



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

TAIANA MAGALHÃES PIERDONÁ MARTINS

**EFEITO DO EXTRATO PADRONIZADO DAS FLORES DE *Cassia fistula* Linn.
(CHUVA-DE-OURO) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO *IN VITRO* E *IN*
VIVO E ELUCIDAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO**

FORTALEZA- CE

2019

TAIANA MAGALHÃES PIERDONÁ MARTINS

**EFEITO DO EXTRATO PADRONIZADO DAS FLORES DE *Cassia fistula* Linn.
(CHUVA-DE-OURO) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO *IN VITRO* E
IN VIVO E ELUCIDAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de doutora em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

FORTALEZA - CE

2019

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)

- M347e Martins, Taiana Magalhães Pierdoná.
Efeito do extrato padronizado das flores de *Cassia fistula* linn. (chuva-de-ouro) sobre o processo de cicatrização in vitro e in vivo e elucidação do possível mecanismo de ação / Taiana Magalhães Pierdoná Martins. – 2019.
132 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.
1. Cassia. 2. Flores. 3. Cicatrização. 4. Antioxidante. 5. Reepitelização. I. Título.
- CDD 615.1
-

TAIANA MAGALHÃES PIERDONÁ MARTINS

EFEITO DO EXTRATO PADRONIZADO DAS FLORES DE *Cassia fistula* Linn. (CHUVA-DE-OURO) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* E ELUCIDAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de doutora em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

Aprovada em: 31/05/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Diego Veras Wilke
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Mirele da Silveira Vasconcelos
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia (IFCE)

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

À minha mãe
Temes (in memoriam),
pelo seu exemplo de luta e amor.

À minha filha
Júlia,
por fazer tudo valer a pena.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado a oportunidade de realizar meus sonhos e não ter me deixado desistir, apesar de todas as dificuldades, e ter me sustentando até este momento.

À minha orientadora Profa. Nylane Alencar, por toda sua dedicação e confiança no meu trabalho. Obrigada por ter me dado a oportunidade de fazer parte da linda família que é o LFB! Além de ter aberto as portas do seu laboratório, a senhora me acolheu com seu coração, e nunca terei palavras para expressar minha eterna gratidão e amor!

Ao Prof. Diego Wilke, por quem tenho grande admiração, por suas ideias e sua ajuda na elaboração desta pesquisa. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu marido Alexandre Martins, que me apoiou em tantos momentos que precisei estar ausente durante todo o doutorado, pela sua paciência e conselhos valiosos.

À amiga e companheira de pesquisa Tamiris Souza, por todos os momentos que compartilhamos, pela realização deste trabalho em parceria, onde crescemos juntas cientificamente. Também te agradeço por todos os seus conselhos e amizade.

À minha amiga Simone Silva que tanto me apoiou e incentivou durante a minha jornada na Universidade de Manitoba, no Canadá. Também agradeço ao Dr. Ghavami por todos os conhecimentos transmitidos e pela oportunidade de iniciar minha carreira científica no Canadá.

À minha amiga Milena Portela por todo o seu apoio, preocupação, amizade e por sempre cuidar de mim!

Aos queridos amigos de pós-graduação Suzana Bezerra, Moises Maia, Nathalia Lima, Sandra Araruna e Aline Holanda por quem tenho um imenso carinho e gratidão por tantos momentos compartilhados juntos, troca de experiências e muito carinho!

Aos queridos técnicos de laboratório Patricia Sousa e Manuel Monteiro, pela disposição em sempre ajudar, estar do nosso lado e pela amizade verdadeira.

A todos os estudantes de iniciação científica do nosso laboratório: Rebeca Duarte, Anderson Dantas, Liviane Rabelo, Brenda Uchôa e Carol Oliveira, por todo apoio na realização dos experimentos.

Ao Prof. Said Fonseca, por todo conhecimento compartilhado, pela sua ajuda na elaboração do creme para os experimentos *in vivo*.

Ao Mauro Moraes e Kirley Canuto pela parceria para a caracterização do extrato, que foi essencial para este trabalho.

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

Às amigas Alexia Assef, Erlânia Siqueira, Thaís Brito e Katharine Florêncio que estiveram sempre dispostas a ajudar e contribuir com os experimentos realizados no LaBBMar.

Às minhas amigas científicas, Marília Oliveira, Gisele Rangel, Kayanny Ferreira, Luana Carmo, Fernanda Soares e Bianca Kurita pelo apoio, carinho e descontração durante essa jornada.

À Unifametro por ter cedido a sua estrutura para a realização dos testes fitoquímicos e a todos os meus ex-alunos que sempre me apoiaram incondicionalmente, acreditando no meu trabalho. Gostaria de agradecer especialmente à minhas ex-alunas Lilliam Sales, Elisangela Rodrigues e Halane Moreira pela ajuda direta na preparação dos extratos e análises fitoquímicas e à Camila Campelo por ter me incentivado a pesquisar a *Cassia fistula*. Nunca esquecerei os momentos que compartilhamos juntas!

A todos os funcionários do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) e à unidade multi-usuário do NPDM da Universidade Federal do Ceará.

Ao apoio financeiro da CAPES e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“Nunca saberemos o quão forte somos até que ser forte seja a única escolha.”

Autor desconhecido

RESUMO

EFEITO DO EXTRATO PADRONIZADO DAS FLORES DE *Cassia fistula* Linn. (CHUVA-DE-OURO) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* E ELUCIDAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO

O ônus do tratamento de feridas vem aumentando muito nas últimas décadas e o uso de plantas medicinais se torna um excelente recurso para esse propósito pelo seu baixo custo, fácil acesso e efetividade terapêutica. *Cassia fistula* Linn (chuva-de-ouro) é uma planta encontrada em regiões tropicais do Brasil e conhecida popularmente para o tratamento de doenças de pele, prurido e diabetes. Estudos anteriores demonstraram que o extrato das flores de *C. fistula* possui propriedades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. Compostos fenólicos de *C. fistula* também foram eficazes na cicatrização de feridas. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar o extrato etanólico das flores de *C. fistula* (ECFF) e investigar o seu efeito em linhagens de fibroblastos (L929) e macrófagos murinos (RAW 264.7) e em queratinócitos humanos (HaCaT). Além disso, objetivou-se avaliar o seu efeito em modelo de feridas excisionais em camundongos. A caracterização fitoquímica de ECFF mostrou a presença de alcaloides, fenóis, flavonoides, taninos e antraquinonas, e por cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC) identificou-se a presença de rutina, kaempferol-3-O-rutinosídeo, kaempferol e réina. Neste estudo, ECFF (31,25 – 250 µg/mL) induziu o aumento da viabilidade e metabolismo mitocondrial em L929 e HaCaT através do método de MTT. Através do ensaio de SRB e cicatrização *in vitro*, ECFF mostrou aumento da proliferação de HaCaT bem como o aumento da sua migração, que pode estar associada à diminuição da expressão da proteína de adesão E-caderina, mensurada por citometria de fluxo. ECFF também demonstrou efeito antioxidante pelo método do DPPH, e foi capaz de proteger fibroblastos do estresse oxidativo induzido por H₂O₂ e aumentar fator de angiogênese VEGF. Em macrófagos RAW 264.7, ECFF diminuiu os níveis de nitrito produzidos após estimulação com LPS, e modulou a liberação de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-10 e fator de crescimento TGF- β . Em modelo de feridas excisionais, o creme produzido com ECFF (CrECFF 12,5 e 25% p/p) aumentou os níveis de TNF- α e IL-1 β após 2 dias de tratamento e o resultado foi confirmado por análise imunohistoquímica. Além disso, CrECFF promoveu maior contração das feridas após 4, 7 e 9 dias de tratamento, estimulando a reepitelização. Após 7 dias de tratamento, CrECFF também foi capaz de aumentar os níveis de TGF- β . Logo, o efeito cicatrizante de ECFF pode ser atribuído à redução dos danos provocados pelo estresse oxidativo, modulação da inflamação e estímulo para o reparo de feridas. Acredita-se que este trabalho dará suporte para outros estudos que viabilizem

o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico a partir de ECFF para o tratamento de feridas.

Palavras-chave: Cassia. Flores. Antioxidante. Cicatrização. Reepitelização.

ABSTRACT

EFFECT OF THE STANDARD EXTRACT OF *Cassia fistula* Linn. (GOLDEN RAIN) FLOWERS THROUGH THE *IN VITRO* AND *IN VIVO* HEALING PROCESS AND ELUCIDATION OF THE POSSIBLE MECHANISM OF ACTION

The burden of wound care has been increasing in recent decades. Medicinal plants have become an excellent resource for this purpose due to their low cost, easy access and therapeutic effectiveness. *Cassia fistula* Linn (golden rain) is a plant found in Brazil's tropical regions and popularly known to treat skin diseases, itching, and diabetes. Previous studies have shown that the extract of *C. fistula* flowers has demonstrated antioxidant, antibacterial and antifungal activities. Phenolic compounds from *C. fistula* were also useful in wound healing. Thus, this work aimed to characterize the ethanolic extract of *C. fistula* flowers (ECFF) and to investigate its effect in murine fibroblast (L929) and macrophages (RAW 264.7) and human keratinocytes (HaCaT). Besides, the objective was to evaluate its effect in mice using a model of excisional wounds. The phytochemical characterization of ECFF showed alkaloids, phenols, flavonoids, tannins and anthraquinones, and through ultra-performance liquid chromatography (UPLC), the presence of rutin, kaempferol-3-O-rutinoside, kaempferol and reina. In this study, ECFF (31.25 - 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$) improved the cell viability and increase the cell mitochondrial metabolism in L929 and HaCaT, using the MTT method. Through the SRB assay and *in vitro* wound healing, ECFF showed an increase in HaCaT proliferation and migration. These effects may be associated with E-cadherin decrease, measured by flow cytometry. ECFF demonstrated an antioxidant effect by the DPPH method, protected fibroblasts from oxidative stress induced by H_2O_2 , and increased the VEGF, an angiogenesis factor, as well. In RAW 264.7 macrophages, ECFF decreased nitrite levels released after LPS stimulation and modulated the cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-10 and growth factor TGF- β release. The cream produced with ECFF (CrECFF 12.5 and 25% w/w) increased TNF- α and IL-1 β levels after 2 days of treatment on excision wound model, and the result was confirmed by immunohistochemical analysis. In addition, CrECFF promoted a significant contraction of the wounds after 4, 7 and 9 days of treatment, stimulating reepithelialization. After 7 days of treatment, CrECFF was able to increase TGF- β levels. Therefore, the wound healing effect of ECFF can be attributed to the reduction of damage induced by oxidative stress, modulating the inflammation and wound repair stimulus. We believe that this work will support other studies to develop an herbal medicine from ECFF for the wound's treatment.

Keywords: Cassia. Flowers. Antioxidant. Wound healing. Reepithelization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Principais camadas e componentes da pele.....	23
Figura 2 –	Características clínicas das doenças mais comuns ligadas às falhas na cicatrização de feridas.....	27
Figura 3 –	Fases da cicatrização de feridas cutâneas.....	29
Figura 4 –	Flores de <i>Cassia Fistula</i> Linn.....	39
Figura 5 –	Esquema ilustrativo sobre tratamento de queratinócitos com o sobrenadante de fibroblastos.....	54
Figura 6 –	Esquema ilustrativo do ensaio de cicatrização in vitro - <i>Scratch</i>	55
Figura 7 –	Cromatograma do extrato etanólico das flores de <i>Cassia fistula</i> Linn. (ECFF) - modo negativo.....	64
Figura 8 –	Atividade antioxidante de ECFF pelo sequestro de radicais DPPH.....	66
Figura 9 –	Viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) tratados com ECFF pelo método do MTT.....	68
Figura 10 –	Viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) tratados com ECFF pelo método de SRB.....	69
Figura 11 –	Viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) após estresse celular induzido por H ₂ O ₂	71
Figura 12 –	Efeito de ECFF sobre a morfologia dos fibroblastos murinos (L929) expostos ao H ₂ O ₂	72
Figura 13 –	Efeitos de ECFF sobre liberação de TGF- β e VEGF em fibroblastos murinos L929.....	73
Figura 14 –	Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 tratados com ECFF pelo método de SRB.....	74
Figura 15 –	Liberação de nitrito por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.....	75
Figura 16 –	– Efeitos de ECFF sobre a liberação de TNF- α e IL-1 β por macrófagos estimulados com LPS.....	77

Figura 17 –	Efeitos de ECFE sobre a liberação de TGF- β e IL-10 por macrófagos estimulados com LPS.....	78
Figura 18 –	Viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCaT) tratados com ECFE pelo método do MTT.....	80
Figura 19 –	Proliferação celular de queratinócitos humanos tratados com ECFE pelo método de SRB.....	82
Figura 20 –	Fotomicrografias de queratinócitos HaCaT tratados com ECFE por 48h.....	83
Figura 21 –	Viabilidade celular de queratinócitos HaCaT após 24h de tratamento com sobrenadante de fibroblastos L929 incubados com ECFE pelo método de SRB.....	85
Figura 22 –	Proliferação e migração celular de HaCaT no ensaio do <i>Scratch</i> após tratamento com ECFE.....	87
Figura 23 –	Fotomicrografias produzidas pelo ensaio do <i>Scratch</i> em HaCaT após tratamento com ECFE.....	88
Figura 24 –	Migração celular da HaCaT tratada com ECFE após ensaio de <i>Scratch</i>	90
Figura 25 –	Efeito de ECFE sobre a expressão de E-caderina em HaCaT.....	91
Figura 26 –	Efeito de CrECFE sobre a contração de feridas excisionais em camundongos.....	93
Figura 27 –	Representação histológica do epitélio de camundongo com ferida excisional após 12 dias de tratamento com CrECFE.....	95
Figura 28 –	Níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 após 2 dias de tratamento com CrECFE...	97
Figura 29 –	Níveis dos fatores de crescimento TGF- β e VEGF após 7 dias de tratamento com CrECFE.....	98
Figura 30 –	Imunomarcação para TNF- α no epitélio de camundongos submetidos à feridas excisionais após 2 dias de tratamento com CrECFE.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros histológicos para análise por H&E	59
Tabela 2 –	Teor de umidade das flores de <i>Cassia fistula</i> após secagem em estufa em diferentes períodos de tempo.	62
Tabela 3 –	Análise fitoquímica de ECFF para identificação de metabólitos secundários	63
Tabela 4 –	Compostos detectados e caracterizados em ECFF por UPLC-ESI-QTOF MS/MS no modo de ionização negativo	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância

AlCl₃ - Cloreto de alumínio

CFE – *Cassia fistula* flores

COX-2 – Cicloxigenase 2

CrECFE – Creme do extrato de *Cassia fistula* flores

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - dimetilsulfóxido

DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

EAG - Equivalentes de ácido gálico

ECFE - Extrato de *Cassia fistula* flores

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EQ - Equivalentes de quercetina

ERO - Espécie reativa de oxigênio

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

H&E – Hematoxilina e eosina

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HaCaT – Linhagem de queratinócitos humanos

IFN- γ – Interferon gama

IL-10 – Interleucina 10

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

L929 – Linhagem de fibroblastos murinos

LPS – Lipopolissacarídeo S

MAPK – Proteína quinases ativadas por mitógenos

MEC – Matriz extracelular

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazólio

Na₂CO₃ - Carbonato de sódio

NFκB – Fator nuclear kappa B

NMP – N-metil-(2S,4R)-trans-4-hidroxi-l-prolina

OGM NB2 - Organismo Geneticamente Modificado da classe de risco 2

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PGE₂ – Prostaglandina E2

RAW 264.7 – Linhagem de macrófagos murinos

Rename – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

Renisus – Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

SCQ – Superfície corporal queimada

SFB – Soro fetal bovino

SRB – Sulforodamina B

SUS – Sistema Único de Saúde

TGF-β – Fator de transformação do crescimento beta

TLR – Toll like receptores

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

αSMA – actina-alfa de músculo liso

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. PELE: UMA BARREIRA FÍSICA E IMUNOLÓGICA	22
1.2. FERIDAS CUTÂNEAS.....	25
1.3. PROCESSO CICATRICIAL DE FERIDAS CUTÂNEAS	28
1.3.1. Fase de Hemostasia	29
1.3.2. Fase inflamatória	30
1.3.3. Fase proliferativa.....	32
1.3.4. Fase de remodelação	34
1.4. TRATAMENTOS ATUAIS PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS	35
1.5. PLANTAS MEDICINAIS: POTENCIAL FONTE DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS CICATRIZANTES	36
1.6. <i>CASSIA FISTULA</i> LINN	38
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. OBJETIVO GERAL.....	42
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DAS FLORES DE <i>CASSIA FISTULAM</i> LINN. (ECFF).....	43
4.1.1. Material botânico.....	43
4.1.2. Padronização do teor de umidade da droga vegetal e método de obtenção do extrato de <i>Cassia fistula</i> Linn. (ECFF).....	43
4.1.3. Determinação do teor de resíduo seco de ECFF.....	44
4.1.4. Análise fitoquímica de ECFF.....	44
4.1.5. Análise quantitativa do teor de fenóis e flavonoides totais em ECFF.....	44
4.1.6. Análise e caracterização de ECFF por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-ESI-QTOF MS/MS)	45
4.2. AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i>	45
4.2.1. Preparo de ECFF para ensaios <i>in vitro</i>	45
4.2.2. Atividade antioxidante pelo método de DPPH	46
4.2.3. Cultivo celular.....	46
4.2.4. Testes de citotoxicidade celular	48
4.2.5. Protocolos experimentais em fibroblastos murinos (L929)	50
4.2.6. Protocolos experimentais em macrófagos murinos (RAW 264.7)	51
4.2.7. Protocolos experimentais em queratinócitos humanos (HaCaT)	53
4.3. AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA <i>IN VIVO</i>	56
4.3.1. Animais.....	56

4.3.2.	<i>Procedimento cirúrgico de indução de feridas excisionais</i>	57
4.3.3.	<i>Produção de creme contendo extrato padronizado das flores de Cassia fistula (CrECFF)</i>	57
4.3.4.	<i>Grupos experimentais</i>	58
4.3.5.	<i>Parâmetros avaliados</i>	58
4.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5.	RESULTADOS	62
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DAS FLORES DE <i>CASSIA FISTULA</i> LINN. (ECFF).....	62
5.1.1.	<i>Determinação do teor de umidade da droga vegetal e resíduo seco de ECFF</i> .	62
5.1.2.	<i>Análise fitoquímica e do teor de fenóis e flavonoides totais de ECFF</i>	63
5.1.3.	<i>Caracterização de ECFF por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-ESI-QTOF MS/MS)</i>	64
5.2.	EXTRATO DAS FLORES DE <i>CASSIA FISTULA</i> (ECFF) APRESENTA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH	66
5.3.	PROTOCOLOS EM FIBROBLASTOS MURINOS L929.....	67
5.3.1.	<i>ECFF não apresenta citotoxicidade pelo método do MTT e aumenta o metabolismo mitocondrial em fibroblastos</i>	67
5.3.2.	<i>ECFF não apresenta citotoxicidade pelo método de SRB em fibroblastos</i>	67
5.3.3.	<i>ECFF protege fibroblastos murinos (L929) do estresse celular induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂)</i>	70
5.3.4.	<i>ECFF aumenta produção de fator de crescimento VEGF em fibroblastos murinos (L929)</i>	73
5.4.	PROTOCOLOS EM MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264.7	74
5.4.1.	<i>ECFF não apresenta citotoxicidade pelo método de SRB em macrófagos</i>	74
5.4.2.	<i>ECFF reduziu os níveis de nitrito (NO) produzidos por macrófagos murinos RAW 264.7</i>	75
5.4.3.	<i>Efeito de ECFF sobre a liberação dos mediadores TNF-α, IL-1β, IL-10 e TGF-β por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS</i>	76
5.5.	PROTOCOLOS EM QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT)	79
5.5.1.	<i>ECFF não apresenta citotoxicidade pelo método do MTT e aumenta o metabolismo mitocondrial em queratinócitos</i>	79
5.5.2.	<i>ECFF estimulou a proliferação celular de queratinócitos humanos (HaCaT) pelo método de SRB</i>	81
5.5.3.	<i>Coloração com Panótipo mostra aumento da densidade populacional de queratinócitos tratados com ECFF</i>	83
5.5.4.	<i>Tratamento com sobrenadante de fibroblastos L929 incubados com ECFF aumenta a proliferação de queratinócitos HaCaT</i>	84
5.5.5.	<i>Ensaio de cicatrização in vitro em queratinócitos humanos HaCaT (Scratch)</i> . 86	
5.6.	PROTOCOLO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EXCISIONAIS EM CAMUNDONGOS	92
5.6.1.	<i>O tratamento tópico com CrECFF foi capaz de reduzir a área das feridas excisionais</i>	92
5.6.2.	<i>Efeito de CrECFF na remodelação de feridas excisionais em camundongos</i> ... 94	

5.6.3. <i>Modulação da liberação de TNF-α, IL-1β, IL-10, TGF-β e VEGF em feridas excisionais em camundongos após tratamento com CrECFF</i>	96
5.6.4. <i>Tratamento com CrECFF aumenta a imunomarcção de TNF-α no epitélio de camundongos submetidos à feridas excisionais</i>	99
6. DISCUSSÃO	101
7. CONCLUSÃO	115
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
9. APÊNDICES	130

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pele: uma barreira física e imunológica

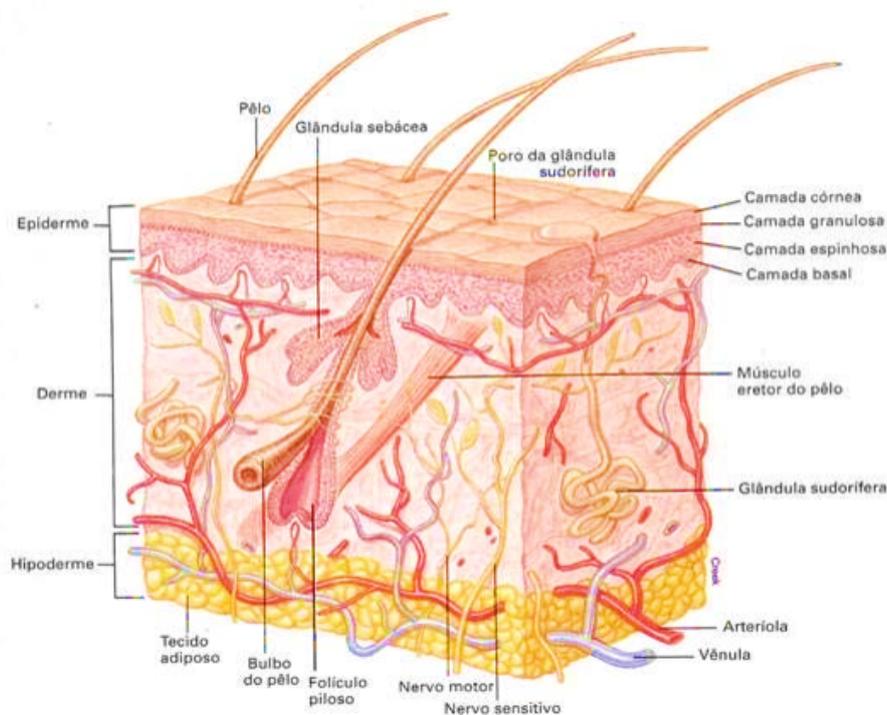
A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, reveste uma área superficial de aproximadamente 2 m² e representa cerca de 15% do peso corporal total do adulto. Por estar situada na interface entre o corpo e o meio ambiente, é uma barreira muito importante, com papéis passivos e ativos contra agentes químicos, físicos e biológicos (BRAGAZZI *et al.*, 2019; KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011). Além disso, está ligada a funções sensoriais como o toque, pressão, mudanças de temperatura, dor e alertas para potencial dano tecidual. A pele também tem um papel essencial na troca de fluidos, sais, gases, calor e é o nosso maior órgão neuro-imuno-endócrino (NEJATI; KOVACIC; SLOMINSKI, 2013). Os vários tipos de células presentes nas camadas da pele formam redes complexas de comunicação multicelular, cuja função adequada estabelece a homeostase fisiológica desse órgão (OLÁH; SZÖLLÖSI; BÍRÓ, 2012).

