 72 h em queratinocitos humanos HaCaT (DUARTE, 2021). O resultado foi semelhante utilizando o extrato etanólico das flores de *C. fistula* (25-100µg/mL) com as mesmas linhagens celulares (MARTINS, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo e delineamento experimental

O estudo é do tipo experimental, longitudinal e prospectivo. Ocorreu durante o período de agosto de 2020 a junho de 2021. Primeiramente, uma pesquisa bibliográfica foi realizada e foram levantados artigos que deram base aos experimentos e interpretações do estudo. Depois disso, foi discutido e proposto a elaboração de um creme contendo ECFC (CrECFC) que foi usada nos ensaios de cicatrização e comparada com o grupo controle (Veículo) em diferentes tempos de análise. Todos os protocolos foram elaborados de acordo com os padrões éticos estabelecidos nos Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), analisados e aprovados sob o nº 1378050520 (Apêndice A), pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC). Após a finalização dos experimentos, as amostras foram preparadas para a avaliação histológica e dosagem de mediadores da inflamação. Os dados foram interpretados levando em consideração testes estatísticos determinados e os resultados foram utilizados para a elaboração deste trabalho e resumos para congressos.

4.2 Material vegetal

4.2.1 Obtenção do material vegetal

A planta *Cassia fistula* Linn. (Fabaceae) foi coletada no Ceará, na cidade de Fortaleza ($3^{\circ}43'34.0"S$, $38^{\circ}32'25.5"W$, -3.726097, -38.540420) entre setembro e dezembro do ano de 2016 pela manhã. O material botânico foi colhido pela Dra. Taiana Magalhães Pierdoná Martins e uma exsicata sob o número 58434 foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, na Universidade Federal do Ceará. A amostra foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o código ADF9219.

4.2.2 Preparo e secagem do caule de *Cassia fistula* Linn.

Para o preparo da droga vegetal, o caule da planta foi primeiramente submetida à secagem em estufa sob uma temperatura de 37 °C nos tempos variáveis de 12, 24, 48 e 72h. Durante esses momentos, foram analisados os teores de umidade, sendo considerado ideal entre 8-14%. Após a secagem, o material vegetal foi triturado e seguiu para o processo de extração.

A seleção da condição ideal de preparo da droga vegetal teve como base a 6^a Edição da Farmacopeia Brasileira (2020).

4.2.3 Preparo do extrato hidroalcóolico do caule de *Cassia fistula* Linn (ECFC).

A extração foi feita pelo método de percolação, que é um método a frio e foi preferido por apresentar menos riscos de reações químicas e de formação de artefatos durante a produção do extrato. Além disso, esse método, quando comparado à extração por Soxhlet, possui um maior teor de fenóis e flavonoides totais, como demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa (SILVA, 2018). Dessa forma, foi pesado uma amostra de 25 g de droga vegetal e umedecida com solução hidroalcóolica a 70% em um percolador. Essa mistura foi submetida à maceração por 7 dias, seguida de percolação por arraste do líquido extrator por meio do gotejamento de 120 gotas/min (BRASIL, 2020). Após o preparo, a amostra foi armazenada à temperatura ambiente em frasco de vidro âmbar.

4.2.4 Produção do creme contendo extrato do caule de *Cassia fistula* (CrECFC)

Os cremes utilizados no estudo foram confeccionados na farmácia de manipulação DrogavET, situada em Fortaleza-CE. A formulação foi estabelecida previamente considerando as características do princípio ativo, que é origem proteica e hidrofilica, e das lesões cutâneas abertas, que possuem maior necessidade de oclusão, sendo definida a forma farmacêutica creme A/O (característica lipofílica) nas concentrações de 12,5 e 25%. Também foi produzido o controle negativo com o veículo, sendo somente o creme à base de lanolina anidra, sem a adição de ativos, para utilização nos protocolos experimentais. As bisnagas foram armazenadas em geladeira e permaneceram lacradas até a realização dos tratamentos.

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem Swiss ($22\text{g} \pm 30\text{g}$) adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (Biocen - UFC). Os animais disponibilizados ($n=6/\text{caixa}$) para experimentação permaneceram na sala de manutenção por sete dias para aclimatação, em estante ventilada com exaustão e entrada de ar controlados. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em caixas limpas individuais ($n=1$ animal/caixa) de polipropileno, com maravalha limpa, sendo trocada uma vez por semana, na sala de manutenção do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

(NPDM). Os animais foram mantidos em ciclo de 12h claro/escuro, com temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$) controlados e com fornecimento *ad libitum* de ração e água.

4.4 Procedimento cirúrgico de indução de feridas excisionais

Os experimentos foram realizados no biotério do NPDM, em salas de cirurgia adequadas para esses procedimentos. Os animais foram anestesiados com a associação de cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a anestesia, foi feita a limpeza inicial com aseptol® e em seguida, foi feita a tricotomia na região dorsal abrangendo uma área de aproximadamente 4 cm x 2 cm, seguida de assepsia com iodopovidona 1% seguido de álcool etílico 70%. Foi demarcada uma ferida excisional circular com área de 1cm² na superfície dorsal dos animais com auxílio de um *punch* cirúrgico para a retirada da pele, atingindo a região dermo-epidérmica. Ao final do procedimento cirúrgico, os animais receberam por via subcutânea (s.c.) 1 mL de solução salina estéril 0,9% para reposição fluídica e foram mantidos em ambiente aquecido até a completa recuperação da anestesia (CARDOSO et al., 2007). Neste protocolo não houve sutura para que a cicatrização ocorresse por segunda intenção.

4.5 Grupos experimentais

Após a indução cirúrgica da lesão excisional, os animais foram dispostos individualmente em gaiolas, distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais (N= 10 animais/ grupo) para o tratamento. Os grupos foram

I. Grupo CrECFC 12,5%: Animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos de tratamento com o Creme contendo o extrato do caule de *C. fistula* a 12,5% p/v;

II. Grupo CrECFC 25%: Animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos de tratamento com o Creme contendo o extrato do caule de *C. fistula* a 25,0% p/v;

III. Grupo Veículo: animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos de tratamento com o veículo, que é o creme à base de lanolina anidra, sem a incorporação do ativo;

As lesões foram previamente limpas com solução fisiológica 0,9% para remoção de possíveis resíduos, seguida da aplicação tópica dos cremes, uma única vez ao dia, por 12 dias, com auxílio de cotonetes descartáveis sobre a fáscia muscular exposta no dorso do animal,

preenchendo o local da lesão de forma oclusiva (1cm^2). Por ser um tratamento tópico, os animais não precisaram de sedação para a realização do tratamento.

4.6 Parâmetros avaliados

4.6.1 Análise da área das feridas excisionais

A área das feridas excisionais foi mensurada nos dias 1, 2, 4, 7, 9 e 12º após a cirurgia com o auxílio de um paquímetro digital, e o cálculo foi realizado através da seguinte equação: $A = \pi.R.r$ onde “A” representa a área, “R” o raio maior e “r” o raio menor da ferida (PRATA et al., 1988). A taxa de contração da lesão foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de contração (\%)} = (\text{área inicial} - \text{área dia X}) \div (\text{área inicial}) \times 100$$

4.6.2 Coleta das amostras

As amostras para a análise histológica e quantificação de mediadores químicos envolvidos na cicatrização foram coletadas nos dias 2º, 7º e 12º dia após a indução da lesão. Os animais de cada grupo ($n=5/\text{dia/grupo}$) foram submetidos a eutanásia por superdosagem anestésica de cloridrato de xilazina (30 mg/kg, i.p.) e cloridrato de cetamina (300 mg/kg, i.p.). As lesões cutâneas dorsais foram removidas, cuidadosamente, contornando as margens do local atingido e contemplando um centímetro de pele saudável, atingindo até a camada muscular.