Possivelmente, a função mais importante da pele é a formação da barreira física. Por muito tempo, acreditou-se que essa seria uma função “passiva”, originada das características estruturais únicas e das propriedades anatômicas especiais da pele. No entanto, nas últimas décadas, tornou-se cada vez mais aceito que os diferentes tipos de células cutâneas possuem funções muito importantes na geração de uma proteção “ativa” coordenada, formando assim uma verdadeira primeira linha de defesa contra os impactos nocivos do ambiente externo, como por exemplo, os desafios ambientais físicos (radiação ultravioleta, temperatura), invasões microbianas, compostos alergênicos, irritantes químicos, etc. (ELIAS; WAKEFIELD, 2010).

Células imunocompetentes e fatores humorais tornam a pele também uma barreira imunológica (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004). Várias células do sistema imune como células fagocíticas residentes e infiltrantes, células assassinas naturais ou “natural killers”, mastócitos, células apresentadoras de antígenos como as células de Langerhans epidérmicas e células dendríticas dérmicas, bem como linfócitos T e B estão localizadas em vários compartimentos da pele. Além disso, uma abundância de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios, bem como lipídios e peptídios antimicrobianos são sintetizados e liberados de praticamente todos os tipos de células da pele. Portanto, em infecções, exposição a alérgenos ou ruptura de barreira, esses componentes da imunidade inata e adaptativa são coativados para induzir uma resposta inflamatória e imunológica orquestrada (GIRARDI, 2007; NESTLE *et al.*, 2009).

A estrutura da pele é composta pela epiderme, derme, hipoderme (camada subcutânea) e anexos cutâneos. A epiderme, que forma a camada mais externa da pele, é a principal barreira entre o ambiente e os tecidos internos, e por ser impermeável desempenha um papel crucial no controle da umidade do corpo (NATARAJAN *et al.*, 2014). Além disso, a epiderme é subdividida em camadas ou estratos, onde a partir da camada mais interna para a superfície encontram-se: a camada basal, a camada espinhosa, a camada granulosa, e a camada córnea (**Figura 1**). Esses estratos ou camadas são reflexo da progressão das células germinativas, encontradas na base, para células corneificadas, diferenciadas e presentes na superfície (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014).

Figura 1. Principais camadas e componentes da pele.



Fonte: VAN DE GRAAFF, 2003

Os queratinócitos são as células mais abundantes presentes na epiderme (aproximadamente 80%), enquanto a população remanescente de células epidérmicas é composta por melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (STRONG; NEUMEISTER; LEVI, 2017). Os queratinócitos são responsáveis pela estrutura estratificada da epiderme e formam numerosas junções intercelulares. Essas junções são conhecidas como desmossomos e colaboram para a manutenção da tensão mecânica da epiderme (NYAME;

CHIANG; ORGILL, 2014). A adesão célula-célula é importante para a manutenção da integridade do tecido epitelial e na diferenciação de queratinócitos entre a estratificação das camadas da epiderme. Também tem um importante papel nessa adesão, as proteínas da classe das caderinas, como a E-caderina. Por serem mediadores de adesão entre melanócitos e queratinócitos, essas proteínas exercem uma importante função adesiva quando associadas à actina do citoesqueleto celular, onde formam uma junção aderente (HUNG *et al.*, 2006; YOUNG *et al.*, 2003).

Os queratinócitos também são considerados os principais componentes da barreira física/mecânica da epiderme. Durante o curso de seu programa de diferenciação fisiológica, dirigido por apoptose, à medida que se movem “para cima” da camada basal mais profunda, através das camadas espinhosa e granular, sua permeabilidade ao Ca^{2+} aumenta e a elevação resultante da concentração de Ca^{2+} intracelular ativa peptidases e converte a pró-filagrina em filagrina. A filagrina então agrega várias citoqueratinas e outros filamentos intermediários nas células superficiais que, depois de terem se tornado anucleadas (corneócitos), geram o escudo sólido mecânico/físico, ou seja, a camada córnea, que é considerada a “barreira física real” da pele (JENSEN; PROKSCH, 2009; PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008; RAWLINGS, 2010).

Os melanócitos são responsáveis pela síntese de melanina (pigmento que absorve a radiação ultravioleta e protege a pele de seus efeitos negativos) e estão localizados na camada basal, além de formar dendritos que podem atingir a camada espinhosa (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014). Já as células de Merkel, responsáveis pela percepção mecânica, também são encontradas no estrato basal, enquanto as células de Langerhans são distribuídas no estrato espinhoso e envolvidas na proteção imunológica: como citado anteriormente, elas agem como células apresentadoras de antígenos e englobam patógenos ou outras substâncias estranhas (MATHES; RUFFNER; GRAF-HAUSNER, 2014).

A derme é a camada intermediária da pele, e tem o tecido conjuntivo e a matriz extracelular (MEC) como seus principais componentes. É mais heterogênea do que a epiderme, e diferentes estruturas como vasos sanguíneos, vasos linfáticos, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e folículos pilosos estão localizados nesta região. Pode ser dividida em duas outras camadas: a papilar e a reticular. A camada papilar é delgada, superficial e inclui fibras e capilares reticulares, elásticos e não-organizados de colágeno, principalmente do tipo III. Já a camada reticular possui os filamentos de colágeno mais longos e entrelaçados com fibras elásticas, sendo o colágeno do tipo I o mais predominante. O tecido conjuntivo consiste principalmente de colágeno, que dá força à pele, elastina, responsável pela elasticidade e

flexibilidade, e proteoglicanos, que ajudam na hidratação e viscosidade da pele (POZZI; YURCHENCO; IOZZO, 2017; SHPICHKA *et al.*, 2019).

A derme é constantemente remodelada devido à ação de enzimas proteolíticas, conhecidas como metaloproteinases de matriz, que são sintetizadas por células como fibroblastos, neutrófilos e queratinócitos (CALEY; MARTINS; O'TOOLE, 2015). O principal tipo de célula da derme são os fibroblastos, que produzem componentes da MEC (colágeno, elastina e proteoglicanos) e secretam vários fatores de crescimento (ex.: TGF- β e VEGF), citocinas (ex.: TNF- α) e metaloproteinases. Esse conjunto de substâncias liberadas garante a proliferação e diferenciação da MEC e dos queratinócitos. Portanto, os fibroblastos são essenciais para o remodelamento da pele e cicatrização de feridas (CERQUEIRA; PIRRACO; MARQUES, 2015; WANG, J. H.-C. *et al.*, 2007)

Entre a derme e os músculos, localiza-se a hipoderme ou tecido subcutâneo. Esta camada protege os tecidos e órgãos internos contra o frio e o trauma, fornece energia e participa da síntese de hormônios (ex.: estrogênio e leptina). A hipoderme é formada por adipócitos estruturados em lóbulos, que são separados com os septos do tecido conjuntivo e contêm nervos, rede linfática e microvascular, que garante o fornecimento de nutrientes e oxigênio para as outras camadas (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014; NEJATI; KOVACIC; SLOMINSKI, 2013).

Por ser um órgão que reveste todo o corpo, a pele fica facilmente exposta a diversos tipos de lesões externas. Estas podem ser agudas, como escoriações, queimaduras, traumas e cirurgias, nas quais a cicatrização ocorre em tempo hábil para o reparo completo da ferida, ou crônicas, quando demonstram retardo na cicatrização após a injúria inicial e com riscos de ressurgimento (BOATENG; CATANZANO, 2015).

1.2. Feridas 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 e/ou fisiológica. O tempo de cicatrização é um parâmetro significativo quando se trata do reparo de feridas, assim, elas são divididas clinicamente em dois grupos: feridas agudas e crônicas. Também são classificadas de acordo com a sua intensidade em superficiais e profundas (REINKE; SORG, 2012; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

Feridas que destroem a integridade do tecido, mas fecham espontaneamente, seguindo uma progressão oportuna e ordenada (entre 4 e 6 semanas), são classificadas como feridas

agudas (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017). Elas podem ser lesões traumáticas, abrasões, queimaduras ou podem ser consequência de procedimentos cirúrgicos, mudanças extremas de temperatura, contato com produtos químicos, exposição à radiação ou infecção. Elas também podem ser classificadas de acordo com seu tamanho, profundidade e localização (LEE, C. K.; HANSEN, 2009).

As feridas crônicas, assim como as agudas, também podem ter várias origens como exposição a infecções ou agentes físicos, inflamação e tumores. No entanto, ao contrário das feridas agudas, a cicatrização de feridas crônicas é retardada (mais de 12 semanas) devido à inflamação prolongada, que resulta em uma incapacidade cicatricial, enquanto o processo de tratamento é semelhante em ambos os tipos de lesões (HAN; CEILLEY, 2017).

Embora lesões menores, em indivíduos saudáveis, geralmente levem à uma boa cicatrização, lesões maiores ou a presença de uma variedade de fatores como idade, infecções, diabetes, doença vascular e câncer, podem afetar negativamente o processo de reparo de feridas. Alguns tipos de feridas que não cicatrizam facilmente são as úlceras de pernas ou pé (diabéticas, isquêmicas ou venosas) e úlceras de pressão. À medida que estas feridas cronificam, os pacientes tendem a viver com reincidência destas, e em casos mais graves são levados à morte. Além disso, os mecanismos subjacentes à formação de cicatrizes patológicas, incluindo cicatrizes hipertróficas e formação de quelóides são ainda pouco compreendidas, e faltam opções de tratamentos eficazes (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2016) (**Figura 2**).

O ônus do tratamento de feridas (agudas e crônicas) vem aumentando cada vez mais nas últimas décadas, em paralelo ao aumento da população e às comorbidades associadas ao surgimento de feridas crônicas (BREM; TOMIC-CANIC, 2007; SEN *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2016). A compreensão incompleta da base molecular subjacente ao reparo tecidual e sua falha, bem como a falta de modelos animais pré-clínicos que recapitulem adequadamente as condições humanas, levaram à falta de terapias para tratar feridas que não cicatrizam ou para acelerar o reparo de feridas agudas e redução da formação de cicatrizes. A pesquisa clínica é dificultada por uma população de pacientes complexa e multi-mórbida, que contribuem para uma escassez de ensaios clínicos de alta qualidade e em larga escala, até mesmo para demonstrar a eficácia dos produtos atuais. Além disso, um clima cada vez mais cauteloso para investimentos industriais, fontes limitadas de financiamento para pesquisa (RICHMOND *et al.*, 2013) e falta de conscientização pública também contribuíram para retardar o progresso. Portanto, apesar dos avanços atuais, ainda existe uma forte necessidade médica e social de melhorar as abordagens terapêuticas que aumentem a capacidade regenerativa tecidual (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2016).

Figura 2. Características clínicas das doenças mais comuns ligadas às falhas na cicatrização de feridas.

<p>Úlcera venosa de perna</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Comum em idosos ▪ Resultado de hipertensão venosa crônica ▪ Inflamação persistente ▪ Depósitos de hemossiderina ▪ Lipodermatoesclerose 	<p>A</p> 	<p>B</p> 	<p>Úlcera arterial</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Redução do suprimento sanguíneo ▪ Isquemia, necrose ▪ Pouco exudato ▪ Comum em diabetes ▪ Dolorosa
<p>Úlcera de pé diabético</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Comum em diabetes ▪ Hiperglicemia ▪ Micro-/macroangiopatia ▪ Neuropatia ▪ Infecção ▪ Deformidades no pé 	<p>C</p> 	<p>D</p> 	<p>Úlcera por pressão</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Comum em idosos e indivíduos acamados ▪ Área com tecido necrótico ▪ Causada por compressão prolongada de tecidos moles ▪ Isquemia local, úmida
<p>Cicatriz hipertrófica</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Rápido crescimento ▪ Geralmente regride <6 meses ▪ Fibras de colágeno paralelas à superfície da pele ▪ Vasos sanguíneos orientados verticalmente 	<p>E</p> 	<p>F</p> 	<p>Quelóide</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Crescimento constante ▪ Não regride espontaneamente ▪ Se estende além das margens de dano tecidual ▪ Predisposição genética ▪ Grossa, feixes de colágeno orientados ao acaso

Fonte: adaptado de EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2016

A resposta de reparo pode ser perturbada por uma infinidade de fatores locais e sistêmicos, levando a diversas doenças que impedem a cicatrização de feridas. (A) Aspecto medial de perna com úlcera venosa. (B) Aspecto lateral de perna com úlcera arterial. (C) Úlcera de pé diabético. (D) Úlcera por pressão. (E) Cicatriz hipertrófica após cirurgia tireoidiana. (F) Quelóide.

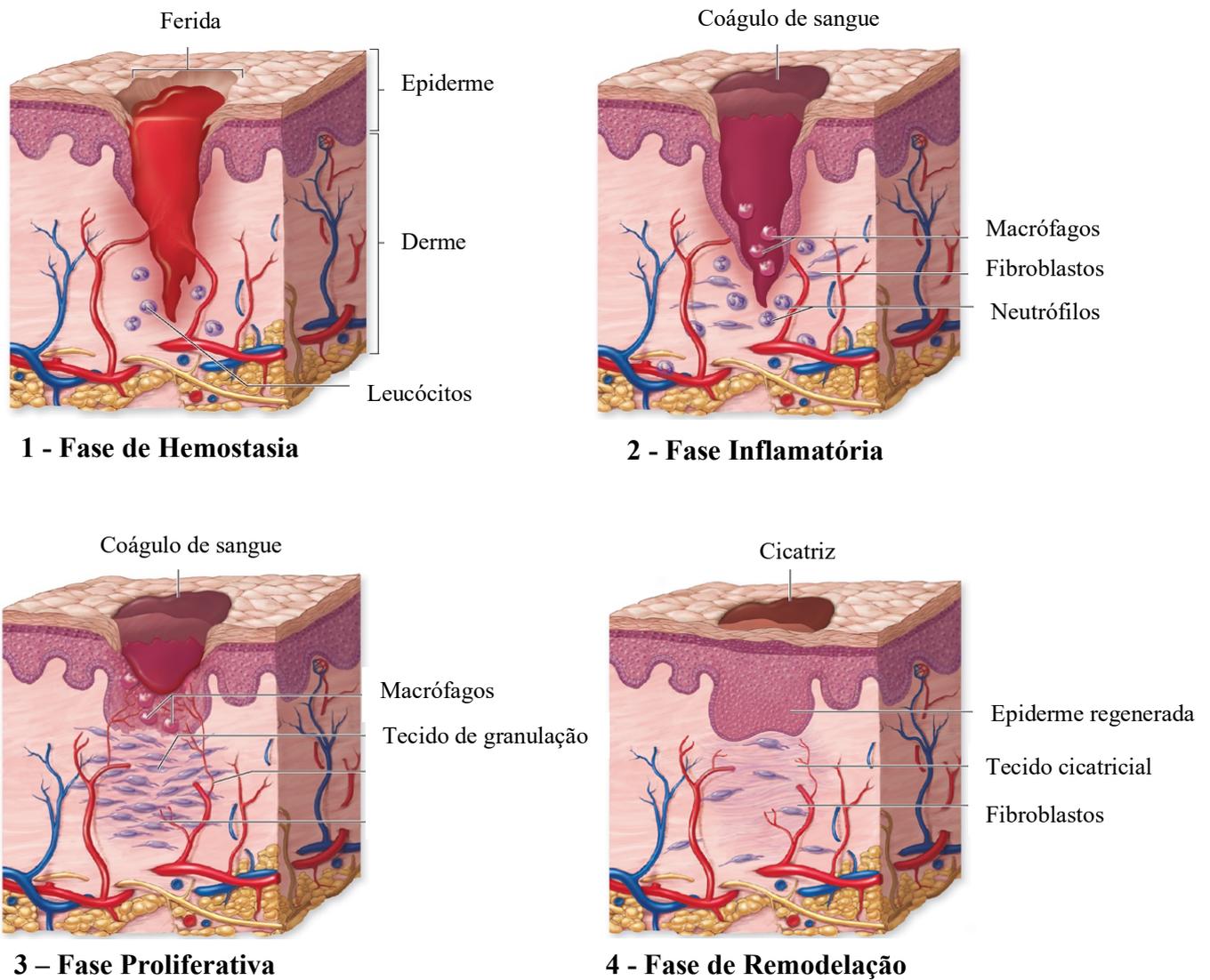
1.3. Processo cicatricial de feridas cutâneas

A cicatrização de feridas da pele depende de um processo dinâmico complexo, que envolve a interação de muitos tipos de células, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas e que começa imediatamente após a lesão (GONZALEZ *et al.*, 2016). A reconstituição do tecido cutâneo pode ser desenvolvida pelo mecanismo de reparação ou regeneração, sendo o primeiro responsável pela formação de uma cicatriz (TAKEO; LEE; ITO, 2015).

A cicatrização normal de feridas é dividida em quatro fases clássicas, sobrepostas e contínuas que são: hemostasia, inflamação, proliferação celular e remodelação tecidual. A hemostasia é a primeira fase e começa imediatamente após a lesão inicial, para evitar o sangramento e iniciar a formação de um tampão hemostático ou coágulo. Na segunda fase, as células inflamatórias são recrutadas para o local da lesão para remover detritos celulares e iniciar cascatas de sinalização para posterior cicatrização da ferida. Já durante a fase proliferativa, os queratinócitos proliferam para fechar a lesão, enquanto os miofibroblastos se contraem para diminuir o tamanho da ferida. As células endoteliais estão proliferando simultaneamente ao longo de todas as fases da cicatrização, a fim de revascularizar o tecido lesado. Por fim, ao longo de semanas a anos, a matriz extracelular (MEC) remodela e forma uma cicatriz com uma resistência à tração próxima de 80% em relação à pele normal não lesada (GURTNER *et al.*, 2008; REINKE; SORG, 2012; WALLACE; ZITO, 2019) (**Figura 3**).

Fatores importantes que estimulam a reepitelização do tecido cutâneo são a taxa de oxigenação e vascularização. Estes fatores são importantes pois favorecem o metabolismo celular, prevenindo infecções, induzindo a formação de novos vasos sanguíneos, além de aumentar a síntese de colágeno. Além do mais, a presença de infecção bacteriana é capaz de prolongar, especificamente, a fase inflamatória devido ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (GUO; DIPIETRO, 2010). Com os estágios definidos na cicatrização, uma nutrição adequada também é fundamental para uma cicatrização satisfatória, dado que os processos biológicos requerem nutrientes para proliferação e diferenciação celular, síntese de fatores de crescimento e citocinas, e a promoção de um ambiente favorável para a manutenção da funcionalidade do tecido (BROWN; PHILLIPS, 2010).

Figura 3. Fases da cicatrização de feridas cutâneas



Fonte: traduzido de PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD, 2005

1.3.1. Fase de Hemostasia

Para evitar a perda de sangue, os vasos sanguíneos se contraem segundos após o ferimento, estimulados pela norepinefrina e pela serotonina, secretadas pelas plaquetas e mastócitos, enquanto a cascata plaquetária e do complemento são ativadas. Juntos, esses eventos são responsáveis pela formação de um coágulo hemostático, composto principalmente de fibrina, fibronectina, vitronectina, trombospondina, eritrócitos e plaquetas. O coágulo é uma matriz dinâmica de proteínas e células que contribuem para a hemostase, serve como um escudo

protetor temporário para a ferida, além de ser um reservatório de citocinas e fatores de crescimento (BERGMEIER; HYNES, 2012; WANG, Y.; CARRIM; NI, 2015).

As plaquetas são uma das primeiras fontes de citocinas que medeiam a ativação de neutrófilos e a quimiotaxia. Uma vez presas na rede de fibrina, as plaquetas liberam grânulos que funcionam como um reservatório para proteínas biologicamente ativas como trombina, fator de crescimento tumoral (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Essas proteínas liberadas precocemente atuam como quimioatrativos para várias células inflamatórias, incluindo monócitos (GARRAUD; HOZZEIN; BADR, 2017; HONNEGOWDA *et al.*, 2015; PERIAYAH; HALIM; MAT SAAD, 2017).

A trombina é um importante e precoce mediador da coagulação, e desempenha um papel central na hemostasia após a lesão tecidual, convertendo o fibrinogênio plasmático solúvel em um coágulo de fibrina insolúvel, além de promover a agregação plaquetária. A trombina não só medeia a formação de coágulos, mas também desempenha um papel na inflamação. Os efeitos pró-inflamatórios da trombina incluem a estimulação da vasodilatação, edema, infiltração de monócitos, aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial e liberação de citocinas pró-inflamatórias (HOFFMAN, 2018).

1.3.2. Fase inflamatória

Após a hemostasia ser atingida em minutos, os sinais quimiotáticos liberados pela degranulação das plaquetas, bem como os subprodutos da proteólise da fibrina e outros componentes da matriz, recrutam neutrófilos e monócitos para o local da ferida. Os neutrófilos chegam minutos após a lesão e servem para limpar o fluxo inicial de bactérias contaminantes, além de ser uma fonte de citocinas pró-inflamatórias que servem como os primeiros sinais para ativar os fibroblastos e queratinócitos locais (SU; RICHMOND, 2015).

Os neutrófilos atuam em um importante papel de proteção do corpo ao produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) no local da ferida, que são essenciais para a proteção contra infecções (IBRAHIM *et al.*, 2018). Em condições fisiológicas, as EROs são subprodutos da fosforilação oxidativa mitocondrial, da oxidação de purinas pela xantina oxidase, do sistema oxidase dependente de NADPH, pela ativação de neutrófilos, e via do ácido araquidônico. A propriedade catalítica da xantina oxidase faz com que a atividade da histamina aumente gradativamente a permeabilidade vascular, além dos seus subprodutos oxidantes (peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila (OH⁻), ânion superóxido (O₂⁻)) danificarem as estruturas dérmicas (KECK *et al.*, 2009). O H₂O₂ é capaz de se difundir pela membrana plasmática e

alcançar os lisossomos, reagindo com o ferro e produzindo o radical O_2^- , que é mais potente, causando danos na membrana lisossomal e extravasamento do seu conteúdo, culminando em apoptose celular. No entanto, existe um equilíbrio entre EROs e sistemas antioxidantes das células tais como catalase, superóxido dismutase (SOD), glutatona e peroxidase. Nas feridas, esse equilíbrio pode ser afetado, e a progressão lesiva do estresse oxidativo, graças ao excesso de EROs, podem levar a feridas que não cicatrizam (GALICKA *et al.*, 2014; IBRAHIM *et al.*, 2018; SHUPP *et al.*, 2010).

Os macrófagos se acumulam no local da ferida vários dias após a lesão inicial e são essenciais para a cicatrização efetiva. Há muitos anos Leibovich e colaboradores já haviam demonstrado a importância dos macrófagos na cicatrização quando mostraram que camundongos com macrófagos não-funcionais exibiram retardo no reparo de feridas. Esta cicatrização retardada incluiu uma lenta reepitelização, diminuição da neovascularização e formação de um tecido de granulação defeituoso (LEIBOVICH; ROSS, 1975).