4.6.3 Processamento e análise histológica

As amostras de tecido foram coletadas no 2º, 7º e 12º dias e fixadas em solução tamponada de formaldeído 10% (v/v) (pH 7,4), substituída por álcool etílico 70% após 24h e seguidas para o processamento histológico de inclusão em parafina a 58°C no processador automático de tecidos (Lupe®). Segmentos de 4 µm de espessura dos fragmentos foram elaborados em micrótomo semi-automático (Leica®) e organizados em lâminas microscópicas. Logo em seguida, estas foram aplicadas às técnicas de coloração: hematoxilina-eosina (H&E) para a análise da presença ou não de úlcera, descrição do infiltrado leucocitário, presença de necrose e tecido de granulação (AVSAR et al., 2016) no Laboratório de Histopatologia do NEMPI, UFC sob coordenação da profa. Dr(a) Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

No 2º e 7º dias foram analisados parâmetros relacionados à formação da lesão, a citar área e profundidade da úlcera, infiltrado inflamatório e queratinização, descritos na tabela 2. A evolução da cicatrização foi analisada considerando o 7º e 12º dia. Foi avaliada a presença de fibroblastos, inflamação local, angiogênese, hiperemia, reepitelização e queratinização, conforme tabela 2. Fotomicrografias também foram tiradas na ampliação original × 100 para a representação histológica de amostras dos grupos experimentais.

Tabela 2 - Parâmetros histológicos para análise da lesão por H&E

Escores	Parâmetros
0	Sem úlcera, epitélio e derme em espessuras normais ou restauradas, ausência de infiltrado inflamatório e queratinização.
1	Áreas pontuais de úlcera, derme presente e discreto infiltrado inflamatório na derme e hipoderme.
2	Áreas moderada de úlcera, perda parcial da derme, e moderado infiltrado inflamatório na derme e hipoderme.
3	Áreas extensa de úlcera, perda total da derme, e presença de infiltrado inflamatório na hipoderme.

Fonte: Adaptado de AVSAR et al., 2016

Tabela 3 - Parâmetros histológicos para análise da evolução da cicatrização por H&E

Parâmetro	Escores
Adelgaçamento do Epitélio	
Adelgaçamento da Derme	
Presença de infiltrado inflamatório na derme	
Presença de infiltrado inflamatório na hipoderme	+ - parâmetros leves ++ - parâmetros moderados +++ - parâmetros intensos
Hiperemia	
Presença de fibroblastos na derme	
Reepitelização	
Queratinização	

Fonte: Adaptado de AVSAR et al., 2016

4.6.4 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento

As amostras das lesões excisionais foram coletadas no 2º dia para dosagem de TNF- α , IL-1 β , IL-10 e no 7º dia para TGF- β e VEGF (JANG et al., 2013). Os tecidos (n=5/grupo) foram triturados e homogeneizados 10% (mg tecido/ μ L) em temperatura de 4°C (POLYTRON®) em solução de PBS (pH 7,4), centrifugados a 5000 rpm por 15 min para remoção de resíduos que não foram triturados completamente. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e o método de detecção foi o ELISA sanduíche, que mensura a quantidade de analito previamente ligado a um anticorpo de captura, cuja amplificação do sinal advém de um anticorpo de detecção conjugado a uma enzima, lidos em um espectofotômetro utilizando o comprimento de onda de 450 nm (kits da R&D systems). Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de homogenato, sendo a concentração das amostras obtidas a partir de uma curva padrão de cada citocina com 8 concentrações diferentes, partindo de uma diluição seriada, sendo as concentrações iniciais de 1000 pg/mL para IL-1 β e 2000 pg/mL para TNF- α , IL-10, TGF- β e VEGF. Em decorrência da etapa extra de ativação de TGF- β , as absorbâncias foram multiplicadas pelo fator de correção 1,4 após a interpolação de dados.

4.6.5 Análise estatística

O programa GraphPad Prism (v. 8.) foi utilizado para a execução dos testes estatísticos e expressão dos resultados, sendo empregando o teste de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal Wallis conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos. Quando utilizado ANOVA, foi aplicado o teste de comparações múltiplas (teste de Bonferroni), baseando-se na continuidade das variáveis em análise e, quando utilizado Kruskal Wallis, seguiu-se o teste de Dunn. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M mediana (mínimo-máximo) para variáveis sem distribuição normal, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$. Para as análises histológicas, os resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) ou em valores de mediana, com valor mínimo e máximo agregado, de acordo com o tipo de parâmetro avaliado. Para comparações múltiplas de valores numéricos entre mais de três grupos, foi utilizado o teste de ANOVA, seguido de Tukey. As medianas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Walls e Dunn's. Os resultados que representaram diferença estatística foram considerados quando $p<0,05$.

5 RESULTADOS

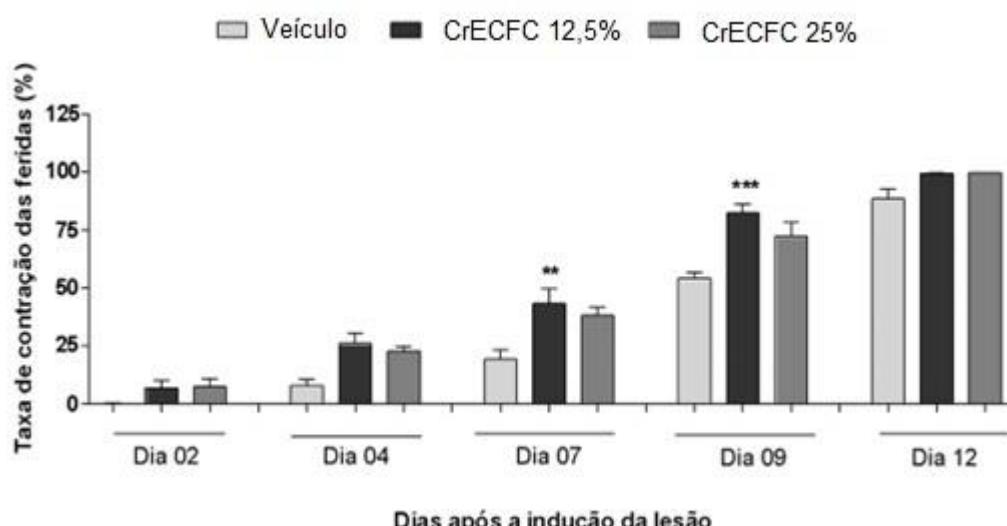
5.1 O tratamento tópico com CrECFC reduziu a área das lesões excisionais

A contração das lesões induzidas foi mensurada com paquímetro digital após 2, 4, 7, 9 e 12 dias de tratamento com CrECFC ou veículo (controle) com o intuito de acompanhar a evolução da cicatrização (Gráfico 1). Foram tiradas fotografias no mesmo período, sendo uma ferida por grupo experimental ilustrada de forma representativa (Figura 5).

No 2º dia de tratamento, os grupos CrECFC 25% ($7,55 \pm 3,53\%$) e CrECFC 12,5% ($6,99 \pm 3,31\%$) demonstraram aumento no percentual de contração da lesão quando comparado ao grupo veículo ($0,18 \pm 0,18\%$), no entanto esse resultado não foi estatisticamente diferente. Após o 4º dia de tratamento, ambos os grupos tratados com CrECFC (12,5 e 25%) apresentaram aumento na contração das feridas induzidas ($26,05 \pm 4,66\%$ e $22,73 \pm 2,08\%$, respectivamente), porém, esse resultado também não foi estatisticamente diferente que o veículo ($7,76 \pm 2,88\%$).

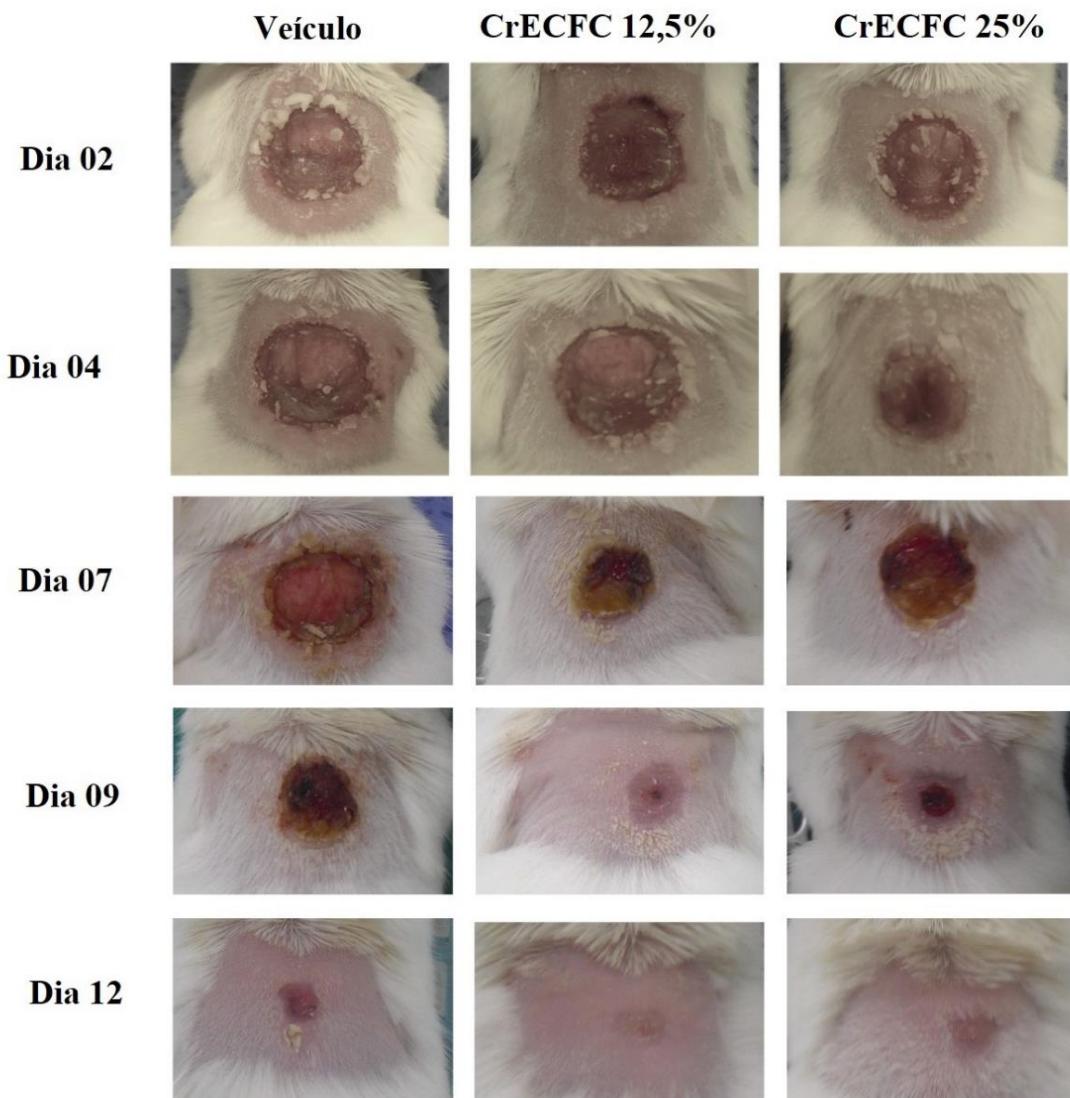
Após sete dias de tratamento, o efeito produzido pelo CrECFC 12,5% ($43,36 \pm 6,42\%$) e CrECFC 25% ($38,16 \pm 3,54\%$) foi o aumento significativo ($p < 0,05$) da contração das lesões em relação ao grupo veículo ($19,34 \pm 4,03\%$). Este efeito também foi observado após o 9º dia de tratamento com CrECFC 12,5% ($82,33 \pm 3,83\%$) e CrECFC 25% ($72,38 \pm 6,16\%$) em relação ao grupo veículo ($54,13 \pm 2,29\%$). E no 12º dia de análise, os resultados do CrECFC 12,5% ($99,44 \pm 0,31\%$) e CrECFC 25% ($99,53 \pm 0,27\%$), permaneceram superiores que o grupo veículo ($88,74 \pm 3,98\%$).

Gráfico 1 - Efeito de CrECFC sobre a contração de feridas excisionais em camundongos



O percentual de contração das feridas foi avaliado após o 2º, 4º, 7º, 9º e 12º dia de indução das lesões. Os animais foram tratados com aplicação única diária de CrECFC nas concentrações de 12,5% e 25% ou creme com veículo base sem nenhuma adição de substância ativa. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ representam diferença significativa em comparação ao grupo veículo ($n=10$ animais/grupo).

Figura 5 - Fotografia dos grupos Veículo e CrECFC 12,5 no 2º, 4º, 7º, 9º e 12º dias.



Fonte: Elaborado pelo grupo de pesquisa.

5.2 Efeito de CrECFC na remodelação de feridas excisionais em camundongos

A análise histológica do 2º dia demonstrou que todos os grupos experimentais se apresentavam histologicamente semelhantes, com extensa área de úlcera e presença de infiltrado inflamatório agudo, não havendo diferenças estatísticas. No 7º dia, o grupo Veículo

ainda apresentava áreas moderadas de úlcera e tecido de granulação e infiltrado inflamatório moderado. Já o grupo tratado com CrECFC 25% não apresentou infiltrado inflamatório na derme e epiderme, foi capaz de estimular a formação de um novo epitélio com depósito considerável de queratina que recobriu parcialmente a úlcera e o desenvolvimento de um tecido conjuntivo remodelado. (Tabela 4).

Tabela 4 - Escores histológicos da análise da lesão por H&E

	Veículo	CFC 12,5%	CFC 25%
2º dia	3 (3-3)	2,5 (2-3)	2,5 (2-3)
7º dia	2 (2-2)	1 (0-2)	0 (0-0)*

Os resultados foram expressos pela mediana e intervalo mínimo e máximo de escores adotados no grupo experimental. As medianas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Walls e Dunn's. *p<0,05 representa diferença significativa em comparação ao grupo veículo (n=3 animais/grupo).