De fato, os macrófagos são células-chave para estruturar a transição da inflamação para a proliferação celular, pois atuam na digestão de microorganismos sobreviventes, remoção de neutrófilos mortos e debris celulares, degradação do tampão de fibrina e liberação de óxido nítrico (NO). Eles também liberam 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 e PDGF. Os fatores de crescimento desempenham múltiplos e importantes papéis no processo de reparo, como exemplo o PDGF, que estimula a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos na fase inicial da inflamação e também impulsiona a proliferação de fibroblastos na fase proliferativa (KOH; DIPIETRO, 2011b; RODRIGUES *et al.*, 2018).

O NO também exerce um importante papel na modulação de alguns eventos ligados ao reparo tecidual. É uma molécula de sinalização intercelular difusível produzida por uma reação de conversão de L-arginina em L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Três isoformas desta enzima são conhecidas, onde duas são constitutivamente expressas: endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) enquanto a última é induzida em processos inflamatórios (iNOS). A eNOS e iNOS podem ser, detectada e induzida, respectivamente, em queratinócitos, fibroblastos e capilares endoteliais. Os metabólitos estáveis do NO, o nitrito (NO $_2^-$) e nitrato (NO $_3^-$) estão relacionados à deposição de colágeno dentro da ferida. Além disso, apresenta diversas funções no decorrer da cicatrização como: mediação da vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e indução da permeabilidade vascular durante a fase inflamatória (KUTNER; FRIEDMAN, 2013; LUO; CHEN, 2005).

As citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α são produzidas pelos queratinócitos e células das glândulas sudoríparas mesmo na pele íntegra, sendo liberadas somente após a injúria tecidual. Assim, a liberação precoce de citocinas pró-inflamatórias pelos polimorfonucleares que invadem a ferida parecem ser de grande importância para a indução da expressão de fatores de crescimento (VEGF e KGF), que são essenciais para a cicatrização (KONDO; ISHIDA, 2010; KRZYSZCZYK *et al.*, 2018).

Uma das primeiras citocinas a ser liberada durante o processo inflamatório é o TNF- α , e esta medeia diversas alterações metabólicas como: ativação da cascata de coagulação, aumento na expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e também estímulo para a liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios, como os eicosanoides. A IL-6 é liberada posteriormente e tem a função de promover a maturação e ativação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T. Já a IL-1 é produzida pelos macrófagos, fibroblastos e células endoteliais ativadas durante a inflamação local (SERRA *et al.*, 2017).

De fato, a cicatrização é favorecida pela produção de citocinas pró-inflamatórias no local da lesão, que conduzem a inflamação a fim de reparar o tecido. No entanto, altas concentrações dessas citocinas podem causar instabilidade dinâmica, dificultando a evolução do processo. Para promover uma regulação na inflamação local, a IL-10 é liberada e exerce uma importante função de modular essa etapa, pois regula a infiltração de neutrófilos e monócitos para o local da lesão, além de inibir a síntese de IL-1, IL-6 e TNF- α , e também de quimiocinas, como proteínas inflamatórias para macrófagos 1- alfa (MIP-1 α) e proteínas quimiotáticas para monócitos 1 (MCP-1) (KOH; DIPIETRO, 2011b; SERRA *et al.*, 2017).

O fator de crescimento TGF- β tem um papel crucial e está envolvido em diversas fases da cicatrização, desde a sua liberação pelas plaquetas, neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e migração de queratinócitos. Assim como a IL-10, também modula a resposta inflamatória e promove a formação de um novo tecido que induz a proliferação de fibroblastos e sua diferenciação, migração de células endoteliais e angiogênese (PAKYARI *et al.*, 2013).

1.3.3. Fase proliferativa

Quando a lesão em curso cessou, a hemostasia foi alcançada, e uma resposta imune estabelecida com sucesso, a ferida aguda se desloca em direção à reparação tecidual. A fase proliferativa começa no terceiro dia após o ferimento e dura aproximadamente duas semanas. Os principais eventos desta etapa são caracterizados pela intensa atividade celular para recompor a barreira epitelial, além de promover a formação de uma nova matriz, fornecer

suprimento sanguíneo apropriado e reforçar o tecido que sofreu a injúria (GONZALEZ *et al.*, 2016; SINNO; PRAKASH, 2013).

Após 24 horas do momento da lesão, os queratinócitos já começam a se locomover a partir das bordas livres da ferida, sendo necessárias algumas modificações celulares para a migração, como o achatamento e alongamento celular, formações de filamento de actina e projeções de pseudópodes. Estes conseguem se movimentar devido aos seus receptores de superfície de integrina que interagem com a matriz extracelular provisória rica em fibrina e fibronectina. Uma única camada de queratinócitos segue em direção ao centro da ferida para reconstruir a membrana basal. Para promover a total reepitelização, os queratinócitos que já haviam migrado para o local começam a se diferenciar e se estratificar em camadas para recompor a barreira epidérmica. Durante a reepitelização, uma camada de exsudato presente na camada mais externa da ferida fornece umidade necessária para a produção de fatores essenciais para o reparo, além de proteger a ferida da desidratação e da infecção (GANTWERKER; HOM, 2011).

O novo tecido que substitui o coágulo formado na ferida é o tecido de granulação e este começa a se formar no espaço da ferida em aproximadamente quatro dias após a lesão, onde numerosos capilares se difundem no novo estroma adotando uma aparência granular. Os macrófagos permanecem no sítio da lesão após a inflamação e contribuem continuamente através da liberação de fatores de crescimento necessários para estimular a fibroplasia e angiogênese (GANTWERKER; HOM, 2011; RITTIE, 2016).

Além disso, os queratinócitos de ponta também têm a capacidade de dissolver a barreira de fibrina à frente deles para permitir a sua migração. A principal enzima fibrinolítica é a plasmina, que é derivada do plasminogênio, e pode ser ativada tanto pelo ativador do plasminogênio tipo tecidual (tPA) quanto pelo ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPA) (PASTAR *et al.*, 2014; SCHÄFER *et al.*, 1994). Ambos os ativadores e o receptor para uPA são regulados positivamente no queratinócito em migração. Além disso, vários membros da família das metaloproteinases de matriz (MMP) são também regulados pelos queratinócitos da extremidade da ferida. Mais especificamente, a MMP-9 pode clivar o colágeno tipo IV e VII e acredita-se que seja responsável pela liberação de queratinócitos da membrana basal (SALO *et al.*, 1994). Uma vez que a superfície da ferida tenha sido coberta por uma monocamada de queratinócitos, a migração epitelial cessa e uma nova epiderme estratificada com uma camada basal subjacente é restabelecida a partir das margens da ferida (KIRFEL; HERZOG, 2004).

Durante a fase de proliferação também ocorre intensa migração de fibroblastos e deposição de MEC recém-sintetizada para substituir a rede provisória de fibrina. A função dos

fibroblastos é produzir glicosaminoglicanos, proteoglicanos e colágeno, que vão compor o tecido de granulação. Os fibroblastos são fontes únicas de colágeno e fibronectina, proteínas constituintes do tecido conectivo da derme, e a síntese de colágeno adequada é fundamental para a cicatrização de feridas (MCDOUGALL *et al.*, 2006). É o colágeno que proporciona força e integridade ao tecido, e quando depositado de forma escassa, a cicatriz se torna frágil e a ferida pode ressurgir depois (CORSETTI *et al.*, 2010). A síntese de colágeno continua até a 6ª semana após a injúria, onde a expressão de colágeno é proporcional à força tensil do tecido. Além disso, a produção de NO nesta etapa é capaz de estimular a proliferação de queratinócitos e fibroblastos, além do seu papel crucial na angiogênese e na remodelação tecidual, através do incentivo na deposição de colágeno (KUTNER; FRIEDMAN, 2013)

No final da primeira semana após a lesão cutânea, acumula-se abundante MEC, que fornece suporte para a ferida e ainda permite a migração celular. Os fibroblastos então são convertidos em miofibroblastos, que iniciam a contração da ferida no intuito de aproximar as bordas da lesão (DARBY *et al.*, 2014).

1.3.4. Fase de remodelação

Sendo a fase final de cicatrização da ferida, a fase de remodelação é responsável pelo desenvolvimento de um novo epitélio e formação do tecido cicatricial, que pode durar até dois anos após a lesão. Nesta fase, a MEC começa a amadurecer e os feixes de colágeno aumentam de diâmetro e dão resistência à ferida. Além da deposição de colágeno, as fibras colágenas tornam-se mais organizadas, o que leva ao aumento da contração que inicialmente começou na fase inflamatória (GONZALEZ *et al.*, 2016).

Conforme a ferida amadurece, a densidade de fibroblastos e macrófagos é reduzida por apoptose. 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).

O ideal de um processo cicatricial são etapas que cumpram seu papel para a defesa do organismo contra agentes infecciosos e a formação rápida de um novo tecido. Diante disso, uma rápida hemostasia, inflamação adequada e não prolongada, proliferação celular, diferenciação e migração de células, angiogênese, reepitelização e remodelamento tecidual contemplam o que seria considerado ideal para a cicatrização de feridas. No entanto, prolongamentos e interrupções nos eventos fundamentais de cada fase podem atrasar ou ocasionar feridas crônicas que não cicatrizam. Diante disso se torna extremamente necessário

tratamentos efetivos e acompanhamento do paciente durante todo o processo de cicatrização, o que gera grande custo para o sistema de saúde.

1.4. Tratamentos atuais para cicatrização de feridas cutâneas

Existe um vasto número de tratamentos no mercado farmacêutico atual para a cicatrização de feridas e queimaduras, representando uma indústria multibilionária em todo o mundo. Entre as suas principais abordagens estão o desenvolvimento de curativos de diferentes tipos de materiais e objetivos específicos de tratamento, que dependem do tipo de ferida (MURRAY *et al.*, 2019). No entanto, permanecem questões sobre o quanto eles realmente facilitam o processo de cura, principalmente em feridas de difícil cicatrização (FRYKBERG; BANKS, 2015).

Alguns fatores são muito importantes quando se precisa escolher a melhor abordagem para o tratamento de feridas de um paciente. Entre esses fatores é importante considerar o estado de saúde geral do paciente, o tipo de ferida que será tratada e as propriedades específicas dos curativos selecionados. Um curativo ideal deve manter um ambiente úmido para a ferida, remover o excesso de exsudato, permitir a difusão de gases, proteger a ferida contra microorganismos, promover sua proteção mecânica, ser confortável, minimizar a dor e não ser alergênico (DABIRI; DAMSTETTER; PHILLIPS, 2016; RUTTER, 2017).

Os curativos disponíveis atualmente vão desde os mais simples, até os mais modernos, que em muitos casos, são de alto custo. Curativos mais simples para feridas convencionais, como ataduras, algodão e gazes, tem como objetivo absorver o exsudato das feridas e mantê-las secas prevenindo a invasão de bactérias no local. No entanto, as últimas décadas de estudos demonstraram que um ambiente úmido facilita o processo de cicatrização, pois permite que fatores de crescimento e vários tipos de células, incluindo células epiteliais, migrem e facilitem a contração da ferida (SOOD; GRANICK; TOMASELLI, 2014). Curativos mais modernos trazem na sua composição produtos com propriedades antibacterianas ou incorporam fatores de crescimento que podem facilitar a migração e proliferação celular e ajudar na deposição de MEC (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2016; MURRAY *et al.*, 2019).

Um outro campo bastante explorado são os de materiais matriciais e *Scaffolds* que fornecem base de suporte estrutural para a ferida e promovem a migração celular. Uma variedade de componentes diferentes para substitutos da pele estão sendo cada vez mais estudados, cada um com suas características físicas (tamanho de poro, elasticidade) e biológicas (adesão e migração celular), como colágenos, fibrina/fibronectina, quitosana, elastina, gelatina

e glicosaminoglicanos (DICKINSON; GERECHT, 2016; OJEH *et al.*, 2015; SALAMONE *et al.*, 2016). Além disso, a descelularização da pele alogênica ou xenogênica, a impressão 3D e modificações genéticas do leito da ferida oferecem novas perspectivas. No entanto, muitas dessas abordagens ainda precisam de estudos clínicos mais detalhados e não estão disponíveis, ou são de alto custo e inviáveis principalmente para o sistema público de saúde (SAVOJ I *et al.*, 2018; SORG *et al.*, 2017).

Independente do curativo a ser utilizado, o preparo meticuloso do leito da ferida, minimizando a carga bacteriana, o debridamento completo de tecido não viável, controle do edema, otimização do estado vascular, para permitir o suprimento ideal de nutrientes, e prevenção de trauma adicional, com redução do estresse mecânico, são pré-requisitos fundamentais para cicatrização bem sucedida de feridas (SORG *et al.*, 2017).

Alguns outros produtos utilizados são hidrogéis, espumas, hidrocolóides (carboximetilcelulose), alginato, celulose e filmes que são capazes de tratar feridas e queimaduras por causa da sua influência na resposta celular local (POWERS *et al.*, 2016). Além disso, alguns produtos naturais com propriedades emolientes, reepitelizadora, adstringente, antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante, são também utilizados pois são capazes de acelerar o processo de cicatrização (IBRAHIM *et al.*, 2018).

As pesquisas atuais na área de cicatrização buscam novas substâncias e o desenvolvimento de curativos e formas farmacêuticas mais eficientes e menos dispendiosas, que sejam biocompatíveis e biodegradáveis para fornecerem condições para a cicatrização de feridas e que melhorem a qualidade de vida dos pacientes acometidos (MOURA *et al.*, 2013).

1.5. Plantas medicinais: potencial fonte de medicamentos fitoterápicos cicatrizantes

Durante séculos, as plantas têm sido usadas na medicina tradicional e popular para o tratamento de diversas doenças. Na Índia, a medicina Ayurveda é praticada há mais de 5000 anos como um sistema de tratamento natural para prevenir e curar doenças, enquanto a medicina tradicional chinesa, que é usada em toda a Ásia Oriental, tem pelo menos 3000 anos e emprega várias espécies de plantas medicinais (GARODIA *et al.*, 2007).

O Brasil é um país com grande diversidade biológica, com aproximadamente 45,000 espécies de plantas que representam cerca de 20 a 22% da biodiversidade do planeta. Além disso é um país onde a exploração racional e sustentável de recursos naturais significa oportunidades de desenvolvimento em diversos setores da economia, como agricultura,

produção de defensivos agrícolas, bem como a indústria de cosméticos e medicamentos (DUTRA *et al.*, 2016; VALLI *et al.*, 2013).

Na área de produção de medicamentos, observa-se um grande interesse no aproveitamento de fontes naturais, particularmente no que se refere ao uso de plantas para fins terapêuticos. Consequentemente, a pesquisa, o desenvolvimento e a utilização de plantas medicinais e produtos fitoterápicos estão em alta expansão em todo o mundo (PAN *et al.*, 2013). De acordo com a Organização Mundial da Saúde estima-se que 80% da população mundial em desenvolvimento utilize medicamentos de origem vegetal e 25% das substâncias ativas são derivados químicos de plantas (AZIZ *et al.*, 2018).

Gradativamente, várias descobertas científicas e avanços tecnológicos na área da fitoterapia vêm ocorrendo nos últimos anos, e essas incorporam diferentes especialidades da pesquisa que vão desde a comprovação da segurança à eficácia e qualidade dos medicamentos produzidos a partir de plantas medicinais (PAN *et al.*, 2013). Grande parte das pesquisas com plantas medicinais são originadas de estudos etnofarmacológicos, que buscam o conhecimento tradicional sobre estas espécies, e que levam ao desenvolvimento de protótipos de fármacos convencionais e medicamentos fitoterápicos (SÜNTAR, 2020).

Na área de cicatrização de feridas, a utilização da fitoterapia não se difere, e as plantas com potencial cicatrizante são mencionadas desde a pré-história, quando eram utilizadas na forma de cataplasmas (emplastros naturais), com o intuito de estancar hemorragias e favorecer a cicatrização, sendo muitas dessas plantas ingeridas, para atuação em via sistêmica (PIRIZ *et al.*, 2014).

Aesculus hippocastanum (Castanha-da-Índia), *Anacardium occidentale* (Cajueiro), *Arctium lappa* (Bardana), *Calendula officinalis* (Calêndula), *Casaelpinia férrea* (Pau-ferro), *Casearia sylvestris* (Guaçatonga), entre outras nativas da nossa região como a *Aloe Vera* (Babosa) e o *Symphytum officinale* (Confrei), estão entre as plantas com destaque por sua atuação na cicatrização de feridas, segundo a lista proposta pela Rensis (PIRIZ *et al.*, 2014).

Medicamentos fitoterápicos são produtos derivados exclusivamente de matérias-primas ativas vegetais com eficácia e riscos sobre seu uso comprovados através de estudos científicos assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Além disso, não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais. Nas últimas décadas, o Brasil tem avançado na publicação de uma Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que visa garantir o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país, estando assim em concordância com o incentivo mundial em promover

ações voltadas à pesquisa e aplicação de produtos de origem vegetal (ANDRADE *et al.*, 2017). Tratamentos dermatológicos classificados como fitoterápicos, a base de babosa (creme e gel) e unha-de-gato (gel), foram incluídos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename) a partir de 2011 para o tratamento de feridas e queimaduras (BRASIL, 2017).

Um estudo de revisão da literatura compilou alguns trabalhos com plantas pertencentes ao Rennisus com potencial na cicatrização de feridas e evidenciou que as folhas de *Casearia sylvestris*, o rizoma de *Curcuma longa*, as flores de *Malva sylvestris* e de *Punica granatum* demonstraram eficácia na contração, neovascularização e reepitelização de queimaduras induzidas em ratos (MARMITT *et al.*, 2018). Há também um grande número de plantas com efeito anti-inflamatório evidenciados em estudos experimentais e clínicos, com foco na redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, permeabilidade vascular e migração tecidual que intensificam o dano tecidual (GHASEMIAN; OWLIA; OWLIA, 2016). Tratamentos que apresentam potencial antioxidante são também de grande interesse para o processo de reparo de feridas (HEIDARI *et al.*, 2018).

O valor medicinal dessas plantas reside em seus constituintes fitoquímicos bioativos que incluem metabólitos secundários como alcalóides, antraquinonas, flavonóides, taninos, terpenóides, saponinas e compostos fenólicos (EDEOGA; OKWU; MBAEBIE, 2005). Os medicamentos fitoterápicos usados no manejo de feridas envolvem desinfecção, desbridamento e até mesmo o fornecimento de um ambiente úmido que estimule os processos de cura natural (PEREIRA; BÁRTOLO, 2016). Além disso, agentes de cicatrização de feridas naturais são relevantes porque são facilmente metabolizados no corpo.

1.6. *Cassia fistula* Linn

O gênero *Cassia* (Leguminosae) é constituído por mais de 600 espécies incluindo arbustos, árvores e ervas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, incluindo a região semi-árida do Brasil (AGARKAR e JADGE, 1999). Cerca de 30 espécies já foram estudadas e relatadas como fontes ricas em derivados fenólicos, antracênicos e antraquinônicos, como *Cassia fistula* (GUPTA *et al.*, 1989; AGARKAR *et al.*, 1999; KUO *et al.*, 2002), *Cassia torosa* (KITANAKA *et al.*, 1990) e *Cassia sophera* (MALHOTRA e MISRA, 1982; JOSHI *et al.*, 1985).

A *Cassia fistula* Linn, também conhecida como cassia-imperial, cássia-fistula, canafistula, chuva-de-ouro, pertence à família Fabaceae. É uma árvore de médio porte, podendo atingir de 8 a 15 metros de altura, possui floração amarelada que ocorre nos períodos de

setembro a dezembro e produz vagens marrom-escuras (SANTOS; TEIXEIRA, 2001). Esta espécie é muito apreciada pela beleza de seus cachos de flores (**Figura 4**) que juntamente com suas folhas apresentam propriedade laxativa (SAMY e IGNACIMUTHU, 2000).

Figura 4. Flores de *Cassia Fistula* Linn



Fonte: foto tirada pela autora

Estudos de análise fitoquímica do extrato das flores de *Cassia fistula*, apresentaram positividade para diversos metabólitos secundários como: flavonoides, ácidos fixos, chalconas, auronas e quinonas (MENEZES, 2009). Outras partes da planta também apresentaram metabólitos e relevância farmacológica, como o extrato do caule e a presença de catequina, e sua atividade hipoglicêmica (DAISY, 2010), e o extrato do fruto e isolamento de isoflavona, biochanina com atividade leishmanicida (SARTORELLI, 2009). Essa espécie também já demonstrou ação antitumoral, antioxidante e antimicrobiana (GUPTA et al., 2000; SIDDHURAJU et al., 2002; MANONMANI et al., 2005; KUMAR et al., 2006).

Estudos anteriores mostraram que extratos e frações do caule, folhas e flores de *Cassia fistula* apresentaram atividade antibacteriana significativa contra *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus vulgares* e *Pseudomonas aeruginosa* (bactérias gram-negativas) e *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* (bactérias gram-positivas) (DURAI PANDIYAN, 2007). Esses dados ressaltam a importância dessa planta como um potencial antimicrobiano natural (SAMY e IGNACIMUTHU, 2000). As

folhas de *Cassia fistula* também já apresentaram atividade antirreumática, e o seu suco é popularmente utilizado em doenças cutâneas (BHAKTA., et al 1999).

No Nepal, *Cassia fistula* é uma espécie endêmica e a medicina tradicional local utiliza seu fruto para tratamento de reumatismo e inflamação. Devido a estas indicações, o extrato metanólico de seus frutos foi avaliado quanto à atividade inibitória de mediadores pró-inflamatórios, como os leucotrienos; também foi capaz de inibir a peroxidação de lipídios em cérebros bovinos, o que indicou sua atividade antioxidante (SUNIL e MULLER, 1998). *Cassia fistula* demonstrou atividade inibitória de proteases associada à atividade antifúngica e repelente de insetos (GUPTA et al., 2000).

O extrato padronizado dos frutos de *Cassia fistula* já é comercializado em associação com outras espécies e utilizado como medicamento fitoterápico (Tamarine®) por sua ação laxativa. Esse medicamento é padronizado de acordo com o teor do seu marcador químico, o ácido trans-cinâmico, o que traz a garantia da sua qualidade e eficácia terapêutica.

Segundo Limtrakul e colaboradores (2016) os principais marcadores químicos do extrato das flores de *C. fistula* são compostos fenólicos: ácido protocatequínico, ácido vanílico, ácido clorogênico e ácido ferúlico. De acordo com esses autores, o extrato padronizado das flores apresentou atividade antienvhecimento que pode estar associada à atividade antioxidante dos seus marcadores químicos. Para comprovar essa atividade, foi demonstrado o efeito do extrato sobre a produção de colágeno, ácido hialurônico e melanina. Além disso, o pré-tratamento com o extrato aumentou a umidade da pele e a homeostase da melanina, sendo capaz de reduzir a hiperpigmentação, induzindo o clareamento. Diante disso, o extrato das flores se tornou um alvo interessante para a indústria cosmética.

Outros autores demonstraram que o extrato das folhas de *Cassia 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, et al., 2006). Outro estudo também demonstrou a capacidade do extrato metanólico das folhas de *C. fistula* quanto à sua propriedade de cicatrização de feridas escisionais e incisionais. A pomada produzida a partir do extrato da folhas (5% e 10% p/p) respondeu significativamente em ambos os modelos de feridas testadas. Os resultados também foram comparáveis aos do fármaco padrão, nitrofurazona em termos de capacidade de contração da ferida, período de epitelização, resistência à tração e regeneração tecidual (BHAKTA, et al., 1998).

2. JUSTIFICATIVA

As feridas são injúrias dermatológicas que quando não tratadas adequadamente são responsáveis por lesões maiores e/ou perda de função da região acometida. O tratamento de feridas continua sendo um desafio na prática clínica, pois são bastante frequentes e apresentam riscos de complicações tardias que aumentam a morbidade e mortalidade dos pacientes. Portanto, muitos esforços têm sido aplicados para o melhor entendimento do mecanismo fisiológico da cicatrização bem como das interferências que ocorrem durante este processo, além da descoberta de novos protótipos e medicamentos que possam aprimorar o tratamento de pacientes com lesões de pele.

A necessidade de avaliação científica de plantas medicinais ganha importância visto o impacto que as mesmas têm na medicina tradicional e para a indústria farmacêutica. O uso destas plantas é principalmente compartilhado pelo conhecimento popular, o que se torna um aliado na investigação de novos compostos com potencial farmacológico. A utilização de plantas medicinais como prevenção e/ou tratamento de doenças é bastante recorrente e nesse contexto, é crescente a pesquisa por extratos ou moléculas purificadas oriundas de plantas que possam ser utilizadas como fitoterápicos ou fitofármacos.

Desse modo, sabendo-se que *Cassia fistula* L. é uma planta comumente encontrada em regiões tropicais, inclusive no Nordeste do Brasil, possui grande uso na medicina popular, para diversos fins terapêuticos, e diversas propriedades farmacológicas comprovadas, pesquisas com essa espécie são promissoras.

As pesquisas com o extrato padronizado desta planta ainda são escassas, principalmente em relação ao estudo das suas flores. Em estudos anteriores, evidenciou-se que o extrato das folhas desta planta apresentou atividade antimicrobiana e foi capaz de acelerar a cicatrização de feridas cutâneas infectadas. Já o extrato das flores apresentou atividade antioxidante, antimicrobiana e capacidade de aumento da produção de colágeno, demonstrando assim que as flores desta espécie são ótimo alvo para investigação de um novo medicamento para a cicatrização de feridas cutâneas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Produzir e avaliar o efeito cicatrizante do extrato etanólico das flores de *Cassia fistula* Linn. (ECFF) em fibroblastos, macrófagos e queratinócitos *in vitro* e em modelo de feridas excisionais em camundongos.

3.2. Objetivos Específicos

- Padronizar a obtenção da droga vegetal a partir das flores de *Cassia fistula* Linn.;
- Produzir e caracterizar ECFF por análise fitoquímica e cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a espectrometria de massas;
- Analisar o efeito de ECFF sobre a viabilidade celular de macrófagos murinos (RAW 267.4), fibroblastos murinos (L929) e queratinócitos humanos (HaCaT);
- Estimar a atividade antioxidante de ECFF pelo método do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila);
- Explorar o efeito de ECFF sobre a viabilidade de fibroblastos após estresse celular induzido por peróxido de hidrogênio;
- Determinar os níveis dos fatores de crescimento TGF- β e VEGF em cultura de fibroblastos murinos tratados com ECFF;
- Determinar os níveis de nitrito, TNF- α , IL-1 β , IL-10 e TGF- β em macrófagos tratados com ECFF e estimulados com LPS;
- Avaliar a viabilidade de queratinócitos tratados com o sobrenadante de fibroblastos tratados com ECFF;
- Analisar o efeito de ECFF sobre a proliferação e migração celular de queratinócitos em modelo de cicatrização *in vitro* e a expressão de E-caderina por citometria de fluxo;
- Avaliar o efeito do tratamento tópico do creme contendo ECFF (CrECFF) sobre a contração e aspectos histológicos de feridas excisionais em camundongos;
- Determinar os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-10, TGF- β e VEGF em feridas excisionais tratadas com CrECFF;
- Determinar a expressão de TNF- α em cortes histológicos de feridas excisionais tratadas com CrECFF por imunohistoquímica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparação e caracterização do extrato das flores de *Cassia fistulam* Linn. (ECFF)

4.1.1. Material botânico

As flores de *Cassia fistula* Linn. (Fabaceae) foram coletadas na cidade de Fortaleza - Ceará (3°43'34.0"S, 38°32'25.5"W, -3.726097, -38.540420) entre setembro e dezembro de 2016, no período da manhã. O material botânico foi coletado pela autora, e uma exsicata foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, na Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o número 58434.

4.1.2. Padronização do teor de umidade da droga vegetal e método de obtenção do extrato de *Cassia fistula* Linn. (ECFF)

A padronização da secagem do material vegetal, obtenção do extrato das flores de *Cassia fistula* Linn., bem como a caracterização fitoquímica foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia da Unifametro e no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Ceará.

Para a produção da droga vegetal, as flores de *Cassia fistula* foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar (Q314M, Quimis) sob temperatura controlada de $40 \pm 5^\circ\text{C}$ em tempos variáveis (24, 48 e 72h). A seleção da condição ideal de secagem da droga vegetal foi feita através do método gravimétrico, pelo monitoramento dos teores de umidade em balança de infravermelho (ID50, Marte) (BORGES *et al.*, 2005), até que a umidade estivesse na faixa entre 8 e 14%, porcentagem limite para que não haja contaminação microbológica, de acordo com as especificações da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).

Após o processo de secagem, foi realizada a cominuição do material vegetal em moinho de facas (MA 048, Marconi) e realizado o processo de extração. O método de extração selecionado para a produção de ECFF foi o método de Soxhlet. Neste método, a droga vegetal foi transferida para um cartucho de celulose, previamente tarado e seco. Foi introduzido no balão de rolha esmerilhada cerca de 150 mL de solução de álcool etílico absoluto (99,3° GL). A extração foi feita a cada 6 horas, onde o cartucho com droga vegetal foi trocado até a obtenção de um extrato a 20% p/v. Além disso, foi feita a adição de mais solvente se houvesse redução do volume de extrato (BRASIL, 2010).

4.1.3. Determinação do teor de resíduo seco de ECFF

Para a determinação da concentração final de ECFF, foi mensurado o teor de resíduo seco do extrato de acordo com metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010). Em uma placa de Petri previamente tarada, foi adicionado 1 mL de ECFF e a placa foi levada para estufa em uma temperatura entre 100 - 105 °C, por 5 horas. Após esfriar em dessecador, foi pesada e o procedimento foi repetido até peso constante a cada 1 hora. O teor de resíduo seco foi expresso em relação a 100 mL do extrato, ou seja, em % (p/v), pela média de três determinações. Além disso, o experimento foi realizado em triplicata.

4.1.4. Análise fitoquímica de ECFF

Para identificação dos grupos de metabolitos secundários presentes em ECFF foram realizadas reações químicas baseadas em precipitação e coloração conforme descrito por MATOS (2009). Foi investigada a presença de alcaloides (reagente Dragendorff, Mayer e Bertrand), flavonoides (teste de cianidina ou shinoda), taninos (cloreto férrico a 1%, acetato de cobre a 4%, dicromato de potássio a 5% e acetato de chumbo a 10%), saponinas (índice de espuma), cumarinas (cromatografia em camada delgada, presença de fluorescência azul-esverdeada) e antraquinonas (reação de Bortraeger).

4.1.5. Análise quantitativa do teor de fenóis e flavonoides totais em ECFF

A concentração de fenóis totais em ECFF foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como droga padrão. O reagente de Folin-Ciocalteu é composto por uma solução de íons poliméricos complexos formados a partir dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, que são capazes de oxidar fenolatos e, com sua redução, formar complexos de cor azul (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Para a realização do método, alíquotas (100 µL) de ECFF foram transferidas para um balão volumétrico de 10 mL, adicionados 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N e, em seguida, a solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃, 20%, 1,25 mL). Decorridos 40 min à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (AJX-1600, Micronal) a 715 nm. O teor de fenóis totais foi determinado pela interpolação da absorbância da amostra contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (1 - 16 µg/mL) e os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g da amostra (PRIYADHARSHINI; SUJATHA, 2012).

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada segundo o método descrito por Woisky & Salatino (1998). Alíquotas (500 µL) de ECFF foram adicionadas a um volume

igual de solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3 , 5%). Após repouso de 15 minutos ao abrigo de luz, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 420nm. O conteúdo de flavonoides totais foi determinado usando uma curva padrão de quercetina (0 - 300 $\mu\text{g/mL}$). A partir da equação da reta obtida, realizou-se o cálculo do teor de flavonoides totais, sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de quercetina (EQ)/g da amostra (WOISKY; SALATINO, 1998).

4.1.6. Análise e caracterização de ECFF por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-ESI-QTOF MS/MS)

As análises cromatográficas de ECFF foram realizadas em um sistema Acquity UPLC (Waters®), acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo (QToF, Waters®) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA sob supervisão do Dr. Kirley Marques Canuto. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters® Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 μm), temperatura fixa de 40°C, fases móveis água com 0,1% de ácido formico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido formico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), fluxo de 0,4 mL / min e volume de injeção de 5 μL .

Os espectros de massa de alta resolução (XEVO-QToF) no modo ESI⁻ foram adquiridos na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120°C, temperatura de dessolvatação 350°C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. O modo ESI⁺ os espectros foram adquiridos na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120°C, temperatura de dessolvatação 350°C, fluxo do gás de dessolvatação de 500 L/h e voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MS^E. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

4.2. Avaliação farmacológica *in vitro*

4.2.1. Preparo de ECFF para ensaios *in vitro*

Para avaliação dos efeitos farmacológicos de ECFF nos experimentos *in vitro*, após a determinação da concentração do extrato, este foi diluído em água destilada para a obtenção de diferentes concentrações e posterior tratamento. Para a garantia de esterilidade e estabilidade, o extrato foi filtrado em membrana de 0,22 μm (Millipore®) e armazenado em alíquotas de 500 μL sob refrigeração -20°C até o momento da realização dos experimentos. Foram realizadas

as análises de ECFF nas concentrações finais que variaram de 7,8 a 500 µg/mL (droga-teste) e água (veículo, controle).

4.2.2. *Atividade antioxidante pelo método de DPPH*

O radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) é considerado um radical livre estável, no entanto, falta um elétron em sua estrutura. Este radical é utilizado como ferramenta para estudo da ação de compostos sequestradores de radicais livres, e com atividade antioxidante. Descrita por Saint-Cricq e colaboradores (1999), essa técnica utiliza o radical e é independente de qualquer atividade enzimática, além de ser sensível o suficiente para detectar ingredientes ativos em baixas concentrações (BALEKAR *et al.*, 2012). Uma substância ao doar um elétron para o DPPH faz com que este se torne mais estável, mude de cor, permitindo o monitoramento da reação por espectrofotômetro (OLIVEIRA, 2015; SAINT-CRICQ DE GAULEJAC; PROVOST; VIVAS, 1999).

Em uma placa de 96 poços, foi adicionado 292 µL da solução de DPPH (0,3 mM, SIGMA®) dissolvida em metanol:etanol (1:1), 8 µL de ECFF (7,8 -500 µg/mL) e a placa foi protegida da luz e levemente agitada em mixer por 30 minutos. Ao final, a absorbância (Abs) foi determinada em comprimento de onda de 517 nm, pela leitora de microplacas (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC). A vitamina E (50 µg/mL; SIGMA®) foi utilizada como controle positivo, e somente a solução de DPPH como controle negativo (MOLYNEUX, 2004).

A eficiência antioxidante (percentual de inibição do DPPH) foi mensurada e determinada pela fórmula abaixo:

$$\text{Inibição DPPH (\%)} = (|Abs amostra|) \div (|Abs média | grupo DPPH) \times 100$$

4.2.3. *Cultivo celular*

Esse estudo inicialmente objetivou investigar o efeito de ECFF em linhagens celulares importantes e essenciais para o processo de cicatrização de feridas cutâneas: macrófagos, fibroblastos e queratinócitos, com foco nos mediadores liberados e resposta celular na fase inflamatória e proliferativa, que correspondem às etapas cruciais para a contração da ferida e resolução do processo.

Os fibroblastos murinos da linhagem L929 (ATCC® clone 929) foram adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro, e os queratinócitos humanos da linhagem HaCaT (CLS®) foram cedidos pela Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro, do Laboratório de

Farmacogenética (Departamento de Fisiologia e Farmacologia/UFC), presente no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM/UFC).

As linhagens foram manipuladas em bancada de fluxo laminar vertical (MiniV/PCR, Telstar®) no Laboratório de Farmacologia e Bioquímica (Departamento de Fisiologia e Farmacologia/UFC/NPDM), e cultivadas em garrafas para cultivo celular estéreis (75 cm², volume de 250 mL) em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB)(Gibco®) e 1% de antibiótico (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina -Gibco®) em incubadora a 37°C (Panasonic®, modelo MCO 19AICUVH), com atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂. O crescimento das linhagens foi acompanhado com auxílio de microscópio invertido de contraste de fase (LABOMED, modelo TCM 400). A manutenção das garrafas foi realizada 2 - 3x por semana, sendo as células removidas com tripsina em EDTA 0,05% (Gibco®) quando atingida a confluência de 80 – 90 % de ocupação. Quando necessário uma ampola armazenada em nitrogênio líquido foi descongelada para um novo cultivo.

O cultivo e os ensaios com macrófagos murinos (RAW 264.7) foram realizados no Laboratório de Bioprospecção de Biotecnologia Marinha (Departamento de Fisiologia e Farmacologia/UFC/NPDM), sob supervisão do Prof. Dr. Diego Wilke. A execução do projeto de pesquisa foi aprovada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança CTNBio N° 6365/19), autorizando a manipulação de Organismo Geneticamente Modificado da classe de risco 2 (OGM NB2).

Diferente das outras linhagens, os macrófagos RAW 264.7 foram manipulados em câmara de fluxo laminar vertical com nível de biossegurança II (ESCO, modelo Airstream classe II-B2), e mantidos em incubadora a 37°C com atmosfera contendo 95% de ar e 5% de CO₂ (SANYO®, modelo MCO-19AIC). Toda a manipulação e descarte de resíduos do cultivo, e experimentação dessa linhagem, seguiu os padrões técnicos estabelecidos para manipulação de OGM NB2.

É importante ressaltar, que para a realização dos ensaios com os fibroblastos murinos (L929), 24hs antes dos experimentos as células foram transferidas para meio DMEM com SFB a 2,5%. Resultados anteriores obtidos por nosso grupo de pesquisa (SOUZA, 2019), demonstraram que estas células possuem intensa atividade mitótica e que a presença de SFB e seus diversos fatores de crescimento induziram ainda mais esta proliferação celular, e que esta poderia mascarar os possíveis efeitos da substância testada. Dessa forma, a concentração de 2,5% de SFB foi a mínima capaz de estimular o crescimento das células após 72hs, e escolhida

para a realização dos experimentos com esta linhagem. Para as linhagens de queratinócitos (HaCaT) e macrófagos (RAW 264.7) foram mantidas as condições de DMEM com SFB a 10%.

Todos os ensaios com células foram realizados em três experimentos independentes e no mínimo quadruplicata por ensaio para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

4.2.4. Testes de citotoxicidade celular

Para a determinação da viabilidade das células que seriam utilizadas nos protocolos experimentais, alíquotas de cada linhagem celular tiveram a adição do corante azul de tripan 0,4% antes dos testes. O corante azul de tripan permite a visualização de células viáveis, não coradas, e células inviáveis, que ficam coradas em azul. Para os ensaios de citotoxicidade, as células foram dispostas em placas de 96 poços em uma densidade de $2,0 \times 10^4$ cel/mL (fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT) ou $1,5 \times 10^5$ cel/mL (macrófagos RAW 264.7) e após 24h, quando aderidas à placa, foram tratadas com ECFF (62,5 – 250 μ g/mL) ou veículo (água, controle).

O teste de citotoxicidade em macrófagos murinos (RAW 264.7) foi realizado após 24h de incubação com ECFF, enquanto as linhagens de fibroblastos murinos (L929) e queratinócitos humanos (HaCaT) também foram acompanhadas por 48 e 72h de incubação com ECFF, para explorar não só a viabilidade mas também a possível proliferação celular. Para os experimentos foram utilizadas garrafas com células acima de 90% de viabilidade.

4.2.4.1. Método do MTT

O princípio deste método se baseia na capacidade da mitocôndria de células viáveis de reduzirem o sal de tetrazólio (MTT) de cor amarela, no sal de formazan, que possui cor púrpura. O formazan é um pigmento insolúvel que, quando extraído das células, pode ser quantificado espectrofotometricamente. A redução do MTT é catalisada pelo sistema enzimático succinato-tetrazol redutase, presente na membrana mitocondrial, de forma que a atividade dessa enzima reflete a funcionalidade metabólica das mitocôndrias e a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Após 24h do plaqueamento das linhagens, as células foram tratadas com ECFF (62,5 – 250 μ g/mL), ou veículo (água, controle) e mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂. Após o tempo pré-estabelecido de incubação (24, 48 ou 72hs), as células foram tratadas com 20 μ L de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (5 mg/mL) e incubadas a 37°C durante 3h. Em seguida, o meio contendo MTT foi removido, foi adicionado 150 μ L de

dimetilsulfóxido (DMSO) e a placa foi homogeneizada por 5 min. A absorbância foi determinada por um leitor de microplacas (Elisa Asys Expert Plus) a um comprimento de onda de 540 nm. Foram realizados três experimentos independentes para a obtenção do resultado final (n=8/grupo/experimento). As absorbâncias foram analisadas e utilizadas para a obtenção dos percentuais de viabilidade celular utilizando a média do grupo controle. Os resultados foram expressos como percentual de viabilidade celular de acordo com a média e erro padrão da média.

$$Viabilidade(\%) = (|Abs|amostra \times 100) \div (|Abs\ média|grupo\ controle)$$

4.2.4.2. Método da Sulforodamina B

O ensaio da sulforodamina B (SRB) foi utilizado nas três linhagens celulares para avaliar os possíveis efeitos de ECFE sobre a citotoxicidade e indução de proliferação celular. Este método é mais apropriado para estudo de cinética do crescimento quando comparado ao método do MTT por ter maior sensibilidade e melhor linearidade em relação ao número de células (KEEPERS *et al.*, 2003). O corante SRB liga-se a aminoácidos básicos proteicos presentes nas células, configurando um método colorimétrico de ponto final, que determina a quantidade de células viáveis através de uma estimativa da massa de proteína total (PAPAZISIS *et al.*, 1997).

Após o tempo de incubação das células com ECFE (24, 48 ou 72h) o meio de cultivo da placa foi removido e as células foram fixadas com 100µL de ácido tricloroacético 10% (p/v), por no mínimo 1h a 4°C, em seguida coradas com 100µL de SRB 0,4% ((p/v) em ácido acético 1%) e mantida em incubadora com 5% CO₂ a 37°C por 30 min. As placas foram lavadas com ácido acético 1% para a remoção do excesso de corante, e então adicionados 200 µL de solução de leitura tampão Tris-base (10 mM) e homogeneizado por 10 minutos. A absorbância da placa foi lida em leitora de microplacas (Multiskan FC – Thermo Scientific®) no comprimento de onda de 570 nm (HOUGHTON *et al.*, 2007). Os resultados foram expressos como percentual de viabilidade celular, determinado através da fórmula:

$$Viabilidade(\%) = (Abs\ amostra \times 100) \div (|Abs\ média|controle)$$

4.2.5. Protocolos experimentais em fibroblastos murinos (L929)

4.2.5.1. Estresse oxidativo induzido por H₂O₂

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) que induz numerosos eventos celulares, incluindo senescência celular e respostas inflamatórias (HAHN *et al.*, 2017). O estresse celular induzido por H₂O₂ produz danos em moléculas biológicas, e estes estão envolvidos no desenvolvimento de várias doenças do tecido conjuntivo e envelhecimento da pele. Estudos mostram que quando fibroblastos humanos dérmicos normais são expostos ao H₂O₂, a produção excessiva de EROs interrompe mecanismos de defesa antioxidante e induz a resposta inflamatória. Dessa forma, substâncias capazes de conter a produção de EROs podem reduzir tais danos celulares e auxiliar no tratamento de doenças que estão relacionadas à liberação desses radicais (GALICKA *et al.*, 2014; HAHN *et al.*, 2017). Portanto, realizou-se o teste de proteção dos fibroblastos contra o estresse oxidativo induzido por H₂O₂ após o tratamento com ECFF.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (2 x 10⁴ cel/mL) em DMEM 2,5% SFB e após 24h incubadas com concentrações (0,125; 0,250; 0,500; 0,650; 0,750; 0,850; 0,900; 1,000 mM) de H₂O₂ (30% (p/p), SIGMA®) por 24h em incubadora a 5% CO₂ e 37°C. O ensaio de SRB inicialmente foi realizado para a escolha da concentração de H₂O₂ que induzisse o estresse oxidativo, reduzindo a viabilidade celular em 80%. Para o experimento, as células foram novamente plaqueadas e mantidas nas mesmas condições, e após 24h, tratadas com ECFF (62,5 – 250µg/mL) ou veículo (água, controle), onde ficaram incubadas com a droga-teste por 1h ou 24h e por mais 24h com H₂O₂. Ao final do experimento, a viabilidade (%) foi mensurada pelo ensaio de SRB (SUDSAI; WATTANAPIROMSAKUL; TEWTRAKUL, 2016).

4.2.5.2. Dosagem de fatores de crescimento TGF-β e VEGF

O sobrenadante da cultura de fibroblastos L929 tratados com ECFF (62,5 – 250µg/mL) ou veículo (água, controle), também foi utilizado para a dosagem dos fatores de crescimento TGF-β e VEGF. Para estes experimentos as células foram plaqueadas nas mesmas condições dos experimentos anteriores e incubadas com ECFF por 48hs. Após este período os sobrenadantes foram coletados e feita a dosagem dos fatores de crescimento TGF- β e VEGF por ELISA (SUN *et al.*, 2017).

Para realizar a detecção dos fatores de crescimento, placas de 96 poços com superfície de alta ligação foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpos murinos de captura: anti-TGF-β e anti-VEGF (kits da R&D systems) por 12h a 4°C. Posteriormente, as ligações foram bloqueadas com BSA 1% (em PBS) e o sobrenadante proveniente do cultivo celular foram

incluídos nos poços e incubados por mais 2 h a 4°C. Para a dosagem de TGF- β , fez-se necessária uma etapa de ativação deste fator nas amostras antes da incubação com a placa sensibilizada. As amostras foram acidificadas com 20 μ L de ácido clorídrico (HCl) 1 N por 20 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente neutralizadas pela adição de 20 μ L de solução alcalina 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES pH 7,4.

Após cada etapa de incubação, as placas foram lavadas três vezes com uma solução tamponada de PBS/Tween 20 (0,05%). Os anticorpos murinos de detecção foram adicionados às placas e incubados por 2h. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e adicionado 100 μ L do complexo diluído (1:40) de HRP-streptavidina sendo as placas protegidas da luz a partir desta etapa. Após 20 minutos, foi acrescentado o substrato para a enzima e as placas ficaram incubadas à 25°C por mais 20 minutos. Para interromper a reação enzimática e realizar a leitura, 50 μ L da solução contendo ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄) foi adicionada.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de sobrenadante, sendo a concentração das amostras obtidas a partir de uma curva padrão de cada citocina com 8 concentrações diferentes, partindo de uma diluição seriada. As concentrações iniciais para VEGF foram de 1000 pg/mL, e para TGF- β foram 2000 pg/mL. 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.