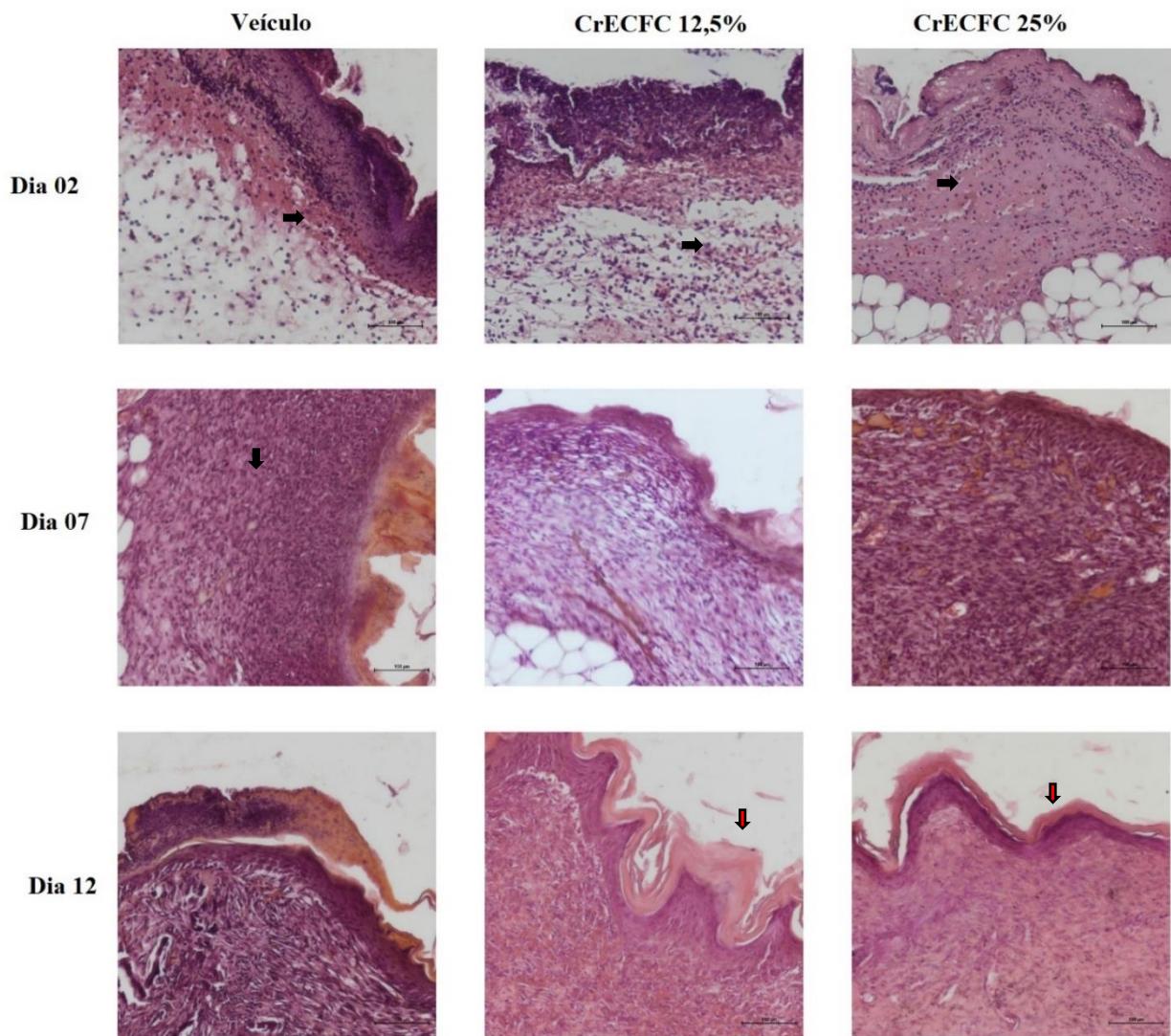
Após o 12º dia de tratamento, o grupo veículo ainda apresentava área ulcerada com presença de membrana granulocítica e processo de reepitelização incompleto, demonstrado na figura 6. Os grupos tratados com CrECFC apresentaram reepitelização completa e presença de camada córnea revestindo o epitélio (**Tabela 5** e **Figura 6**). Esses dados sugerem que o tratamento com CrECFC acelerou a cicatrização em comparação ao grupo veículo.

Tabela 5 - Escores histológicos da análise da evolução da cicatrização por H&E

		VEÍCULO	CFC 12,5%	CFC 25%
Queratinização	7º dia	+	+	++
	12º dia	+	+++*	++
Angiogênese	7º dia	++	++	++
	12º dia	++	+++*	++
Hiperemia	7º dia	++	+	+
	12º dia	+++	+	+
Infiltrado inflamatório	7º dia	+++	++	+++
	12º dia	++	++	++
Presença de fibroblastos	7º dia	++	++	+++
	12º dia	+++	+++	+++

Os resultados foram expressos pela média e intervalo mínimo e máximo de escores adotados no grupo experimental. Foi utilizado e as medianas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Walls e Dunn's. para a análise estatística dos dados. *p<0,05 representa diferença significativa em comparação ao grupo veículo (n=3 animais/grupo).

Figura 6 - Representação histológica das feridas excisionais após 7 e 12 dias de tratamento com CrECFC



Fonte: Elaborado pelo autor

Representação histológica do epitélio de camundongo com ferida excisional após 2, 7 e 12 dias de tratamento com CrECFC. Os tecidos provenientes das feridas foram retirados e fixados em paraformaldeído e corados com H&E para análises histopatológicas (ampliação original $\times 100$). As setas pretas indicam infiltrado inflamatório, presença de área ulcerada e processo de reepitelização incompleto. As setas em vermelho representam reepitelização completa e presença de camada córnea revestindo o epitélio, apresentadas nos grupos tratados com CrECFC.

5.3 Modulação da liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-10, TGF- β e VEGF em feridas excisionais em camundongos após tratamento com CrECFC

Após o 2º dia de tratamento com CrECFC na dose de 12,5 e 25%, constatamos que este foi capaz de diminuir os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α ($387,1 \pm 25,16$; $305,8 \pm 42,3$ pg/mL, respectivamente) (Gráfico 2) e IL1- β ($872,2 \pm 64,7$; $688,7 \pm 37,8$ pg/mL, respectivamente) (Gráfico 3) em relação ao grupo veículo (TNF- α : $442,2 \pm 29,1$; IL1- β : $784,8 \pm 29,5$ pg/mL), no entanto apenas a dose de 25% apresentou resultados significantes ($p < 0,05$). Além disso, o tratamento com CrECFC na dose de 12,5% e 25% ($347,3 \pm 46,60$; $229,4 \pm 48,79$ pg/mL) foi capaz de aumentar de maneira significante os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (Gráfico 4) em relação ao grupo veículo ($239,8 \pm 38,8$ pg/mL).

Gráfico 2 - Níveis de TNF- α após 2 dias de tratamento com CrECFC 12,5 e 25%

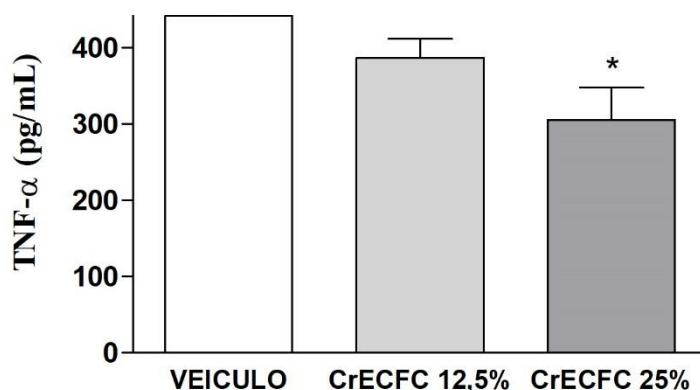


Gráfico 3 - Níveis de IL-1 β após 2 dias de tratamento com CrECFC 12,5 e 25%

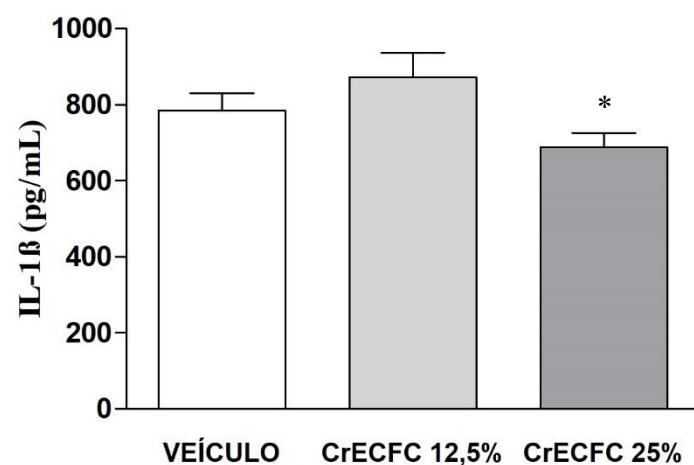
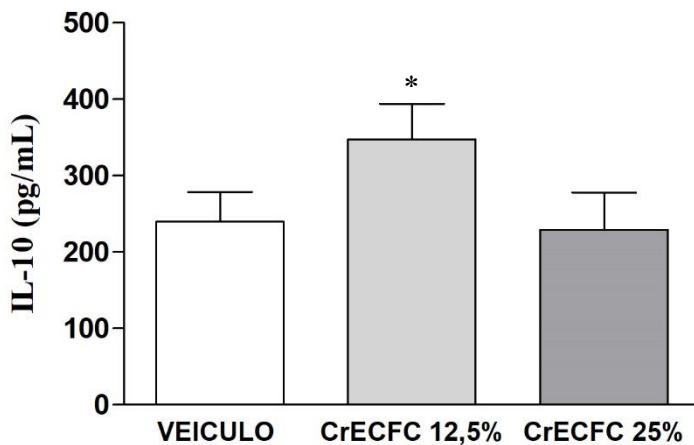


Gráfico 4 - Níveis de IL-10 após 2 dias de tratamento com CrECFC 12,5 e 25%



Os mediadores IL-1 β (Gráfico 2), TNF- α (Gráfico 3) e IL-10 (Gráfico 4) foram mensurados no homogenato de tecido produzido após coleta da lesão dos animais após 2 dias de tratamento com CrECFC 12,5 e 25%. Os resultados (picograma/mL) foram expressos pela média \pm E.P.M. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Tukey. * $p<0,05$ representa a diferença significativa em comparação ao grupo veículo ($n=5$ animais/grupo).

Após 7 dias de tratamento, CrECFC 12,5 e 25% foi capaz de aumentar os níveis do fator de crescimento TGF- β de maneira expressiva ($731,8 \pm 44,6$; $495,2 \pm 82,9$ pg/mL, respectivamente) e sendo a dose de 12,5% significante em relação ao grupo veículo ($491,7,8 \pm 60,85$ pg/mL) (Gráfico 5). E, além disso, aumentou os níveis do fator de VEGF ($1461,0 \pm 241,2$; $848,2 \pm 173,1$, respectivamente), com a concentração de 25% apresentando um resultado significativo em relação ao veículo ($1233,0 \pm 112,0$) (Gráfico 6).

Gráfico 5 - Níveis de TGF- β após 2 dias de tratamento com CrECFC 12,5 e 25%

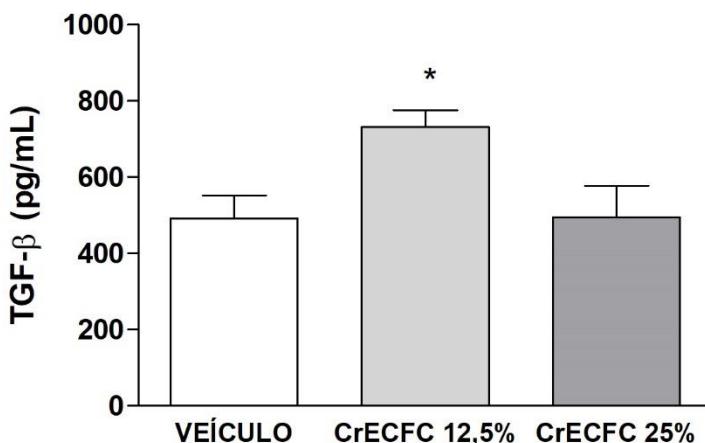
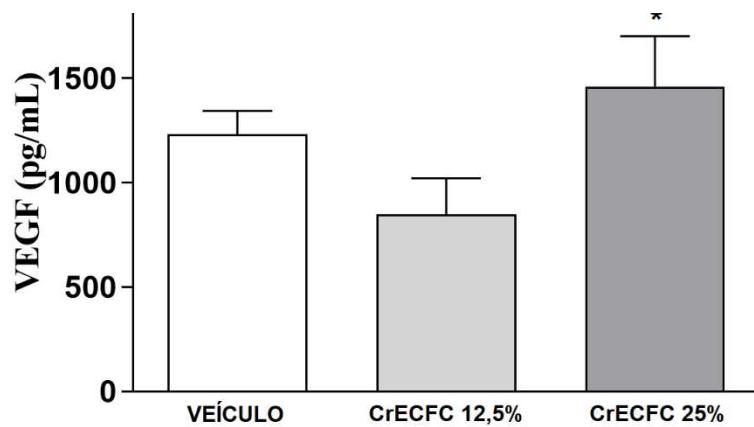


Gráfico 6 - Níveis de VEGF após 2 dias de tratamento com CrECFC 12,5 e 25%



Os mediadores TGF- β (Gráfico 5) e VEGF (Gráfico 6) foram mensurados no homogenato de tecido produzido após coleta da lesão dos animais após 7 dias de tratamento com CrECFC. Os resultados (picograma/mL) foram expressos pela média \pm E.P.M. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Tukey. * $p<0,05$ representa a diferença significativa em comparação ao grupo veículo ($n=5$ animais/grupo).

6 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou pela primeira vez resultados preliminares sobre o efeito cicatrizante do extrato hidroalcóolico do caule de *Cassia fistula* (ECFC) em lesões cutâneas experimentais induzidas em camundongos Swiss fêmeas e soma-se a resultados promissores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa em ensaios utilizando diferentes linhagens celulares.

A caracterização fitoquímica demonstrada outros trabalhos identificaram compostos fenólicos e flavonoides, distribuídos em suas diversas partes, como do caule, frutos, flores, sementes e folhas (RAHMANI, 2015; RAJAGOPAL, et al., 2013). Ácidos fenólicos e flavonóides são agentes antioxidantes conhecidos que atuam na depleção de radicais livres presentes em vários processos patológicos no organismo (HUYUT; BEYDEMIR; GÜLCİN, 2017).

Martins (2019), revelou que o extrato etanólico das flores de *C. fistula* obtido pelo método de sohxlet contém flavonoides, alcalóides, taninos e antraquinonas com um teor de fenóis totais em torno de $128,00 \pm 0,14$ mg EGA/g, pelo ensaio espectrofotométrico utilizando reagente de Folin. O extrato perclórico das folhas também apresentou um alto teor de fenóis totais (64,39 mg EAG/g) (KHAN, 2013).

Em extratos do caule obtidos pelos métodos de percolação e soxhlet por Silva (2018), foram identificados a presença de alcalóides, flavonóides, taninos e antraquinonas nos dois extratos, além de quantificado o teor de fenóis e flavonóides totais, sendo 20,67 mg EAG/g e 399,6 mg EQ/g, respectivamente. Com isso, as classes químicas citadas acima apresentam potencial antioxidante e contribuem para o processo cicatricial, especialmente nas lesões de difícil cicatrização em decorrência do estresse oxidativo tecidual (KANT et al., 2014; PINNELL, 2003).

Neste estudo, mostramos que o creme contendo o extrato padronizado do caule de *C. fistula* (CrECFC) promoveu o aumento da taxa de contração das feridas e reepitelização em camundongos Swiss. As feridas tiveram um aumento significativo da taxa de contração a partir do 7º dia de tratamento com CrECFC 12,5 e 25% em relação ao grupo veículo.