4.2.6. Protocolos experimentais em macrófagos murinos (RAW 264.7)

Durante a cicatrização de feridas, os macrófagos produzem muitas citocinas e mediadores, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO, bem como quimiocinas (KOH; DIPIETRO, 2011a; MINUTTI *et al.*, 2017). No entanto, a liberação excessiva e a exposição a longo prazo a esses mediadores pró-inflamatórios podem causar feridas crônicas e úlceras venosas (SINDRILARU *et al.*, 2011). Diante disso, foi investigado o papel de ECFF na modulação da resposta inflamatória induzida por macrófagos ativados por lipopolissacarídeo S (LPS, SIGMA®), endotoxina liberada a partir da bactéria *E. coli*, e utilizada para estimular o processo inflamatório nas células.

4.2.6.1. *Protocolo de ativação de RAW 264.7 com LPS*

As células RAW 264.7 foram plaqueadas na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL em placas de 96 poços e incubadas *overnight* em incubadora com atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C. As células foram tratadas com ECFE (62,5 – 250 µg/mL) ou veículo (água, controle) e após 1h metade da placa foi desafiada com LPS 100 ng/mL, em PBS estéril, pH 7,4 (SIGMA®) (YANG *et al.*, 2017). Após o período de 24h de incubação, 50 µL do sobrenadante foi coletado para a determinação dos níveis de nitrito, e 150 µL do sobrenadante foi utilizado para a dosagem de mediadores inflamatórios por ELISA. As células foram fixadas na placa com TCA 10% para o ensaio de viabilidade celular por SRB.

4.2.6.2. *Dosagem de nitrito no sobrenadante produzido por macrófagos*

Para a dosagem dos níveis de nitrito (NO₂⁻), 50 µL do sobrenadante coletado após tratamento dos macrófagos com ECFE, foi adicionado a 50 µL do reagente de Griess (Sulfanilamida 1% em ácido acético 30% / N-(1-naftil)-etilendodiamina 0,1% em ácido acético 60%). A reação ocorreu por 10 minutos, a 25°C, ao abrigo de luz e a leitura foi realizada em leitora de microplacas em comprimento de onda de 540 nm. A concentração de nitrito (µM) no sobrenadante foi determinada a partir de uma curva-padrão realizada, utilizando solução de nitrito de sódio (NaNO₂), em diluição seriada a partir da concentração inicial de 200 µM. Os resultados foram expressos em µM de nitrito (YANG *et al.*, 2017).

4.2.6.3. *Dosagem de mediadores inflamatórios TNF-α, IL-1β, IL-10 e TGF-β*

O sobrenadante da cultura de macrófagos tratados com ECFE e estimulados com LPS foi congelado a -70° para a posterior dosagem de mediadores inflamatórios: TNF-α, IL-1β, IL-10 e TGF-β pelo método de ELISA (SUN *et al.*, 2017). O método de detecção foi descrito anteriormente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de sobrenadante, 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 que as concentrações iniciais de 2000 pg/mL foram usadas para TNF-α, IL-10 e TGF-β e 1000 pg/mL para IL-1 β.

4.2.7. Protocolos experimentais em queratinócitos humanos (HaCaT)

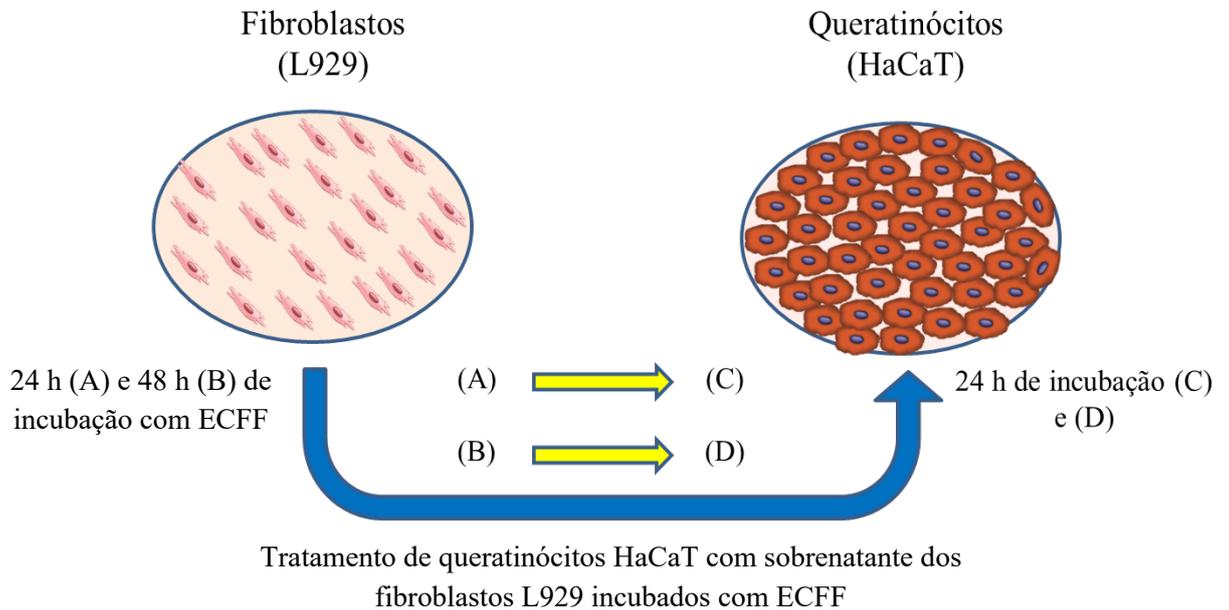
4.2.7.1. Coloração de queratinócitos por Panótipo Rápido

Com o intuito de marcar as células e dar uma estimativa de proliferação celular foi utilizado neste protocolo o kit de corantes Panótipo Rápido LB, que é bastante utilizado na hematologia para coloração de leucócitos em esfregaço sanguíneo. Este tipo de coloração permite visualizar a densidade celular de queratinócitos pois faz a diferenciação de coloração do citoplasma e do núcleo. Assim, as células foram plaqueadas na concentração de 5×10^4 cel/mL em placas de 24 poços e mantidas em incubadora com 5% CO₂ a 37°C por 24h. O tratamento foi realizado após esse período com ECFE (62,5 e 125µg/mL) ou veículo (água, controle) e após o período de incubação de 48h as células foram fixadas com a solução de triarilmetano a 0,1%, coradas com a solução de xantenos a 0,1% e com a solução de tiazinas a 0,1% por até 30 segundos cada etapa (Panótico – Laborclin®). A placa foi lavada com água destilada para remoção do excesso de corantes. Após a secagem, a placa foi levada ao microscópio óptico invertido (LABOMED, modelo TCM 400) e fotografias foram tiradas (40 e 200x) para a observação das células.

4.2.7.2. Tratamento de queratinócitos com sobrenadante de fibroblastos

As células que participam do processo de cicatrização liberam diversos mediadores químicos que auxiliam na proliferação e funções de outros grupos celulares e na formação do novo tecido (LANDÉN; LI; STÅHLE, 2016). Diante disso, com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos dos mediadores liberados pelos fibroblastos na proliferação de queratinócitos, foi realizado este protocolo experimental. Os fibroblastos murinos foram plaqueados em placa de 96 poços com densidade de 2×10^4 cel/mL, e mantidos em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C por 24h. O tratamento com ECFE (62,5 – 250µg/mL) ou veículo (água, controle) foi realizado, e após 24 h (A) e 48 h (B) o sobrenadante foi removido e transferido para outras placas (C) e (D), respectivamente (**Figura 5**). De forma simultânea, os queratinócitos foram plaqueados nas mesmas condições dos fibroblastos. Após 24 h, o meio de cultivo dos queratinócitos foi removido e adicionado o sobrenadante obtido dos fibroblastos após 24 h (A) e 48h (B) de incubação com ECFE. A viabilidade dos queratinócitos foi avaliada pelo método SRB após 24h de incubação com o sobrenadante (C) e (D).

Figura 5 – Esquema ilustrativo sobre tratamento de queratinócitos com o sobrenadante de fibroblastos

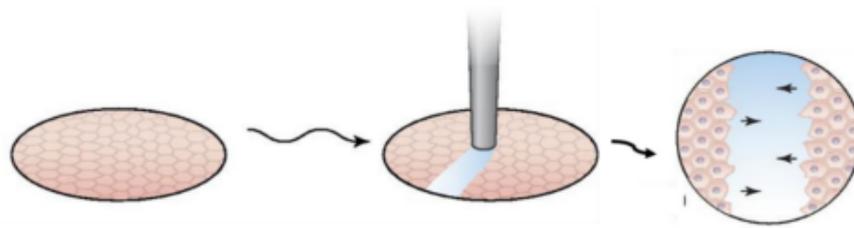


Fonte: SOUZA, 2019 modificado

4.2.7.3. Ensaio de cicatrização *in vitro*

Numerosos modelos foram desenvolvidos para estudar o reparo de feridas em humanos, que visam identificar os principais mecanismos subjacentes e fornecer uma melhor compreensão do processo de cicatrização. Estes incluem modelos *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (UD-DIN; BAYAT, 2017). Dentre os ensaios de cicatrização *in vitro*, os modelos de monocamada, como o *Scratch*, são menos dispendiosos que os demais, mais simples e fornecem resultados mais rápidos (SAMI; HEIBA; ABDELLATIF, 2018; WIEGAND; HIPLER, 2008). Após o ensaio de viabilidade celular as melhores concentrações de ECFE foram utilizadas no ensaio de cicatrização *in vitro*, que simula um ambiente de lesão epitelial, onde ocorre a ruptura da continuidade da camada de queratinócitos que proliferam e migram para ocupar novamente o espaço vazio produzido pelo “arranhão” ou *Scratch* (Figura 6).

Figura 6 – Esquema ilustrativo do ensaio de cicatrização *in vitro* - *Scratch*



Fonte: TONIN, 2016

Os queratinócitos HaCaT foram retirados da garrafa de cultivo com incubação de tripsina 0,1% por 20 min e dispersos em DMEM 10% SFB em placa de 24 poços com densidade de 5×10^4 cel/mL, e mantidos em incubadora por 48h para a formação de uma monocamada de células. Um arranhão (*Scratch*) foi feito no centro de cada poço, no sentido vertical com uma ponteira de 200 μ L, sendo as células desagregadas removidas e lavadas com PBS e um novo DMEM 10% adicionado. ECFF (62,5 – 250 μ g/mL) ou veículo (água, controle) foram adicionados e fotomicrografias (200x) foram tiradas para a representação dos tempos 0, 6, 12, 18, 24, 48 e 72h de incubação com a droga-teste ou veículo (RÄSÄNEN; VAHERI, 2010).

Com o objetivo de avaliar somente a migração dos queratinócitos, antes de realizar o arranhão foi adicionado à placa um agente anti-mitótico, a Mitomicina C (Sigma®) 10 μ g/mL em PBS, por 1h. Após este período as células foram submetidas ao arranhão. Os restos celulares foram removidos e os poços lavados com PBS. Um novo DMEM 10% foi adicionado e as células foram tratadas com ECFF (62,5 – 250 μ g/mL) ou veículo (água, controle). A migração dos queratinócitos foi avaliada no tempo inicial de incubação (tempo 0), após 24 e 48 h (CHOI *et al.*, 2017). A área aberta do arranhão foi mensurada com auxílio do software TSCRATCH® em cada período de análise no mesmo local inicial, sendo o percentual de área aberta mensurado através da fórmula:

$$\text{Área aberta(\%)} = \text{Área do tempo } X \div \text{Área do tempo inicial} \times 100$$

4.2.7.4. Expressão de E-caderina em queratinócitos por citometria de fluxo

A E-caderina, integrante da subfamília de caderinas clássicas do tipo I, é a principal proteína transmembrana presente na junção aderente de células epiteliais (ODA; TAKEICHI, 2011). Durante o processo de reepitelização de feridas, os queratinócitos aderem-se uns aos outros e migram para formar um novo epitélio, e a E-caderina tem uma diminuição na sua

expressão, já que durante a migração essa junção é desfeita para permitir o rolamento das células. A quantificação de E-caderina expressa pelos queratinócitos permitiu investigar um dos mecanismos de ação de ECFF sobre essas células (HUANG *et al.*, 2016).

Queratinócitos humanos HaCat (6×10^4 cel/mL) foram incubados em placa de 24 poços em DMEM 10% SFB por 24h e um arranhão (*Scratch*) foi feito no centro de cada poço, sendo as células desagregadas removidas e lavadas com PBS, onde um novo DMEM 10% foi adicionado. Em seguida as células foram tratadas com ECFF (62,5 – 250µg/mL) ou veículo (água, controle) e incubadas por 48h. Ao término do protocolo as células foram removidas da placa com auxílio de tripsina (0,1%) e centrifugadas por 10 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi removido e as células ressuspendidas e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-e-caderina (1:300), conjugado com fluorocromo ficoeritrina (67A4), (Abcam® - ab128125), por 30 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz. As células marcadas foram novamente centrifugadas em 1500 rpm por 5 min, para remoção do anticorpo e ressuspendidas em 250µL de tampão FACS (PBS estéril com 2% de SFB inativado por 30 min a 56 °C) e levadas ao citômetro FACSVerse (BD Biosciences). A análise foi realizada no software FlowJo e os dados foram expressos através da intensidade média de fluorescência.

4.3. Avaliação farmacológica *in vivo*

4.3.1. Animais

Os protocolos envolvendo o uso de animais de experimentação foram realizados 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 8846160418 (**Apêndice A**) pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC).

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem Swiss (8 semanas de idade) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN-UFC) e mantidos no Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da UFC para execução dos protocolos experimentais. Os animais foram mantidos em ciclo de 12h claro/escuro, temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$) controlados, com fornecimento *ad libitum* de ração e água.

4.3.2. Procedimento cirúrgico de indução de feridas excisionais

Antes da realização do protocolo, o ambiente cirúrgico foi higienizado com álcool etílico 70%, assim como os instrumentos e materiais foram previamente esterilizados por autoclavação para prevenção de contaminação. Os animais disponibilizados para experimentação permaneceram na sala de experimentação animal do biotério do NDPM por pelo menos sete dias para aclimatação antes dos protocolos cirúrgicos.

Os animais foram anestesiados com a associação de cloridrato de xilazina (10 mg/kg, i.p.) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.p.). Após a anestesia foi feita a tricotomia na região dorsal (4 cm x 2 cm) seguida de assepsia com iodopovidona 1% seguido de álcool etílico 70%. Foi demarcada uma ferida excisional circular (área de 1cm²) na superfície dorsal dos animais com auxílio de um punch cirúrgico para biópsia de 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 fluidica e foram mantidos em ambiente aquecido até a completa recuperação da anestesia (CARDOSO *et al.*, 2007).

4.3.3. Produção de creme contendo extrato padronizado das flores de *Cassia fistula* (CrECFF)

Os cremes utilizados para o tratamento das feridas excisionais foram desenvolvidos no Laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia sob supervisão do Prof. Said Gonçalves da Cruz Fonseca.

A formulação foi estabelecida previamente considerando as características do princípio ativo (origem hidrofílica) e das lesões cutâneas abertas (maior necessidade de oclusão), sendo definida a forma farmacêutica creme A/O (característica lipofílica). Inicialmente, ECFF (extrato líquido padronizado – fase aquosa) foi dissolvido em lanolina anidra numa proporção de 12,5 e 25% do peso final do creme, sendo acrescentado lentamente e homogeneizando bastante à mistura. Após a incorporação de ECFF na fase oleosa da formulação, o peso foi preenchido com gel petrolato polietileno (veículo de maior proporção no creme) para a obtenção de uma preparação semi-sólida homogênea. Finalmente, CrECFF 12,5 e 25% foram transferidos para bisnagas (15 g) de alumínio (protegidas da luz) previamente esterilizadas e armazenadas em geladeira para maior conservação da forma farmacêutica. Os excipientes utilizados foram manipulados na mesma proporção utilizada para a preparação de CrECFF (mas sem a incorporação do extrato) e foi produzido o controle negativo (veículo). As bisnagas permaneceram lacradas até a realização dos tratamentos.

As concentrações de 12,5 e 25% escolhidas para a formulação dos cremes foram baseadas nas concentrações de ECFE que apresentaram melhor efeito cicatrizante nos experimentos *in vitro*.

4.3.4. Grupos experimentais

Os animais foram dispostos individualmente em gaiolas e distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais (N= 10 animais/ grupo), onde os tratamentos foram realizados logo após a cirurgia e indução da ferida.

- Controle (veículo): animais foram submetidos à ferida excisional, e receberam o tratamento com o creme sem nenhum ativo incorporado;

- CrECFE 12,5%: animais foram submetidos à ferida excisional, e receberam o tratamento com o creme contendo ECFE 12,5% (p/p).

- CrECFE 25%: animais foram submetidos à ferida excisional, e receberam o tratamento com o creme contendo ECFE 25% (p/p).

Primeiramente, as lesões receberam solução fisiológica 0,9% para remoção de possíveis resíduos seguida da aplicação tópica dos cremes, uma única vez ao dia, com auxílio de cotonetes descartáveis em quantidade suficiente para cobrir a lesão (1 cm²).

4.3.5. Parâmetros avaliados

4.3.5.1. Análise da área das feridas excisionais

A área das feridas excisionais foi mensurada nos dias 0, 2, 4, 7, 9 e 12 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 fórmula descrita abaixo.

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

4.3.5.2. Coleta das amostras

Após a análise macroscópica da área das feridas, o 2º, 7º e 12º dia após a indução da lesão foram escolhidos para análise de mediadores químicos envolvidos na cicatrização e para análise histológica. Os animais de cada grupo (n=5/dia/grupo) foram selecionados de forma aleatória e a eutanásia foi realizada pela administração de superdosagem 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.

4.3.5.3. *Processamento e análise histológica*

As amostras de tecido coletadas no 2º, 7º e 12º dia foram 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 (CAVALCANTE *et al.*, 2011) no Laboratório de Histopatologia do NPDM, UFC sob coordenação da profa. Dr(a) Ana Paula Negreiros Nunes Alves. As análises foram realizadas com base nos parâmetros de escores descritos no **Tabela 1**. Fotomicrografias foram tiradas para a representação histológica de amostras dos grupos experimentais.

Tabela 1 – Parâmetros histológicos para análise por H&E

Escores	Parâmetros
0	Sem úlcera + epitélio normal + hiperkeratose Tecido conjuntivo remodelado
1	Sem úlcera + epitélio atrófico + hiperkeratose Fibrose + discreto a moderado infiltrado inflamatório crônico
2	Superfície desnuda de epitélio Fibrose + discreto a moderado infiltrado inflamatório crônico
3	Com úlcera Tecido de granulação (fibroblasto, neoformação vascular, linfócito, plasmócito e macrófago)
4	Com úlcera Infiltrado inflamatório agudo (ectasia, vasos dilatados, infiltrado leucocitário misto)

4.3.5.4. *Dosagem de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-10 e fatores de crescimento TGF- β e VEGF*

As amostras 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 5 min para remoção de resíduos que não foram triturados completamente. O método de detecção foi descrito anteriormente. 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 VEGF, e 2000 pg/mL para TNF- α , IL-10, TGF- β . 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.

4.3.5.5. *Expressão de TNF- α por imunohistoquímica*

As amostras representativas do 2º dia de tratamento foram utilizadas para quantificação de TNF- α por imunohistoquímica. A parafina dos cortes histológicos foi derretida em estufa a 60°C em até 1 hora, seguidos de banhos de xilol, álcool 100%, 95%, 70%, água corrente e água destilada por 3 min em cada banho para completa reidratação do tecido. Para recuperação antigênica, os cortes foram submersos em tampão de citrato pH 6,0 em banho maria por 30 min a 80°C. Após resfriamento, os tecidos foram lavados em água destilada e a etapa de bloqueio da peroxidase endógena foi feita com peróxido de hidrogênio a 3% por 20 min. Os cortes foram lavados com tampão PBS por 3 min, secos cuidadosamente e 150 μ L de anticorpo primário policlonal TNF- α (1:200) (ab6671, Abcam®) diluído em BSA 5% (em tampão PBS), foi adicionado aos cortes por 18h e mantido em câmara úmida a 4°C. Após a incubação, os anticorpos foram removidos e as lâminas foram lavadas com PBS por 3 min e receberam o polímero (EnVisionTMFLEX mini kit, K8023) por 30min. Após esse período os cortes foram novamente lavados com PBS e o DAB (Dako®) foi aplicado aos cortes por poucos segundos, sendo a reação protegida da luz, até a visualização da coloração acastanhada, a reação foi finalizada com a lavagem dos cortes em água destilada. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Mayer por poucos minutos. Após a lavagem das lâminas, foram realizados novos banhos de álcool 95%, álcool 100% e xilol, e as lâminas montadas com Entellan para

visualização em microscópio óptico. O controle negativo não foi incubado com o anticorpo primário (RENNO et al, 2011).

4.4. Análise estatística

O programa GraphPad Prism® (v 5.0) foi utilizado para a realização de testes estatísticos, sendo 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 por Tukey. Os resultados que representaram diferença estatística adotaram valores mínimos de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização do extrato das flores de *Cassia fistula* Linn. (ECFF)

5.1.1. Determinação do teor de umidade da droga vegetal e resíduo seco de ECFF

Inicialmente, para controle de qualidade do material vegetal e para que não houvesse comprometimento do teor dos princípios ativos, foi padronizado o tempo de secagem e estabelecido os teores de umidade da droga vegetal (flores de *Cassia fistula* Linn.). Neste estudo as flores de *Cassia fistula* apresentaram um teor de umidade de $14,2 \pm 1,22\%$ após 24 horas, $10,9 \pm 0,35\%$ após 48 horas, e $7,8 \pm 0,35\%$ após 72hs (**Tabela 2**). Após 48 horas de secagem, a faixa de umidade se apresentou dentro do limite sugerido pela Anvisa (8-14%), sendo este tempo padronizado para a secagem de todo o material vegetal que seria submetido à posterior extração. Para a determinação da concentração final de ECFF, foi mensurado o teor de resíduo seco do extrato de acordo com metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira. O teor de resíduo seco de ECFF foi 11mg/mL.

Tabela 2 – Teor de umidade das flores de *Cassia fistula* após secagem em estufa em diferentes períodos de tempo.

Tempo de secagem (horas)	Teor de Umidade (%)
24	$14,2 \pm 1,22$
48	$10,9 \pm 0,35$
72	$7,8 \pm 0,23$

A planta foi submetida à secagem em estufa com circulação e renovação de ar, sob temperatura de 40 ± 5 °C. Os valores representam a média \pm DP. As análises foram realizadas em, pelo menos, três réplicas.

5.1.2. Análise fitoquímica e do teor de fenóis e flavonoides totais de ECFF

A prospecção fitoquímica de ECFF foi realizada por meio de reações gerais de identificação e cromatografia em camada delgada, e foi realizada com o intuito de identificar de maneira preliminar os possíveis metabólitos secundários presentes na planta. Os resultados revelaram a presença de algumas classes de metabólitos como alcaloides, flavonoides, taninos e antraquinonas no extrato (**Tabela 3**).

Além disso, para uma melhor caracterização do extrato, também foi feita a determinação do teor de fenóis e flavonoides totais. O teor de fenóis totais presente em ECFF foi de $128,00 \pm 0,14$ mg EAG/g e de flavonoides totais foi de $108,7 \pm 5,98$ mg EQ/g.

Tabela 3 – Análise fitoquímica de ECFF para identificação de grupos de metabólitos secundários

Metabólitos secundários	Resultado	Característica macroscópica
Alcaloides		
Reação de Dragendorff	+	Alaranjado
Reação de Mayer	++	Precipitado
Reação de Bertrand	+	Leve turvação
Flavonoides	++	Vermelho
Taninos		
Reação com cloreto férrico a 1%	-	Sem turvação
Reação com acetato de cobre a 4%	+	Leve turvação
Reação com dicromato de potássio a 5%	+	Turvação
Reação com acetato de chumbo a 10%	++	Turvação/ Precipitado
Saponinas	-	Sem espuma
Cumarinas	-	Sem fluorescência
Antraquinonas	++	Vermelho

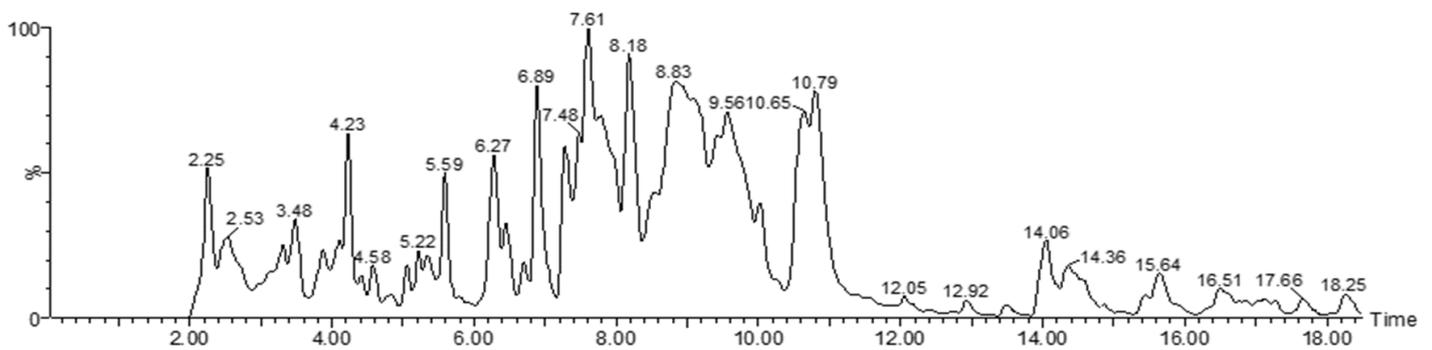
(++) muito positivo (+) positivo (+ -) inconclusivo (-) negativo (Matos, 2009)

5.1.3. Caracterização de ECFE por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-ESI-QTOF MS/MS)

ECFE foi submetido a cromatografia líquida por UPLC-ESI-QTOF MS/MS (modo negativo) para identificação dos seus componentes químicos. A **Figura 7** representa o cromatograma obtido após análise do extrato.

A **Tabela 4** evidencia os compostos químicos identificados em ECFE e associados aos respectivos tempos de retenção (Tr), massas precisas (erro de massa em ppm), fórmula molecular e referências bibliográficas. Os resultados mostraram a presença das seguintes substâncias no extrato: rutina, kaempferol-3-O-rutinosídeo, kaempferol e réina (Tr: 4,11; 4,22; 5,05; 6,25 min), além de outras substâncias ainda não identificadas. No **Apêndice B** estão evidenciados os espectros de massa e as estruturas químicas identificadas.

Figura 7 – Cromatograma do extrato etanólico das flores de *Cassia fistula* Linn. (ECFE)



Condições: Coluna Waters® Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 µm), temperatura fixa de 40°C, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (fase A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (fase B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 µL.

Tabela 4 – Compostos detectados e caracterizados em ECFE por UPLC-ESI-QTOF MS/MS no modo de ionização negativo.

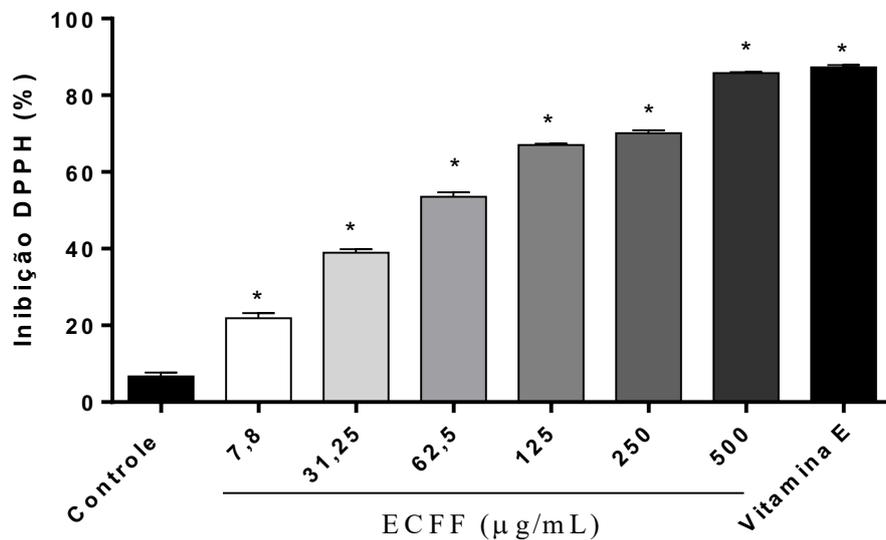
Tr (min)	[M+H] ⁻ Observado	[M+H] ⁻ Calculado	Fórmula Empírica	Ppm (erro)	Nome proposto	Referências
4,11	609,1459	609,1456	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-0,5	Rutina	(CHANDRA <i>et al.</i> , 2015)
4,22	593,1456	593,1506	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-8,4	Kampferol 3-O-rutinosideo	(ADJÉ <i>et al.</i> , 2012)
5,05	285,0393	285,0399	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-2,1	Kampferol	(CHANDRA <i>et al.</i> , 2015)
6,25	283,0217	283,0243	C ₁₅ H ₈ O ₆	-9,2	Reína	(CHANDRA <i>et al.</i> , 2015)

Legenda: Tr – tempo de retenção, Ppm – erro de massa

5.2. Extrato das flores de *Cassia fistula* (ECFF) apresenta atividade antioxidante pelo método DPPH

Pode ser observado no **Figura 8**, que ECFF apresentou atividade antioxidante ao sequestrar os radicais livres DPPH. Após 30 minutos de incubação, todas as concentrações testadas (7,8 - 500 μ g/mL) foram capazes de sequestrar o radical, promovendo a redução da absorbância, inibindo os radicais DPPH (% inib.: 21,88 \pm 1,36; 38,94 \pm 0,97; 53,51 \pm 1,22; 67,04 \pm 0,30; 70,10 \pm 0,79; 85,77 \pm 0,30, respectivamente) em comparação com o grupo controle negativo, representado pelo veículo (% inib.: 6,75 \pm 0,95). Este efeito foi diretamente proporcional à concentração de ECFF, que na sua maior concentração (500 μ g/mL) não diferiu significativamente da vitamina E (% inib.: 87,33 \pm 0,58), utilizada neste teste como controle positivo por sua atividade antioxidante.

Figura 8 – Atividade antioxidante de ECFF pelo sequestro de radicais DPPH



Os resultados foram expressos como porcentagem média \pm EPM (n=3). A análise estatística foi feita por One-way ANOVA seguido do teste de Tukey. *p<0,001 representa diferença estatística em comparação ao grupo controle veículo (água).

5.3. Protocolos em fibroblastos murinos L929

5.3.1. *ECFF não apresenta citotoxicidade pelo método do MTT e aumenta o metabolismo mitocondrial em fibroblastos*

Ao avaliar o efeito de ECFF sobre fibroblastos L929 pode-se observar que o extrato foi capaz de aumentar o percentual de viabilidade celular de maneira significativa nas concentrações de 62,5; 125 e 250 μ g/mL após 24h (140,6 \pm 8,28%; 150,3 \pm 9,88%; 187,9 \pm 12,9%, respectivamente) e 48h (119,6 \pm 4,72%; 122,1 \pm 5,12%; 150,5 \pm 6,31%, respectivamente) em comparação ao grupo controle (108,9 \pm 3,41%; 99,71 \pm 4,26%). A partir de 72h o aumento foi ainda maior, apresentando valores significantes a partir da concentração de 31,25 μ g/mL (123,3 \pm 4,28%; 153,7 \pm 15,17%; 158,3 \pm 10,31%; 165,0 \pm 8,75%) quando comparado ao controle (95,03 \pm 2,46%) (**Figura 9A, B e C**).

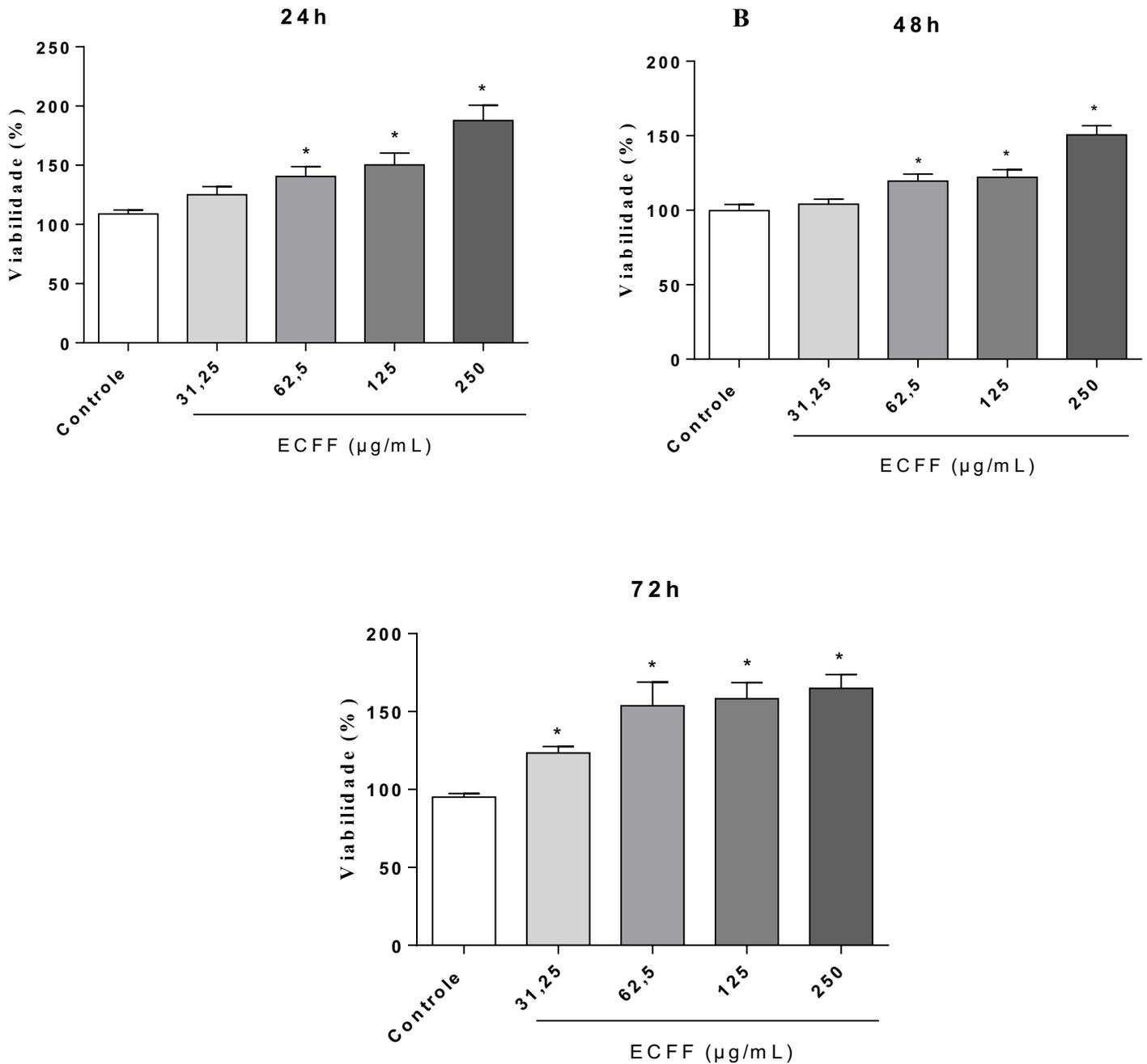
O ensaio de MTT reflete a mensuração da viabilidade celular através da via mitocondrial (MOSMANN, 1983), e de acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que houve intensa metabolização do MTT pelas células quando em contato com ECFF.

5.3.2. *ECFF não apresenta citotoxicidade pelo método de SRB em fibroblastos*

Diante dos resultados obtidos no ensaio do MTT e com o objetivo de investigar um possível efeito de proliferação de fibroblastos quando em contato com ECFF, foi realizado um segundo ensaio de viabilidade, com o uso do corante SRB, que se liga aos aminoácidos celulares permitindo uma quantificação mais sensível, além da independência da função mitocondrial.

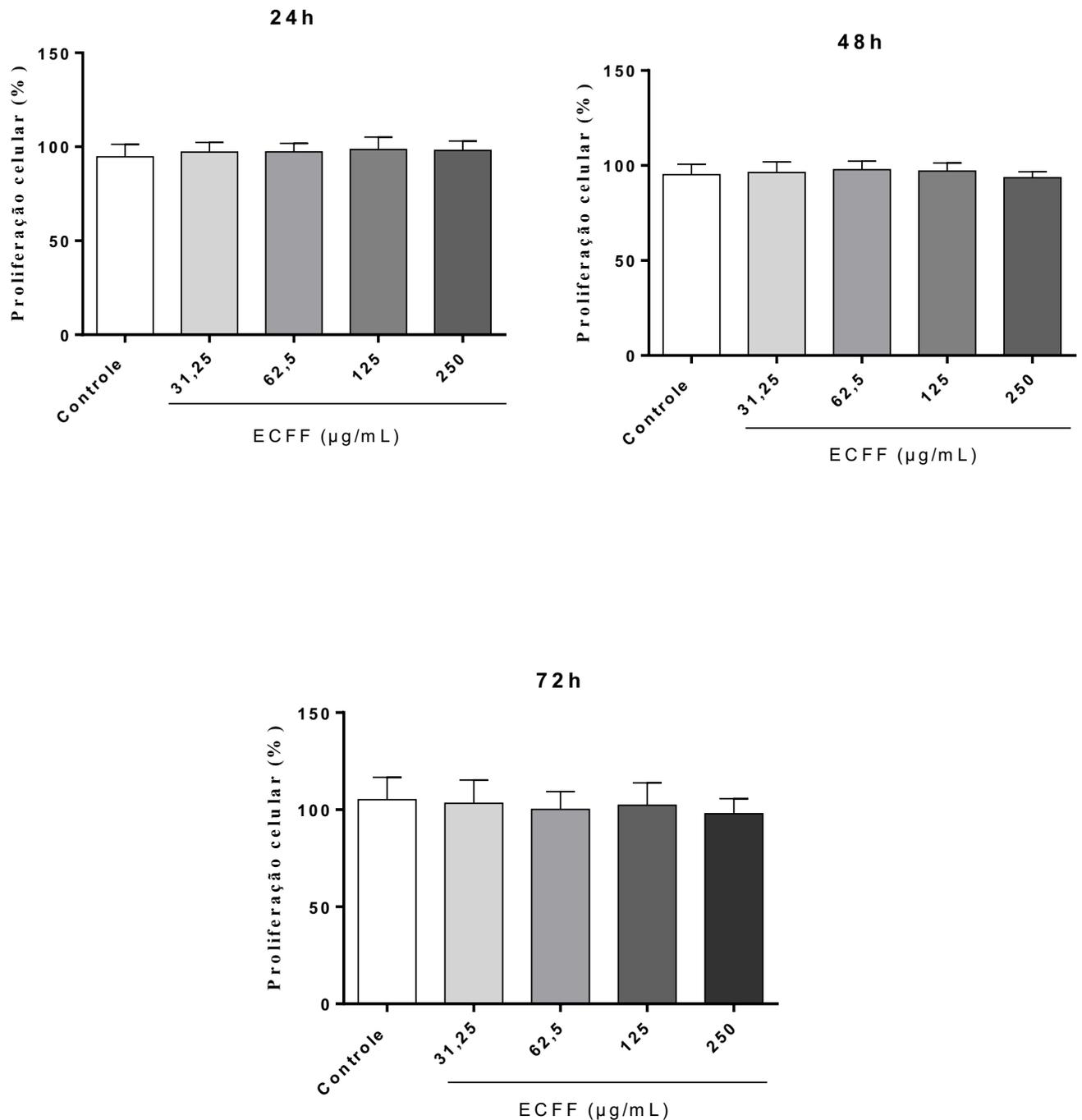
Em todos os tempos de incubação testados (24, 48 e 72h), ECFF não alterou a viabilidade celular em nenhuma concentração testada (**Figura 10A, B e C**), demonstrando aparentemente não atuar sobre a proliferação de fibroblastos.

Figura 9 – Viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) tratados com ECFF pelo método do MTT



A viabilidade celular de fibroblastos pelo método de MTT foi expressa após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) de incubação com ECFF (31,25 – 250µg/mL). Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como porcentagem média ± erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p < 0,05$ representa diferença significativa em comparação ao grupo controle (veículo, água).

Figura 10 – Viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) tratados com ECFF pelo método de SRB



A viabilidade celular de fibroblastos pelo método de SRB foi expressa após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) de incubação com ECFF (31,25 – 250µg/mL). Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como porcentagem média \pm erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados.

5.3.3. ECFF protege fibroblastos murinos (L929) do estresse celular induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

5.3.3.1. Curva concentração-efeito de H₂O₂ sobre a viabilidade de fibroblastos L929

Com o intuito de estabelecer a concentração ideal de H₂O₂ capaz de inibir em até 80% a viabilidade celular de fibroblastos (L929), foi realizada uma curva concentração-efeito com oito concentrações diferentes de H₂O₂, e a viabilidade celular foi mensurada pelo método de SRB. A partir de 0,125 mM a viabilidade celular foi reduzida, enquanto as concentrações superiores a 0,750 mM apresentaram mais de 80% de morte celular. Dessa forma a concentração de 0,650 mM de H₂O₂ foi escolhida para os demais protocolos experimentais, como a menor concentração capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular considerando o parâmetro de 80% de morte celular (**Figura 11A**).

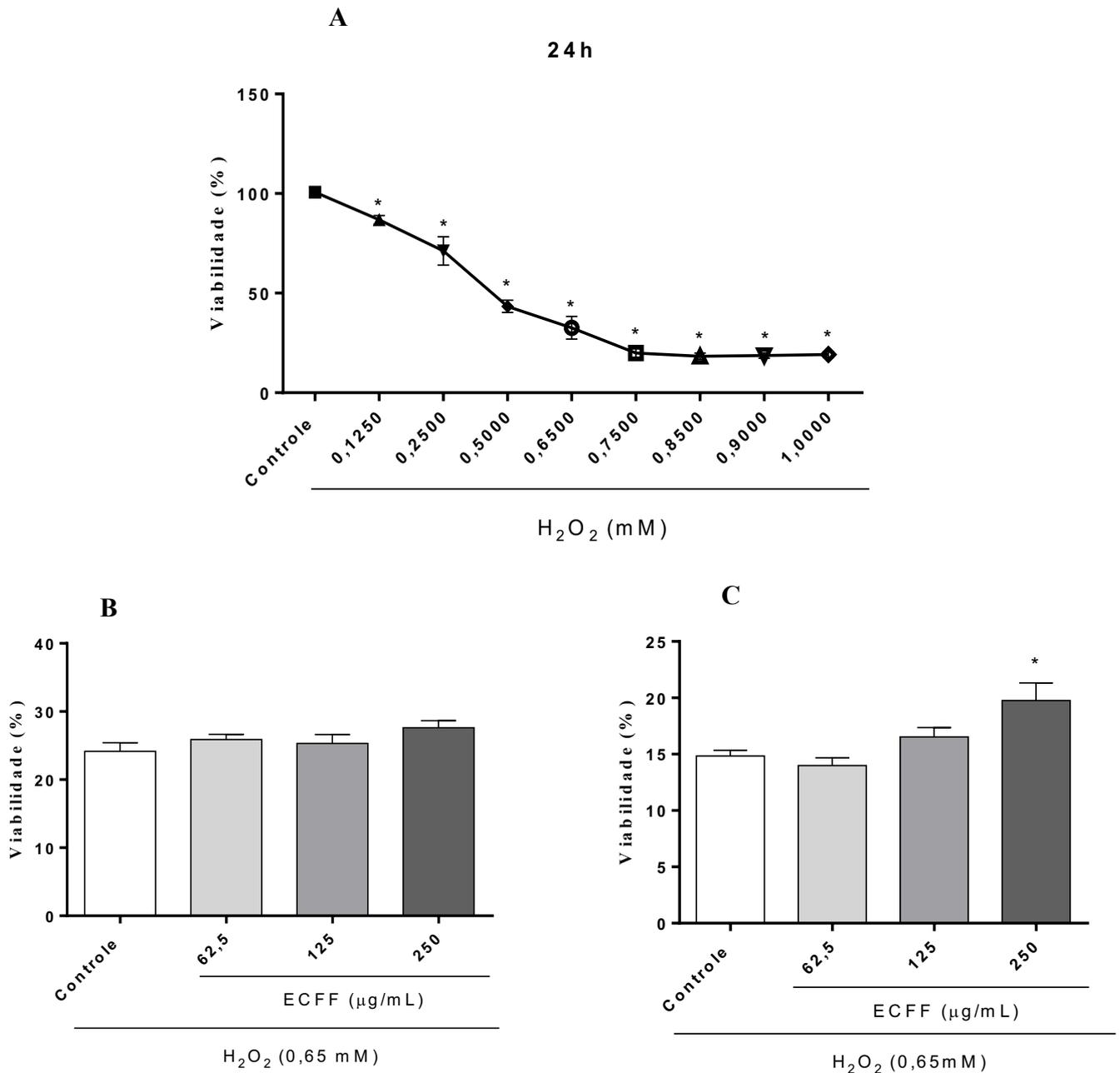
5.3.3.2. Efeito protetor de ECFF sobre a redução da viabilidade celular induzida por H₂O₂

ECFF foi adicionado na cultura de fibroblastos por 1h ou 24h antes da incubação com H₂O₂ por 24h. Com 1h de incubação, ECFF não foi capaz de alterar a diminuição da viabilidade celular induzida por H₂O₂, no entanto, com 24 h de incubação, ECFF foi capaz de aumentar de maneira significativa o percentual de viabilidade celular na concentração de 250µg/mL (19,75 ± 1,58%) em comparação ao grupo controle (15,57 ± 0,65%) (**Figura 11B e C**).

5.3.3.3. Alterações morfológicas provocadas pelo estresse celular induzido pelo H₂O₂ e proteção de ECFF

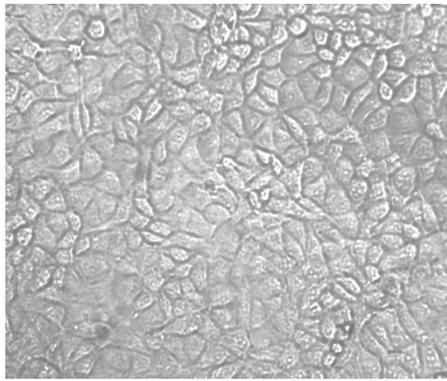
As alterações celulares após exposição ao H₂O₂ foram ilustradas na **Figura 12**. Pode-se observar a perda da morfologia fusiforme e aparência esférica com presença de grânulos indicando estresse e morte celular nos grupos expostos ao H₂O₂. Com o tratamento de ECFF, a partir da concentração de 125µg/mL por 24h, algumas células foram preservadas da morte celular e permaneceram na forma fusiforme. Em conformidade com os resultados obtidos anteriormente, a concentração 250µg/mL preserva a maioria das células da morte e do estresse oxidativo produzido por H₂O₂.

Figura 11 – Viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) após estresse celular induzido por H_2O_2

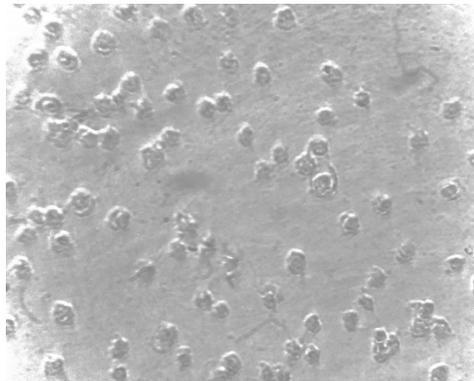


(A) Curva concentração-efeito de peróxido de hidrogênio (0,125 – 1,000 H_2O_2 mM) sobre a redução da viabilidade de fibroblastos murinos (L929) após 24h de incubação. (B) Efeito do pré-tratamento com ECFE (62,5 – 250 µg/mL) por 1h e (C) 24h sobre a viabilidade celular de fibroblastos expostos ao H_2O_2 (0,65 mM) por 24 h. Os resultados foram expressos como porcentagem média de viabilidade celular \pm erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p < 0,05$ representa a diferença significativa em comparação ao grupo controle (veículo, água).

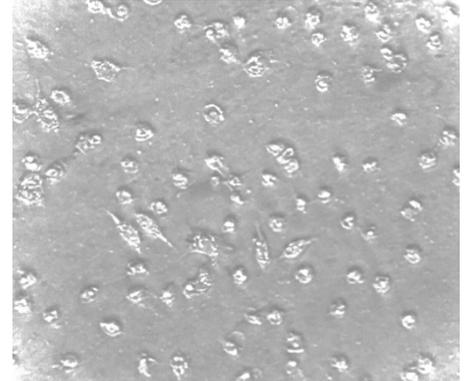
Figura 12 – Efeito de ECFF sobre a morfologia dos fibroblastos murinos (L929) expostos ao H_2O_2



DMEM

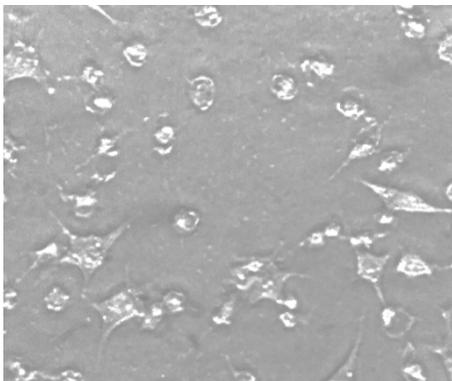


DMEM

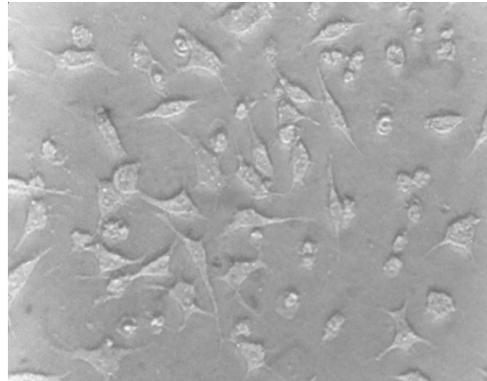


Veículo

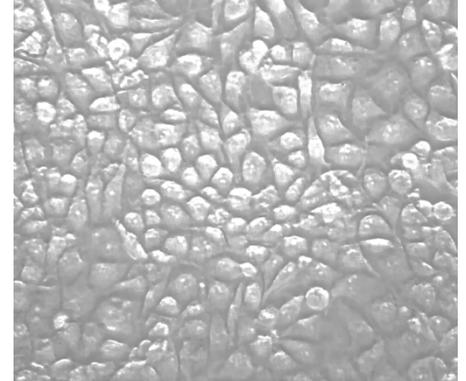
H_2O_2 (0,65mM)



62,5



125



250

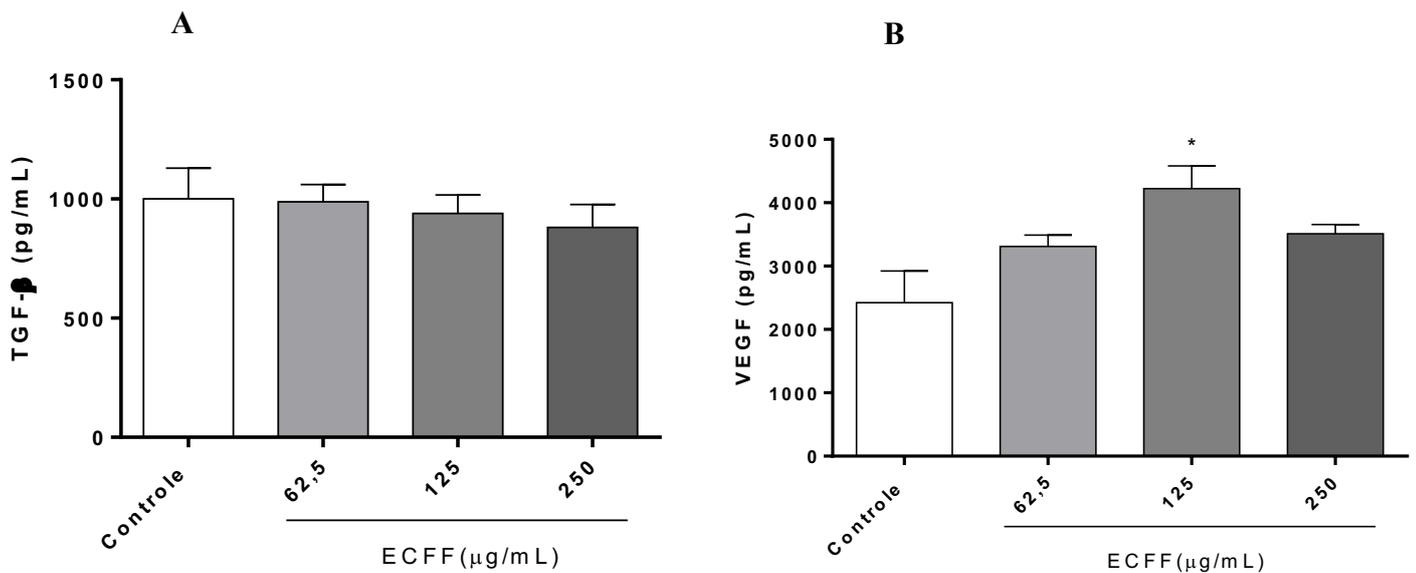
Fonte: Elaborada pelo autor.

Fotomicrografias (400x) foram adquiridas para observação da morfologia dos fibroblastos após a exposição ao tratamento com ECFF (62,5 - 250µg/mL) por 24h e ao H_2O_2 (0,65 mM) 24h após o tratamento.

5.3.4. ECFF aumenta produção de fator de crescimento VEGF em fibroblastos murinos (L929)

Diante de sua importância no processo de cicatrização, foram dosados no sobrenadante dos fibroblastos L929 após incubação com ECFF os fatores de crescimento TGF- β e VEGF. Após 48hs de incubação, ECFF não foi capaz de alterar os níveis de TGF- β (**Figura 13A**), no entanto aumentou os níveis de VEGF com níveis significativamente maiores na concentração de 125 μ g/mL ($4225 \pm 355,7$ pg/mL) em relação ao controle ($2424 \pm 498,1$ pg/mL) (**Figura 13B**).

Figura 13 – Efeitos de ECFF sobre liberação de TGF- β e VEGF em fibroblastos murinos L929



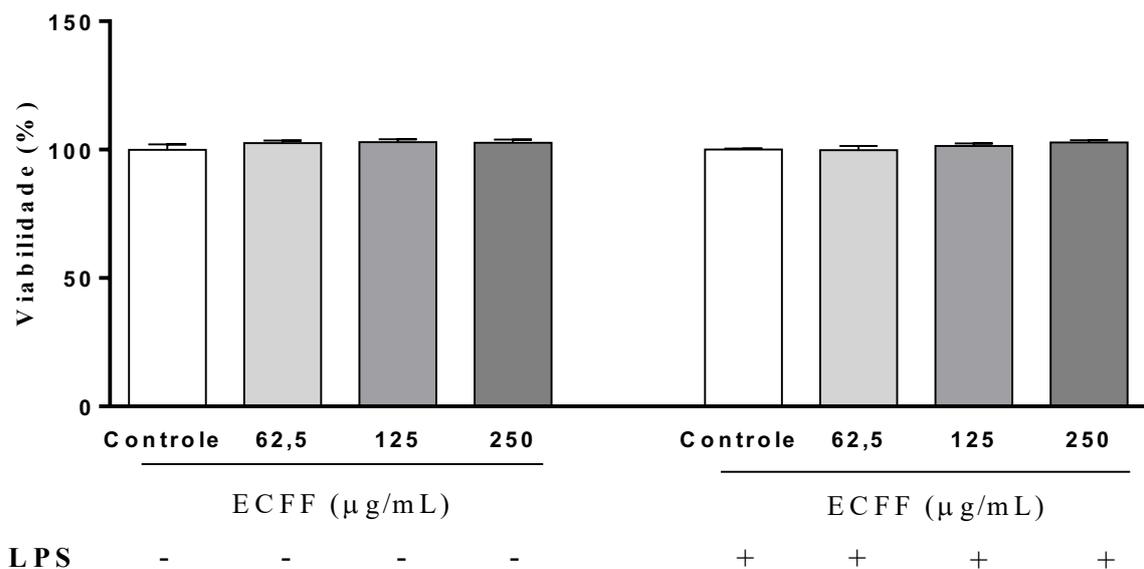
O pré-tratamento com ECFF não alterou os níveis de TGF- β (A), mas aumentou os níveis de VEGF (B) liberados pelos fibroblastos L929. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como pg/mL \pm erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p < 0,05$ representa diferença significativa em comparação ao grupo controle (veículo, água).

5.4. Protocolos em macrófagos murinos RAW 264.7

5.4.1. ECFF não apresenta citotoxicidade pelo método de SRB em macrófagos

De acordo com a **Figura 14** podemos observar que a viabilidade celular dos macrófagos não foi alterada após o tratamento com ECFF por 24h em nenhuma das concentrações testadas, quando comparada ao grupo controle (veículo, água), nem mesmo após a estimulação de macrófagos com LPS. Este resultado demonstra a ausência de citotoxicidade celular após exposição à estas concentrações de ECFF, neste período de tratamento.

Figura 14 – Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 tratados com ECFF pelo método de SRB

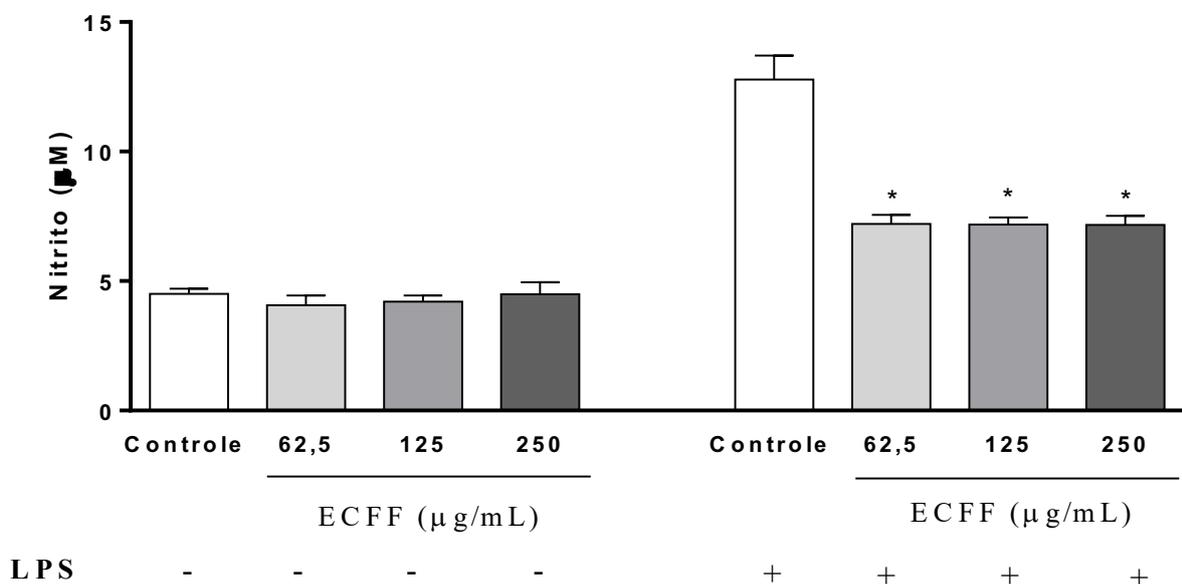


O pré-tratamento de macrófagos murinos RAW 264.7 com ECFF (62,5 – 250µg/mL), com ou sem a presença de LPS (100 ng/mL, 1h antes do tratamento) não alterou a viabilidade celular após 24h. O grupo controle representa o veículo (água). Foram realizados três experimentos independentes, e os resultados foram expressos como porcentagem média ± erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados.

5.4.2. *ECFF reduziu os níveis de nitrito (NO) produzidos por macrófagos murinos RAW 264.7*

Os níveis de nitrito produzidos pelos macrófagos quando estimulados com LPS foram reduzidos significativamente após tratamento com ECFF por 24h. Como demonstrado na **Figura 15**, quando estimulados com LPS, os macrófagos aumentaram significativamente a liberação de nitrito ($12,79 \pm 0,92 \mu\text{M}$), em comparação ao grupo controle sem LPS ($4,51 \pm 0,20 \mu\text{M}$) e após 24h de incubação com ECFF (62,5 – 250 $\mu\text{g/mL}$) os níveis de nitrito reduziram em todas as concentrações tratadas ($7,21 \pm 0,35$; $7,18 \pm 0,27$; $7,17 \pm 0,34 \mu\text{M}$) em comparação ao grupo controle com LPS ($12,79 \pm 0,92 \mu\text{M}$).

Figura 15 – Liberação de nitrito por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS



Os níveis de nitrito (μM) liberados por macrófagos RAW 264.7 reduziram pelo tratamento com ECFF após 24h, e com estimulação por LPS (100 ng/mL). Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como porcentagem média \pm erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. Valores de $*p < 0,05$ representam diferença estatística em comparação ao grupo controle (veículo, água) com exposição ao LPS.

5.4.3. Efeito de ECFF sobre a liberação dos mediadores TNF- α , IL-1 β , IL-10 e TGF- β por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS

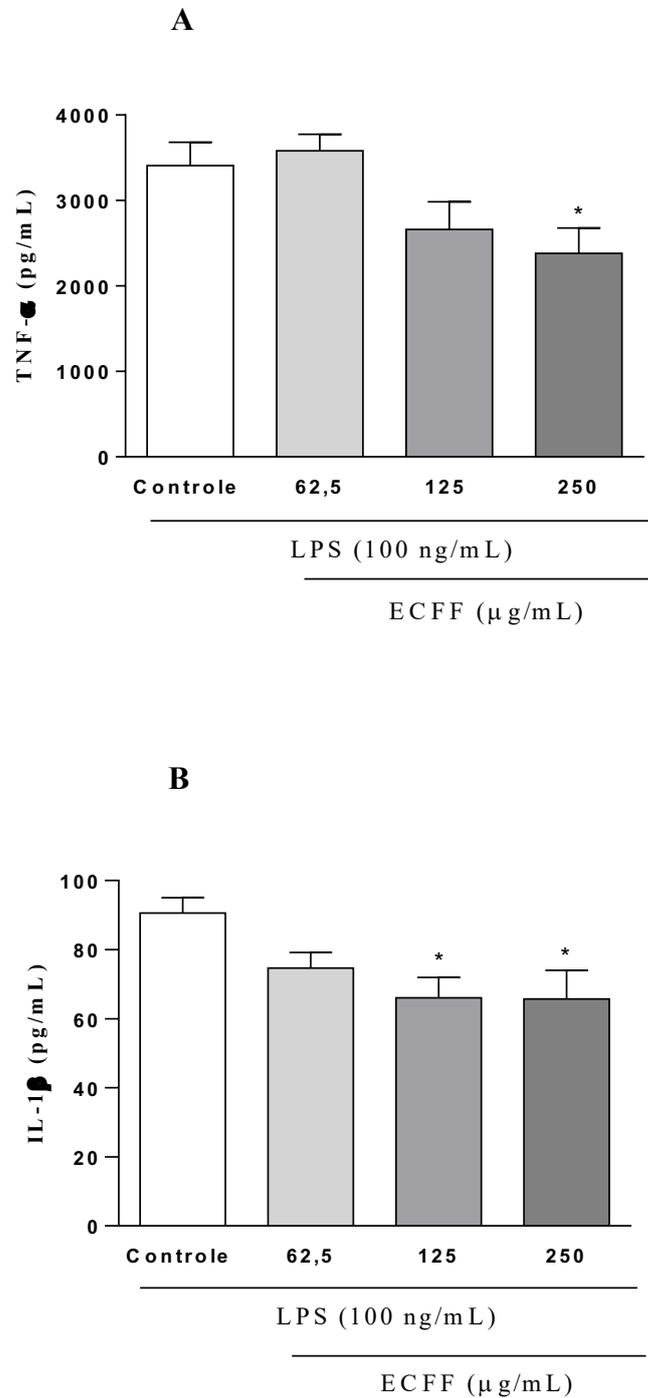
Diante da importância da fase inflamatória e modulação da liberação de mediadores para o processo de cicatrização, foi investigado o papel de ECFF sobre macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (100 ng/mL).

O tratamento prévio de 1h com ECFF foi capaz de reduzir nas maiores concentrações (125 e 250 $\mu\text{g/mL}$) a liberação de TNF- α ($2662 \pm 322,1$ e $2380 \pm 297,6$ pg/mL, respectivamente) em comparação ao grupo controle com LPS ($3408 \pm 272,6$ pg/mL), no entanto, apenas a maior concentração de ECFF (250 $\mu\text{g/mL}$) apresentou resultado significativo (**Figura 16A**).

Na **Figura 16B** pode-se observar que o tratamento prévio com ECFF foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 β liberados por macrófagos estimulados com LPS. Nas maiores concentrações de ECFF (125 e 250 $\mu\text{g/mL}$), esses resultados foram significantes ($66,07 \pm 5,91$ e $65,74 \pm 8,32$ pg/mL) quando comparados ao grupo controle com LPS ($90,63 \pm 4,40$ pg/mL).

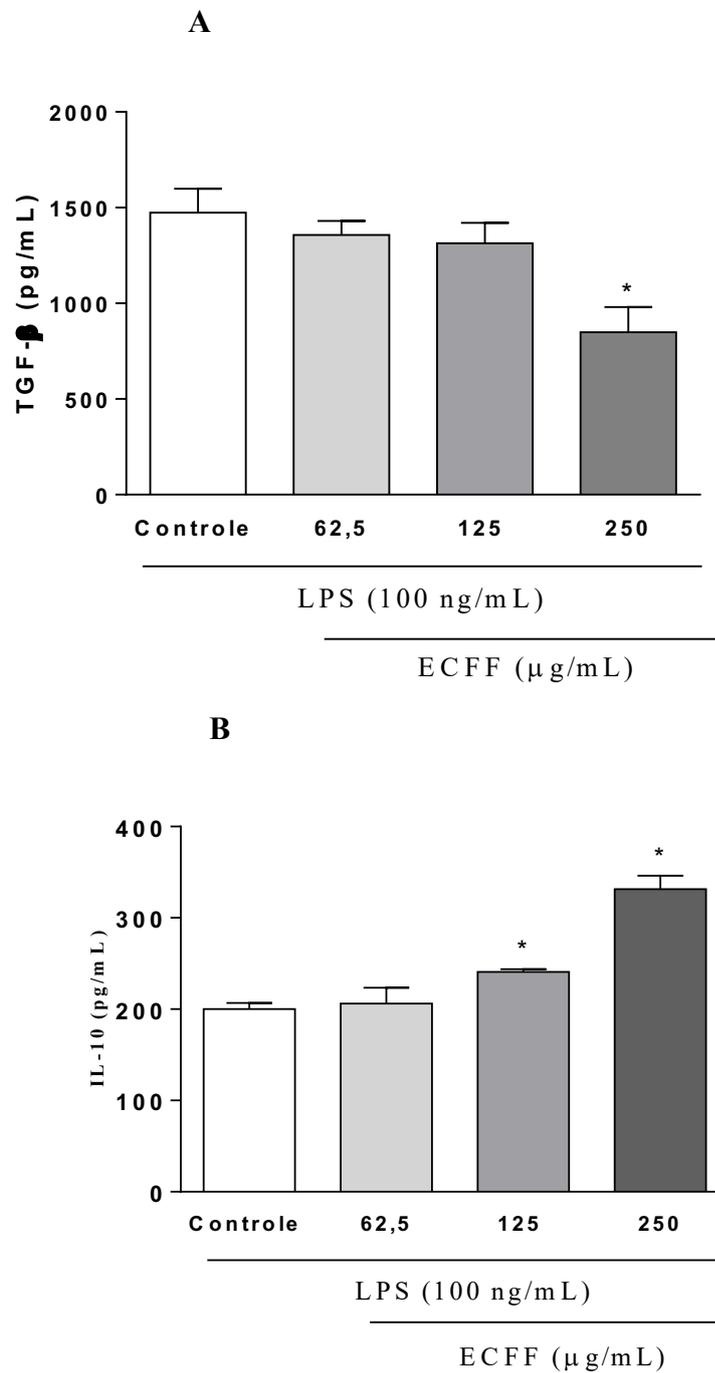
Como importante mediador da resposta imunológica de macrófagos, o TGF- β (**Figura 17A**) foi mensurado e somente a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ ECFF ($849,3 \pm 132,3$ pg/mL) foi capaz de reduzir a sua liberação em comparação ao controle ($1474 \pm 125,3$ pg/mL). Em relação aos níveis de IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória, as concentrações de 125 $\mu\text{g/mL}$ ($240,9 \pm 2,93$ pg/mL) e 250 $\mu\text{g/mL}$ ($331,4 \pm 14,70$ pg/mL) de ECFF foram capazes de aumentar os níveis dessa citocina em comparação ao grupo controle ($200,0 \pm 6,63$ $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 17B**).

Figura 16 – Efeitos de ECFE sobre a liberação de TNF- α e IL-1 β por macrófagos estimulados com LPS



Os níveis de TNF- α (A) e IL-1 β (B) produzidos pela RAW 264.7 foram estimulados pela presença do LPS após 24h de incubação. O pré-tratamento com ECFE atenuou os níveis de TNF- α e IL-1 β liberados pela RAW 264.7. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como pg/mL \pm erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p < 0,05$ representam diferença significativa em comparação ao grupo controle (veículo, água) com LPS.

Figura 17 – Efeitos de ECFE sobre a liberação de TGF- β e IL-10 por macrófagos estimulados com LPS



Os níveis de TGF- β (A) e IL-10 (B) produzidos pela RAW 264.7 foram estimulados pela presença do LPS após 24h de incubação. O pré-tratamento com ECFE reduziu os níveis de TGF- β e aumentou os níveis de IL-10 liberados pela RAW 264. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como pg/mL \pm erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p < 0,05$ representam diferença significativa em comparação ao grupo controle (veículo, água) com LPS.

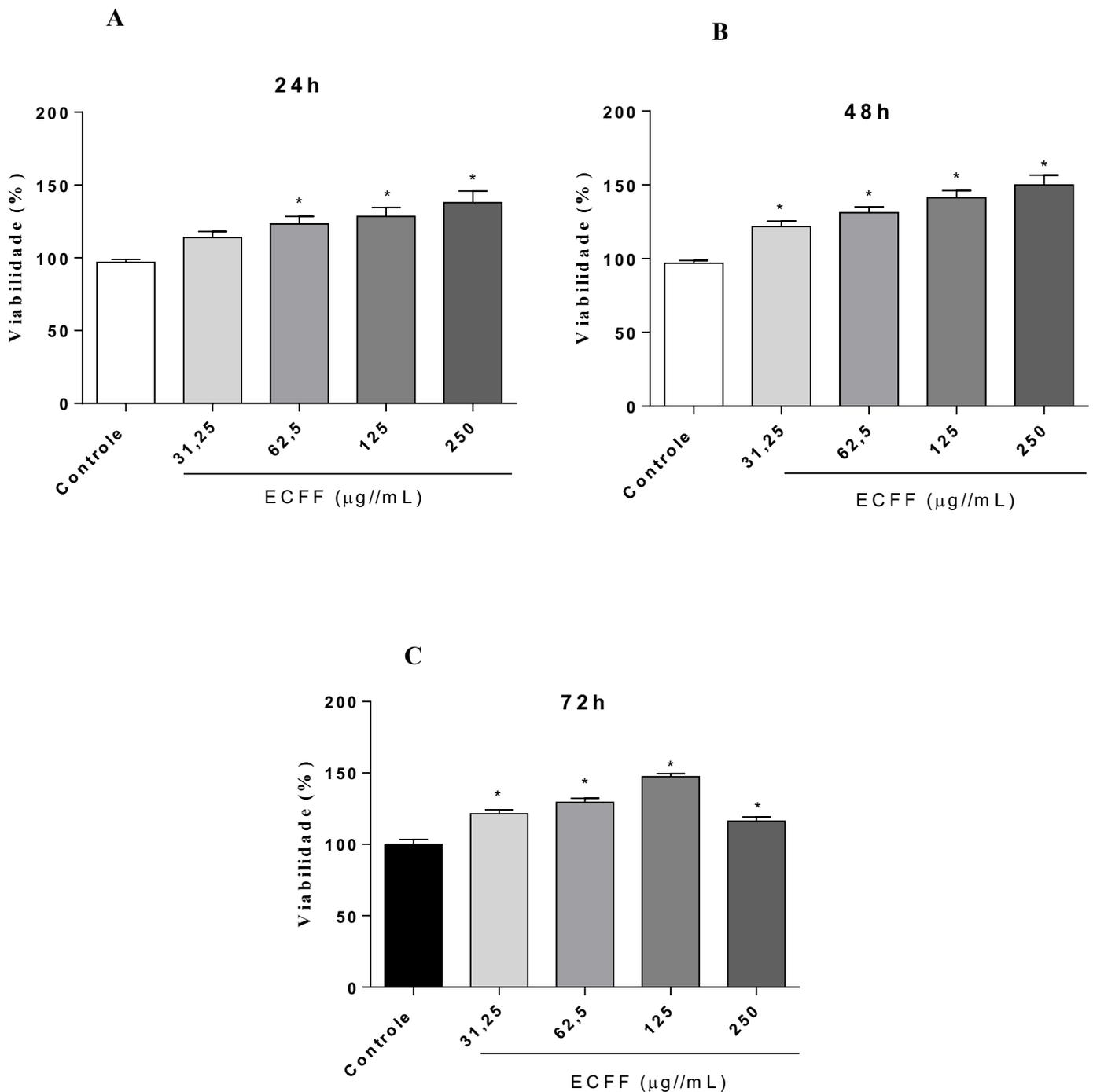
5.5. Protocolos em queratinócitos humanos (HaCaT)

5.5.1. *ECFF não apresenta citotoxicidade pelo método do MTT e aumenta o metabolismo mitocondrial em queratinócitos*

Para iniciar a avaliação farmacológica de ECFF sobre queratinócitos humanos HaCaT foi investigado o efeito do extrato sobre a viabilidade celular pelo método de MTT. ECFF foi capaz de aumentar o percentual de viabilidade celular em todas as concentrações tratadas, mas com 62,5; 125 e 250 μ g/mL após 24h de incubação ($123,3 \pm 5,07\%$; $128,4 \pm 6,14\%$; $137,9 \pm 8,01\%$, respectivamente), os resultados foram significantes em comparação ao grupo controle (veículo, água) ($96,87 \pm 2,06\%$) (**Figura 18A**). O mesmo efeito foi observado em todas as concentrações tratadas (31,25 - 250 μ g/mL) com 48h ($121,7 \pm 3,66\%$; $131,2 \pm 3,92\%$; $141,2 \pm 4,92\%$; $149,9 \pm 6,71\%$) e 72h ($121,4 \pm 2,96\%$; $129,5 \pm 2,83\%$; $147,4 \pm 2,10\%$; $116,3 \pm 2,88\%$) de incubação, em relação ao grupo controle (48h: $96,87 \pm 1,89\%$; 72h: $100,0 \pm 3,38\%$). Todos os grupos tratados com ECFF apresentaram resultados significantes em relação ao grupo controle após 48 e 72h (**Figura 18B e C**), no entanto a concentração de 250 μ g/mL diminuiu a proliferação de queratinócitos em relação às demais, provavelmente pela limitação da metabolização celular do MTT a partir de 72h de contato.

Assim como o efeito relatado em fibroblastos L929, ECFF foi capaz de estimular a reação de conversão do MTT a sal de formazan, e este efeito pode estar correlacionado à sua atividade antioxidante. Por ser um método que mensura a viabilidade celular através do metabolismo mitocondrial, podemos inferir que ECFF atuou sobre os queratinócitos através do aumento da metabolização de mitocôndrias.

Figura 18 – Viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCaT) tratados com ECFF pelo método do MTT



A viabilidade celular dos queratinócitos pelo método de MTT foi expressa após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) de incubação com ECFF (31,25 – 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como porcentagem média \pm erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p < 0,05$ representa diferença significativa em comparação ao grupo controle (veículo).

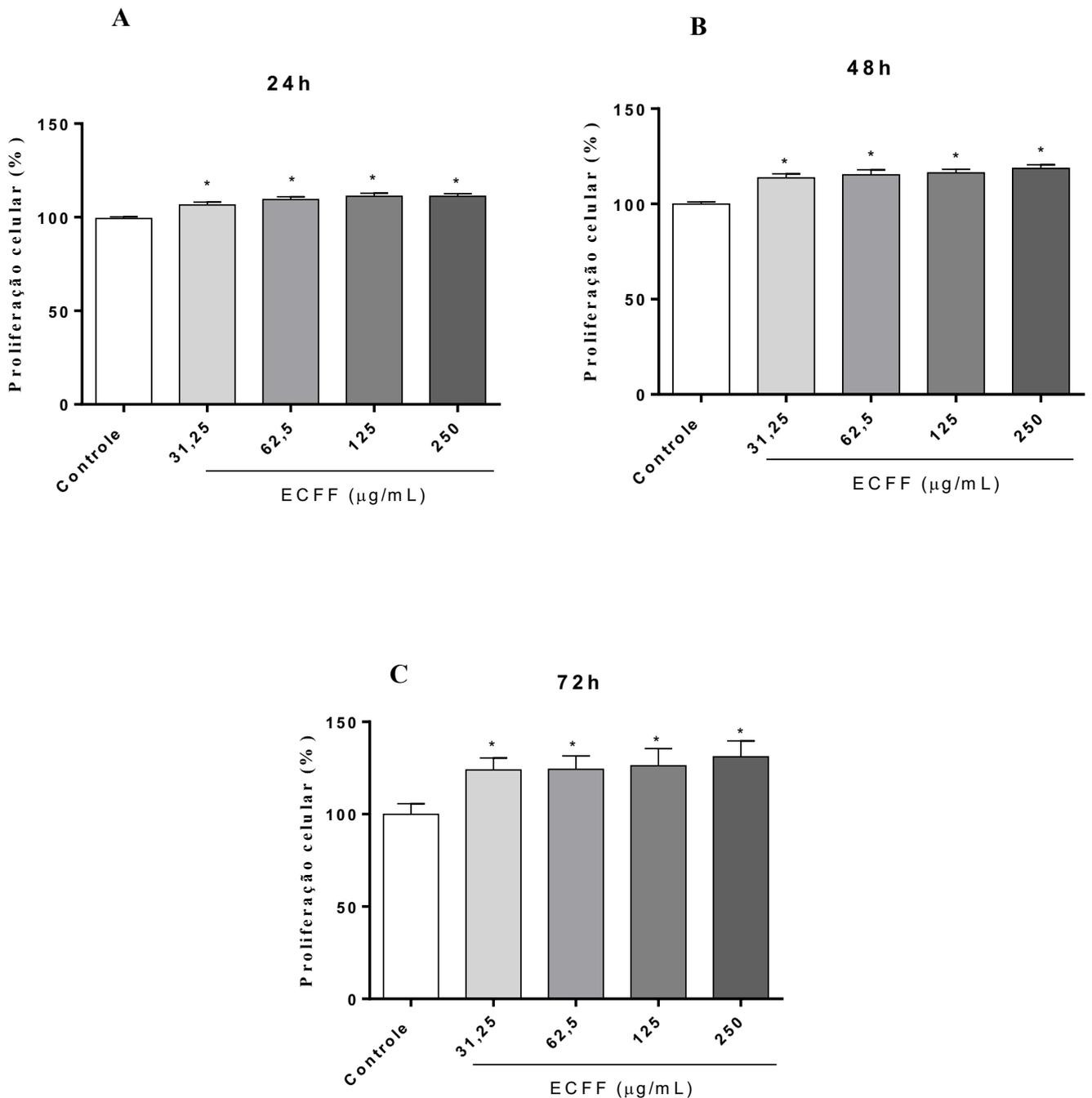
5.5.2. *ECFF estimulou a proliferação celular de queratinócitos humanos (HaCaT) pelo método de SRB*

Diante dos resultados observados no MTT e buscando uma análise mais sensível e independente da função metabólica celular, investigamos o efeito de ECFF sobre queratinócitos humanos HaCaT através da coloração com sulforodamina B (SRB). Neste ensaio buscamos além da investigação sobre a viabilidade celular, um possível efeito sobre a proliferação de queratinócitos.

Em todas as concentrações tratadas e em todos os tempos avaliados, ECFF foi capaz de aumentar a viabilidade e proliferação de queratinócitos. Na **Figura 19A** pode-se observar que nas primeiras 24h de incubação, ECFF nas concentrações de 31,25 - 250µg/mL aumentou o percentual de viabilidade celular ($106,6 \pm 1,49\%$; $109,4 \pm 1,51\%$; $111,2 \pm 1,61\%$; $111,2 \pm 1,45\%$, respectivamente) em comparação ao grupo controle ($99,31 \pm 0,85\%$). Neste tempo de incubação, a concentração de 125µg/mL parece ter exercido um efeito máximo sobre as células, já que este efeito se manteve com o tratamento de 250 µg/mL.

A **Figura 19B** mostra que o tratamento com ECFF (31,25 - 250µg/mL: $113,7 \pm 2,18\%$; $115,4 \pm 2,63\%$; $116,3 \pm 1,96\%$; $118,6 \pm 1,87\%$, respectivamente) por 48h também manteve seu efeito sobre o aumento da viabilidade e proliferação celular em relação ao grupo controle ($100,0 \pm 1,03\%$). Após 72h de incubação com ECFF, os resultados foram semelhantes aos tempos anteriores, mas o aumento da viabilidade em todas as concentrações (31,25 - 250µg/mL: $124,0 \pm 1,63\%$; $124,3 \pm 1,87\%$; $126,1 \pm 2,36\%$; $131,0 \pm 2,24\%$, respectivamente) foi mais pronunciado em relação ao grupo controle ($100,0 \pm 1,43\%$) do que nos outros tempos de incubação (**Figura 19C**).

Figura 19 – Proliferação celular de queratinócitos humanos tratados com ECFF pelo método de SRB

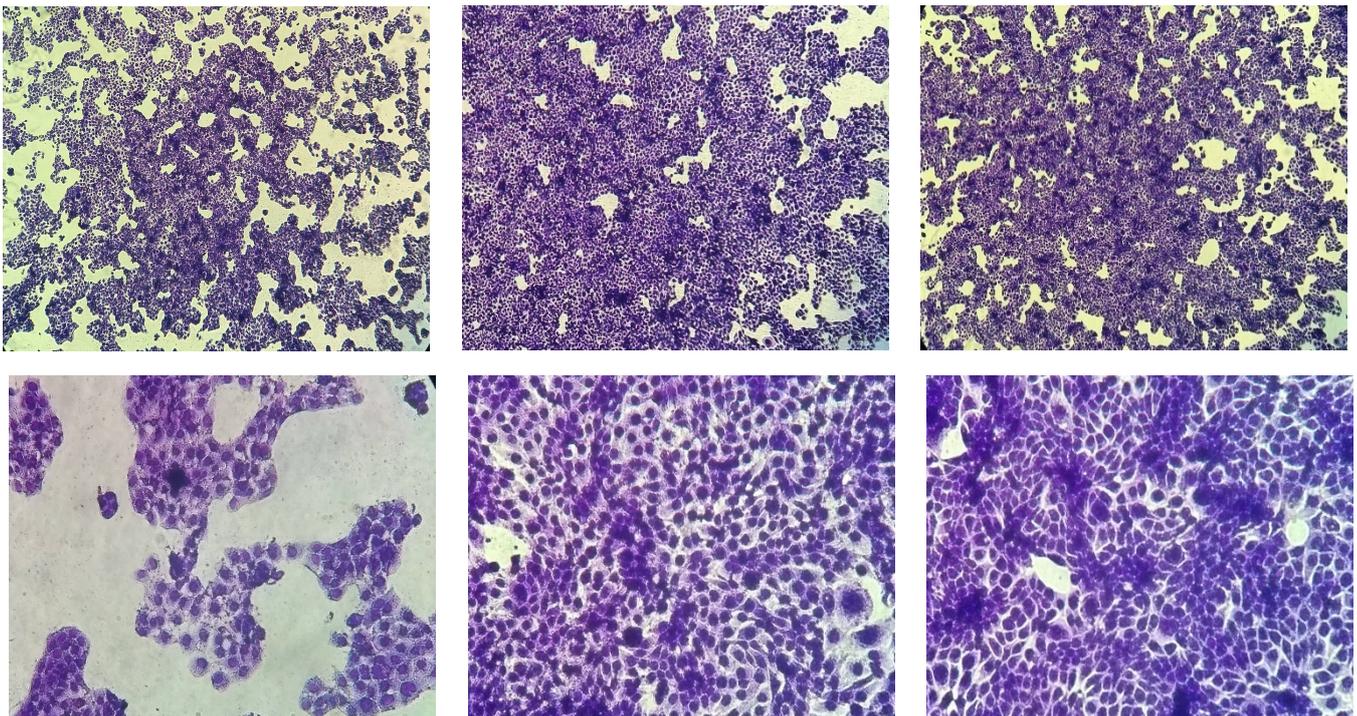


A viabilidade e proliferação celular de queratinócitos humanos HaCaT avaliada pelo método de SRB foi expressa após 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de incubação com ECFF (31,25 – 250µg/mL). Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como porcentagem média \pm erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p < 0,05$ representa diferença significativa em comparação ao grupo controle (veículo).

5.5.3. Coloração com Panótipo mostra aumento da densidade populacional de queratinócitos tratados com ECFE

Com o intuito de marcar as células e dar uma estimativa de proliferação celular foi utilizado o kit de corantes Panótipo Rápido. As células foram tratadas com ECFE nas concentrações de 62,5 e 125µg/mL, incubadas por 48h e fotografadas para observação do aumento na densidade populacional, nos aumentos de 40x e 200x (Figura 20). Foi possível visualizar nos grupos tratados com ECFE que a monocamada de células ocupou um maior espaço, devido ao maior espalhamento de células, ao mesmo tempo em que os espaços vazios foram menores e menos frequentes em relação ao grupo controle (veículo, água).

Figura 20 – Fotomicrografias de queratinócitos HaCaT tratados com ECFE por 48h



Fonte: Elaborada pelo autor.

As fotomicrografias foram tiradas em microscópio óptico invertido nos aumentos de 40x e 200x para visualização da densidade de queratinócitos após 48h de tratamento com ECFE 62,5 e 125µg/mL.

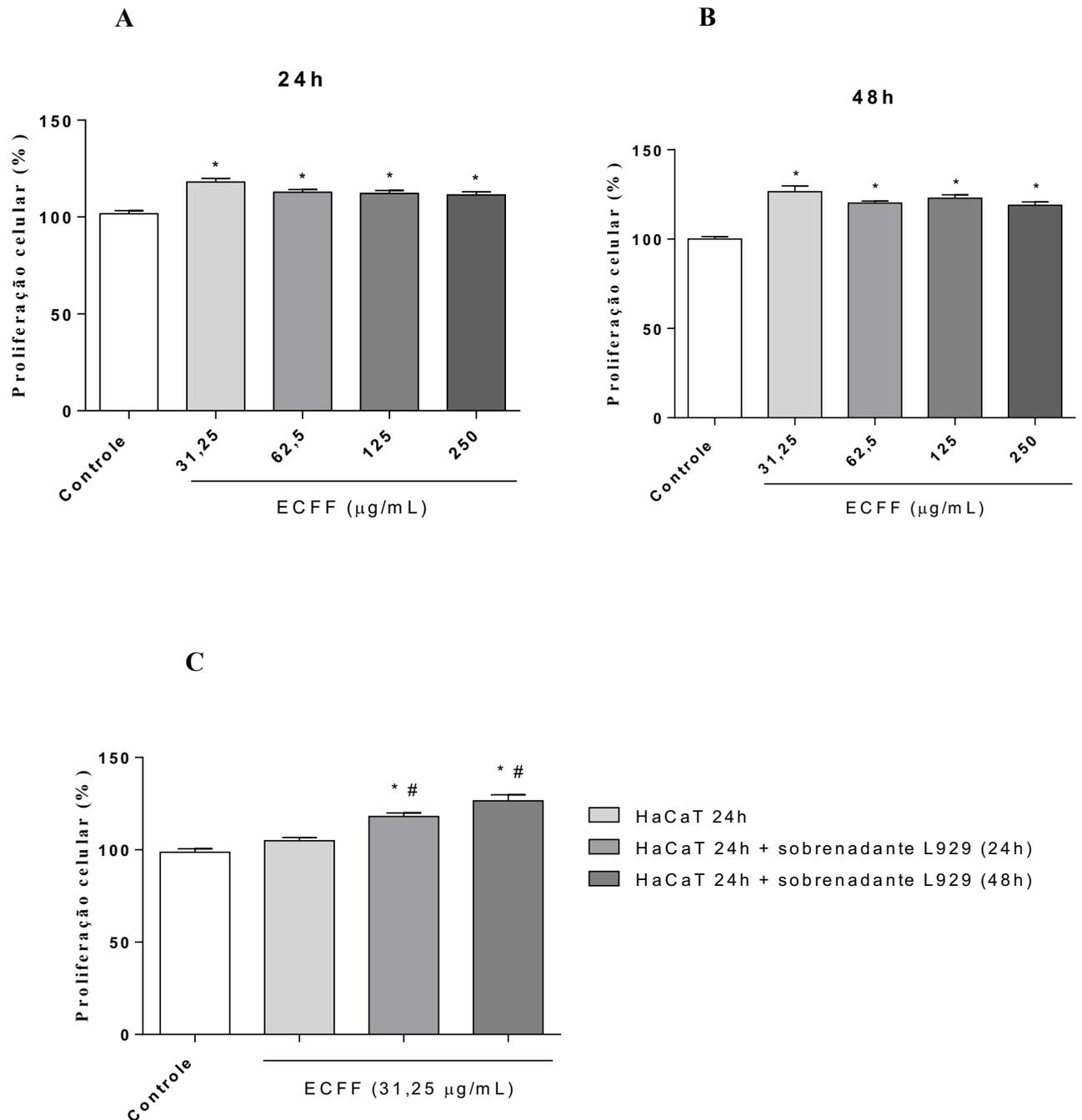
5.5.4. Tratamento com sobrenadante de fibroblastos L929 incubados com ECFF aumenta a proliferação de queratinócitos HaCaT

Sabendo que as células que participam do processo de cicatrização liberam diversos mediadores químicos que auxiliam na proliferação e funções de outros grupos celulares, foram investigados os possíveis efeitos dos mediadores liberados pelos fibroblastos L929 na proliferação de queratinócitos HaCaT, onde os queratinócitos foram tratados por 24h com o sobrenadante obtido do tratamento dos fibroblastos com ECFF por 24h e 48h.

Como demonstrado na **Figura 21A** todas as concentrações de tratamento de ECFF (31,25 - 250 μ g/mL) por 24h sobre fibroblastos estimularam a proliferação de queratinócitos (118,0 \pm 1,89%; 112,8 \pm 1,47%; 112,2 \pm 1,47%; 111,5 \pm 1,60%, respectivamente) de maneira significativa em relação ao grupo controle (101,7 \pm 1,60%). O mesmo efeito permaneceu com 48h de incubação de ECFF (31,25 - 250 μ g/mL: 126,5 \pm 3,22%; 120,2 \pm 1,11%; 122,9 \pm 1,90%; 118,9 \pm 1,95%, respectivamente) em relação ao grupo controle (100,0 \pm 1,44%) (**Figura 21B**).

Além disso, foi observado que a proliferação dos queratinócitos tratados com sobrenadante de L929, na concentração de 31,25 μ g/mL, após 24h (118,0 \pm 1,89%) e 48h (126,5 \pm 3,23%) de incubação foram aumentadas quando comparadas ao tratamento direto da HaCaT com ECFF na mesma concentração de 31,25 μ g/mL (104,9 \pm 1,75%) após 24h (**Figura 21C**). A partir desse resultado podemos sugerir que ECFF pode estimular fibroblastos a produzirem fatores de crescimento que podem aumentar a proliferação dos queratinócitos.

Figura 21 – Viabilidade celular de queratinócitos HaCaT após 24h de tratamento com sobrenadante de fibroblastos L929 incubados com ECFF pelo método de SRB



Após 24h de incubação com sobrenadante de fibroblastos tratados com ECFF (31,25 – 250μg/mL), por 24h (A) e 48h (B), a viabilidade dos queratinócitos foi avaliada pelo método de SRB. A concentração de 31,25μg/mL foi analisada individualmente (C), nos queratinócitos tratados diretamente com ECFF, e com o sobrenadante de L929 após 24 h e 48 h de incubação. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como porcentagem média ± erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. *p<0,05 representam diferença significativa em comparação ao grupo controle (veículo, água) e #p<0,05 representa diferença em comparação ao grupo tratado apenas com ECFF 31,25 μg/mL.

5.5.5. Ensaio de cicatrização *in vitro* em queratinócitos humanos HaCaT (*Scratch*)

5.5.5.1. ECFF induz aumento da proliferação e migração celular em queratinócitos