No 12º dia, as lesões tratadas com CrECFC 12,5% e 25% estavam quase totalmente fechadas, apresentando um resultado mais rápido em relação grupo veículo. Resultado semelhante foi obtido por Martins (2019), em que o creme contendo extrato etanólico das flores (12,5 e 25%) foi capaz de aumentar a taxa de contração das lesões e reepitelização utilizando o

mesmo modelo experimental deste trabalho. Outra publicação também demonstrou o efeito da pomada produzida a partir do extrato metanólico das folhas de *C. fistula* (5% e 10% p/p) quanto à sua propriedade de cicatrização de feridas excisionais e incisionais (BHAKTA et al., 1998).

Somando-se a isso, Duarte (2021), apresentou um efeito positivo significativo após 24h de incubação de ECFC 100 µg/mL sobre proliferação e migração de queratinócitos humanos HaCaT pelo método de Scratch usando o agente antimitótico mitomicina C. De modo semelhante, a dose de 200 µg/mL também diminuiu a área do arranhão após 72 h de tratamento. O extrato etanólico das flores de *C. fistula* também foi capaz de aumentar a taxa de migração de células HaCaT em todas as concentrações testadas a partir de 48 h de tratamento, além de também apresentar alta taxa de fechamento do arranhão (MARTINS, 2019).

Apesar dos resultados demonstrados in vitro em queratinócitos, os protocolos experimentais em animais são imprescindíveis para o estudo da fisiopatologia da cicatrização e são obrigatórios para o seguimento de ensaios clínicos em seres humanos. Já foram desenvolvidos muitos modelos de ferida excisional, incisional, isquemia, feridas infectadas, úlcera aberta entre outros (GRADA; MERVIS; FALANGA, 2019; HAMBLIN, 2018).

A análise histológica realizada com coloração H&E demonstrou que a partir do 7º dia, os grupos tratados com CrECFC 25% já apresentaram epitélio recobrindo a úlcera, com o desenvolvimento de um tecido conjuntivo remodelado, ausência de infiltrado inflamatório e uma camada considerável de queratina, enquanto que o grupo veículo ainda apresentava áreas moderadas de úlcera, tecido de granulação e infiltrado inflamatório moderado. Após o 12º dia de tratamento, os grupos tratados com CFC 12,5 e 25% apresentaram reepitelização completa e presença de camada córnea revestindo o epitélio, enquanto que o grupo veículo ainda apresentava reepitelização incompleta. Dessa forma, acreditamos que o tratamento com CrECFC estimulou o reparo tecidual, bem como a reepitelização das feridas em comparação ao grupo veículo.

Filho e colaboradores (2021), demonstraram que o creme feito a base do extrato fluido das folhas dos brotos de *Myracrodruon urundeuva Allemão* (aroeira) é rico em fenóis e teve efeito cicatrizante e anti-inflamatório ao promover a reepitelização completa, com intensa presença de fibroblastos em modelo de feridas excisionais em camundongos. Coelho (2010) apresentou o efeito cicatrizante da pomada obtida do extrato aquoso da casca de *Tabebuia avellaneda* (ipê roxo), rica em taninos, quinonas e flavonoides em modelo de feridas excisionais utilizando ratos *Wistar*. Janning (2011) demonstrou que o extrato hidroalcóolico

das folhas de *Tabernaemontana catharinensis* (Jasmim), rico em flavonoides e taninos promoveu uma maior contração na ferida em ratos.

A cicatrização de feridas envolve citocinas, enzimas e fatores de crescimento que modulam cascatas de eventos biológicos inter-relacionados em cada etapa. Durante a resposta inflamatória, células imunológicas como neutrófilos e macrófagos ativados atuam fagocitando agentes invasores e liberando citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, que auxiliam no combate aos microrganismos (KRZYSZCZYK et al., 2018). Neste trabalho, foi possível constatar que após o 2º dia de tratamento com CrECFC na dose de 12,5% houve uma diminuição significativa ($p<0,05$) dos níveis de TNF- α e IL1- β em relação ao grupo veículo em homogenato de feridas excisionais em camundongos.

Nesta etapa, a citocina IL-1 β advinda de células epiteliais e macrófagos estimula o recrutamento de neutrófilos, promove a proliferação de células epiteliais e fibroblastos, e aumenta da expressão de fator de crescimento de queratinócitos, desempenhando uma função essencial na transição entre a inflamação e a fase proliferativa. Nos estágios mais tardios da cicatrização, IL-1 β cumpre um importante papel na regulação da colagênese (ELLIS; LIN; TARTAR, 2018; SERRA et al., 2017).

A fase inflamatória é modulada pela liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e inibidores de metaloproteinases. Estas substâncias regulam o recrutamento e ativação de células inflamatórias, reduzindo a formação de EROS, NO e a liberação de citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos, atenuando os danos teciduais (KRZYSZCZYK et al., 2018; THARUKA et al., 2018). IL-10 é produzida por diversas células, entre elas por queratinócitos epidérmicos.

O tratamento com CrECFC na dose de 12,5% e 25% foi capaz de aumentar de maneira significativa os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 em relação ao grupo veículo. Esta citocina é essencial para prevenir os danos excessivos da inflamação. Sua expressão aumenta no período de 12 horas até o 7º dia após a lesão cutânea (KUBO et al., 2014). Lin e colaboradores (2017) mostram que a liberação de IL-10 parece ocorrer em resposta ao aumento do perfil pró-inflamatório.

A modulação da liberação das citocinas é essencial para a transição das fases do reparo e qualidade do tecido formado. A elevação dos níveis de TNF- α causa a diminuição da produção de tecido de granulação, enquanto a sua redução promove um melhor arranjo das fibras de colágeno. TNF- α também atua indiretamente na reepitelização, pois juntamente com a IL-1,

induz a produção do fator de crescimento de queratinócitos (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; FENG et al., 2016). Esses resultados sugerem que o tratamento com CrECFC promove uma resposta inflamatória eficiente e modulada na depleção de agentes invasores e favorece a transição das fases da cicatrização.

Esses resultados também foram observados por Martins (2019), em que uma pomada contendo o extrato etanólico das flores de *C. fistula* promoveu uma modulação na resposta inflamatória tecidual, aumentando a liberação de IL-1 β , TNF- α e IL-10 pelas células epiteliais e obteve um efeito cicatrizante excelente. Estudos realizados por Ramos e colaboradores (2016), mostraram que uma biomembrana contendo proteínas isoladas do látex de *Calotropis procera* também foi capaz de aumentar a produção de IL-1 β e TNF- α em feridas cutâneas e vem se destacando em ensaios clínicos de fase 1.

Durante a fase proliferativa, o VEGF é um dos fatores de crescimento liberado por várias de células, incluindo queratinócitos, macrófagos e fibroblastos. É produzido em resposta a lesões e atua agudamente aumentando a permeabilidade vascular, a expressão de moléculas de adesão e selectinas, recrutando células inflamatórias, como macrófagos e mastócitos, importantes em vários estágios da cicatrização. Além disso, impulsiona a proliferação de fibroblastos e queratinócitos na fase proliferativa (SERRA et al., 2017).

No presente estudo foi observado um aumento significativo de VEGF quando mensurado no homogenato de tecido dos animais após 7 dias de tratamento com CrECFC 25% e comparado com o veículo. Durante a fase proliferativa, VEGF favorece a atividade dos queratinócitos e macrófagos que expressam receptores (VEGFRs), que passam a ter maior oferta de oxigênio e nutrientes advindo de novos vasos e com isso, beneficia o novo tecido em formação (LANDÉN; LI; STÅHLE, 2016; SERRA et al., 2017). Dessa forma, o aumento do VEGF causado pelo CrECFC melhorou o reparo tecidual do tecido lesionado.

Muitos estudos ressaltam o papel do TGF- β na cicatrização de feridas cutâneas como sendo uma citocina que controla a proliferação de queratinócitos, estimula a produção de colágeno, especialmente o tipo I em fibroblastos, promove a expressão dos principais componentes das proteínas da MEC, como fibronectina e VEGF. Além disso, o TGF- β facilita o fornecimento de sangue no local da lesão ao melhorar as propriedades angiogênicas das células endoteliais (PAKYARI et al., 2013).

Nas primeiras etapas da cicatrização, o TGF- β promove o recrutamento de células

inflamatórias para o local da lesão, que posteriormente são envolvidas em um feedback negativo via liberação de superóxido dos macrófagos. Durante o estágio intermediário, por volta do 7º dia após a lesão, induz a expressão dos principais componentes das proteínas da MEC, como fibronectina, colágeno tipos I e III e VEGF, formando o tecido de granulação (PAKYARI et al., 2013).

Além disso, o TGF-β facilita o fornecimento de sangue ao local lesionado e estimula a contração de fibroblastos, promovendo o fechamento da ferida. A migração de queratinócitos também é promovida pelo TGF-β via regulação de integrinas (PAKYARI et al., 2013). Quaglino e colaboradores (1991) mostraram que a administração de TGF-β exógeno acelera o processo de cicatrização de feridas através do aumentado de moléculas da MEC, como o colágeno tipo I e III.

Nosso estudo mostrou que o tratamento de 7 dias com CrECFC foi capaz de aumentar os níveis de TGF-β de maneira significativa em homogenato de feridas excisionais em camundongos, e diante da importância direta deste fator de crescimento para o processo de cicatrização, sugerimos que CrECFC é um potencial terapêutico para o tratamento de feridas.

É válido ressaltar que as feridas abertas apresentam um maior risco de infecção, especialmente por bactérias. Se isso ocorrer, o tempo de cicatrização é prolongado e um forte exsudato é formado em consequência da infecção (SCHMIDT et al., 2009). No presente estudo não foi observado indícios de infecção na avaliação das feridas tratadas com CrECFC nas concentrações de 12,5 e 25% p/p.

Estudos anteriores mostraram que o extrato das folhas de *Cassia fistula* apresentou efeito antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e melhor capacidade de regeneração tecidual de feridas infectadas (KUMAR et al., 2006). Diante disso, acreditamos que é interessante dar continuidade às pesquisas com o CrECFC em modelo de feridas infectadas.

A oferta atual de produtos para a cicatrização de feridas abrange numerosas opções inovadoras, como hidrogéis, espumas, hidrocoloides, filmes curativos de diferentes tipos de materiais e objetivos específicos (MURRAY et al., 2019). No entanto, ainda há dificuldades no acesso a esses produtos devido ao alto custo, tornando-os indisponíveis para as instituições menos abastadas.

Considerando a rica biodiversidade do Brasil e a grande quantidade de substâncias a serem exploradas, as pesquisas na área de cicatrização objetivam investigar novas substâncias com efeito cicatrizante, desenvolver curativos eficazes e menos custosos e realizar testes para a comprovação da segurança, eficácia e qualidade, visando ampliar o acesso e atender a real demanda por esses recursos.

Em resumo, CrECFC apresentou atividade cicatrizante em feridas excisionais em camundongos *Swiss*, por apresentar um aumento da taxa de contração das lesões, estimulação da reepitelização, modulação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou o potencial cicatrizante do ECFC em modelos de feridas excisionais em camundongos *Swiss*. Em conclusão, acreditamos que o potencial antioxidante, anti-inflamatório e cicatrizante de ECFC demonstrados pelo nosso grupo de pesquisa, incentivam o uso tradicional da espécie *Cassia fistula* e sugerem que o tratamento com CrECFC é uma abordagem interessante e considerável para a terapia de feridas cutâneas. Este trabalho também impulsiona a realização de mais estudos com ECFC, para explorar melhor os mecanismos de ação envolvidos na sua ação cicatrizante, bem como a continuidade com testes de sensibilidade cutânea e ensaios clínicos de fase 1 e 2 utilizando ECFC, para que assim possa ser disponibilizado como um medicamento fitoterápico para o tratamento de feridas.

REFERÊNCIAS

- ABU SAYEED M, ABBAS AM, MOHAL KHAN GR, RAHMAN MS. Studies on the characterization and glyceride composition of Cassia fistula seed oil. *Bangladesh J Sci Ind Res* 1999;34:144-8. 19.
- AGARKAR, S. V.; JADGE, D. R. Phytochemical and pharmacological investigations of genus Cassia: a review, *Asian J. Chem*, v. 11, p. 295-299, 1999.
- AGNIHOTRI A, SINGH V. Effect of *Tamarindus indica linn.* and *Cassia fistula linn.* stem bark extracts on oxidative stress and diabetic conditions. *Acta Pol Pharm* 2013;70:1011-9. 81.
- ARSHAD H RAHMANI. *Cassia fistula linn:* potential candidate in health management. *Pharmacogn Res* 2015;7:217-24.
- ATTINGER CE, Janis JE, Steinberg J, et al: Clinical approach to wounds: debridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants. *Plast Reconstr Surg* 2006: 117(7 suppl): 72S – 109S.
- BERNARDO, Ana Flávia Cunha; SANTOS, Kamila dos; SILVA, Débora Parreiras da. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. **Revista Saúde em foco**, v. 1, n. 11, p. 1221-33, 2019.
- BHAKTA, T. et al. Studies on in vivo wound healing activity of *Cassia fistula linn.* Leaves (Leguminosae) in rats. [s.l: s.n.]. v. 4, 1998.BRAGAZZI, N. L. et al. Fasting and Its Impact on Skin Anatomy , Physiology , and Physiopathology : A Comprehensive Review of the Literature. *Nutrients*, v. 11, n. 2, p. 249, 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância sanitária Farmacopeia Brasileira, 2010. BRASIL. RENISUS. Disponível em <http://www.fitoterapia.org.br/portal>. Acesso em 13 de setembro de 2020.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada N° 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos., 2014.
- CAVALCANTE, G. M. et al. Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 26, n. 3, p. 227–234, 2011.

- CHING KUO LEE, PING HUNG LEE, YUEH HSIUNG KUO. The chemical constituents from the aril Cassia fistula Linn. *J Chin Chem Soc* 2001;48:1053-8.
- CHOPRA RN, NAYAR SL, CHPORA IC. Glossary of Indian medicinal plants, national institute of science communication and information resources; 2006. p. 54. 16.
- COELHO, J. M. et al. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir.* v. 37, n. 1, p. 45-51, 2010.
- DA CUNHA, A. Proença. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia. da Cunha AP, da Silva AP, Roque OR. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. 4^a ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.
- DAISY P, et al. Insulin mimetic impact of Catechin isolated from Cassia fistula on the glucose oxidation and molecular mechanisms of glucose uptake on Streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Phytomedicine*, v. 17, p. 28-36, 2010.
- DELAVARY, B.M. et al. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*, v. 216, p. 753 – 762, 2011.
- DENIZ, A.A.H., el al. Zooming in across the Skin: A Macro-to-Molecular Panorama. *Adv DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial and antifungal activity of Cassia fistula L.: an ethnomedicinal plant. Journal of Ethnopharmacology*, v. 112, p. 590-594, 2007.
- Exp Med Biol. 2020;1247:157-200.
- FILHO, Francisco Augusto de Mesquita. Avaliação da atividade cicatrizante e anti-inflamatória do extrato fluido das folhas dos brotos de Myracrodruon urundeuva Allemão. / Francisco Augusto de Mesquita Filho Mesquita. -2021 24 f.
- GONZALEZ, A. C. DE O. et al. Wound healing - A literature review. *Anais brasileiros dedermatologia*, v. 91, n. 5, p. 614–620, 2016.
- GOTTRUP F, Agren MS, Karlsmark T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair Regen.* 2000;8:83-96.
- GREENHALGH DG: The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 1019 –1030.

- HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in therapy*, v. 34, n. 3, p. 599–610, 2017.
- ILAVARASANA R, MALLIKAB M, VENKATARAMAN S. Anti-inflammatory and antioxidant activities of Cassia fistula linn bark extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2005;2:70-85.
- JANNING, D.; ALBUQUERQUE, C. A. C.; BARAUNA, S. C. Avaliação preliminar do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos (*Rattus norvegicus*). *Rev. Eletrônica Farm.* v. 8, n. 3, p. 53-64, 2011.
- KAINSA, S.; KUMAR, P.; RANI, P. Pharmacological potentials of *Cassia auriculata* and *Cassia fistula* plants: A review. *Pak J Biol Sci*, v. 15, p. 408-417, 2012.
- KITANAKA, Susumu et al. (+)- α -viniferin, an anti-inflammatory compound from *Caragana chamlagu* root. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, v. 38, n. 2, p. 432-435, 1990.
- KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, v. 3, n. 4, 2011.
- KUMAR A, PANDE CS, KAUL RK. Chemical examination of cassia fistula flowers. *Indian J Chem* 1966;4:460.
- KUMAR, M. et al. Wound healing potential of *Cassia fistula* on infected albino rat model. *Journal of Surgical Research*, v. 131, n. 2, p. 283–289, 2006.
- KUO YH, LEE PH, WEIN YS. Four new compounds from the seeds of *Cassia fistula*. *J Nat Prod* 2002;65:1165–7. 20.
- LABLER L, Mica L, Härter L, et al: Influence of V.A.C.-therapy on cytokines and growth factors in traumatic wounds. *Zentralbl Chir* 2006; 131(suppl 1): S62 – S67 [in German]
- LAL J, GUPTA PC. Partial hydrolysis and the structure of the galactomannan from *Cassia fistula* seeds. *Planta Med* 1976;30:378-83.
- LEE, C. K.; HANSEN, S. L. Management of Acute Wounds. *Surgical Clinics of North America*, v. 89, n. 3, p. 659–676, 2009.
- LEMOS, F.M.E. Avaliação e Caracterização de Membranas de Celulose Microcristalina Regenerada para uma Potencial Aplicação em Cicatrização de Feridas Crônicas. Dissertação (Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais). Rede temática em engenharia de materiais, 2008.

LIMA, C.R.O. Reparação de feridas cutâneas incisionais em coelhos após tratamento com barbatimão e quitosana. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás, 2010.

MAHESH VK, SHARMA R, SINGH RS. Anthraquinones and kaempferol from Cassia fistula species. *J Nat Prod* 1984;47:733–51.

MASSON-MEYERS, Daniela S. et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *International journal of experimental pathology*, v. 101, n. 1-2, p. 21-37, 2020.

MENDONÇA A, Ferreira A, Barbieri C, Thomazine J, Mazzer N. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. *Acta Ortop Bras.* 2006;14:152-157.

MENEZES, J. E. S. A. ; COSTA, S. M. O. ; SILVA, A. L. R. ; SOUSA, C. R.. Abordagem fitoquímica das flores de Cassia fistula e ação inibitória de acetilcolinesterase. 2009. Apresentação de Trabalho/Comunicação.

MENKE, N.B. Impaired wound healing. *Clin Dermatol*, v. 25, p. 19–25, 2007.

NEJATI, R.; KOVACIC, D.; SLOMINSKI, A. Neuro-immune-endocrine functions of the skin: an overview. *Expert review of dermatology*, v. 8, n. 6, p. 581–583, 2013.

perspectives in medicine, v. 5, n. 1, p. a023267, 2015.

PIRIZ, Manuele Arias et al. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. *Revista brasileira de plantas medicinais*, v. 16, n. 3, p. 628-636, 2014.

POOL JG: Normal hemostatic mechanisms: a review. *Am J Med Technol* 1977; 43: 776 – 780.

SAMY, R.P.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in Western Ghats of India. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, p. 63-71, 2000

SANORIA, S. et al. Cassia Fistula: Botany, phytochemistry and pharmacological leverages-a review. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2020.

SANTOS, N. R. Z.; TEIXEIRA, I. F. Arborização de vias públicas, ambiente X vegetação. Santa Cruz do Sul: Instituto Souza Cruz, 2001.

SARTORELLI P. et al. Antiparasitic activity of biochanin A, na isolated isoflavone from fruits of Cassia fistula (Leguminosae). *Parasitol Res*, v. 104, p. 311 – 314, 2009.

- SEN AB, SHUKIA YN. Chemical examination of Cassia fistula. *J Indian Chem Soc* 1968;45:744.
- SIDDHURAJU, P.; MOHAN, P. S.; BECKER, K. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food chemistry*, v. 79, n. 1, p. 61-67, 2002.
- SIDIQUA A, ZAHRA M, BEGUM K, JAMIL M. The traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of Cassia fistula. *J Pharm Pharmacol Res* 2018;2:15-23.
- SINGH RS, SINGH H, PANDEY HS, PANDEY RP, SINGH S. Two new aliphatic compounds from Cassia fistula L. *Indian J. Chem* 2005;44:2372-4.
- SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C.-E. The physiology of wound healing. *Surgery* (Oxford), v. 35, n. 9, p. 473–477, 2017.
- SOARES, Aline Kércia Alves. Avaliação de segurança e eficácia terapêutica da associação de *Cassia fistula* L, *Cassia angustifolia* Vahl, *Tamarindus indica* L, *Coriandrum sativum* L e *Glycyrrhiza glabra* L em pacientes com constipação intestinal. 2008.
- TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harbor VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. Journal of International Medical Research*, v. 37, n. 5, p. 1528–1542, 1 out. 2009.
- VELNAR, Tomaz; BAILEY, Tracey; SMRKOLJ, Vladimir. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, v. 37, n. 5, p. 1528-1542, 2009.
- WITHROW, Stephen J.; VAIL, David M. *Small Animal Clinical Oncology*. 4^a edição. Saunders, 2006.

APÊNDICES



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ**

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DO EXTRATO PADRONIZADO DA CASCA DO CAULE DE Cassia fistula Linn.(CHUVA-DE-OURO) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO INVIVO E ELUCIDAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO", protocolada sob o CEUA nº 1378050520 (00163), sob a responsabilidade de **Nylane Maria Nunes de Alencar e equipe; Liviane Maria Alves Rabelo; Gisele de Fátima Pinheiro Rangel; Tamiris de Fátima Goebel de Souza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 20/05/2020.

We certify that the proposal "EFFECT OF THE STANDARD EXTRACT OF THE STEM BARKS OF Cassia fistula Linn. (RAIN GOLD) ABOUT THE IN-HEALING PROCESS LIVING AND ELUCIDATION OF THE POSSIBLE MECHANISM OF ACTION", utilizing 100 Heterogenics mice (100 females), protocol number CEUA 1378050520 (00163), under the responsibility of **Nylane Maria Nunes de Alencar and team; Liviane Maria Alves Rabelo; Gisele de Fátima Pinheiro Rangel; Tamiris de Fátima Goebel de Souza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - Is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 05/20/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 08/2020 a 12/2020

Área: **Departamento de Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **5 a 6 semanas**

N: **100**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **20 a 25 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados em salas de cirurgia do biotério do Biotério Setorial da FAMED.

Fortaleza, 08 de abril de 2021

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará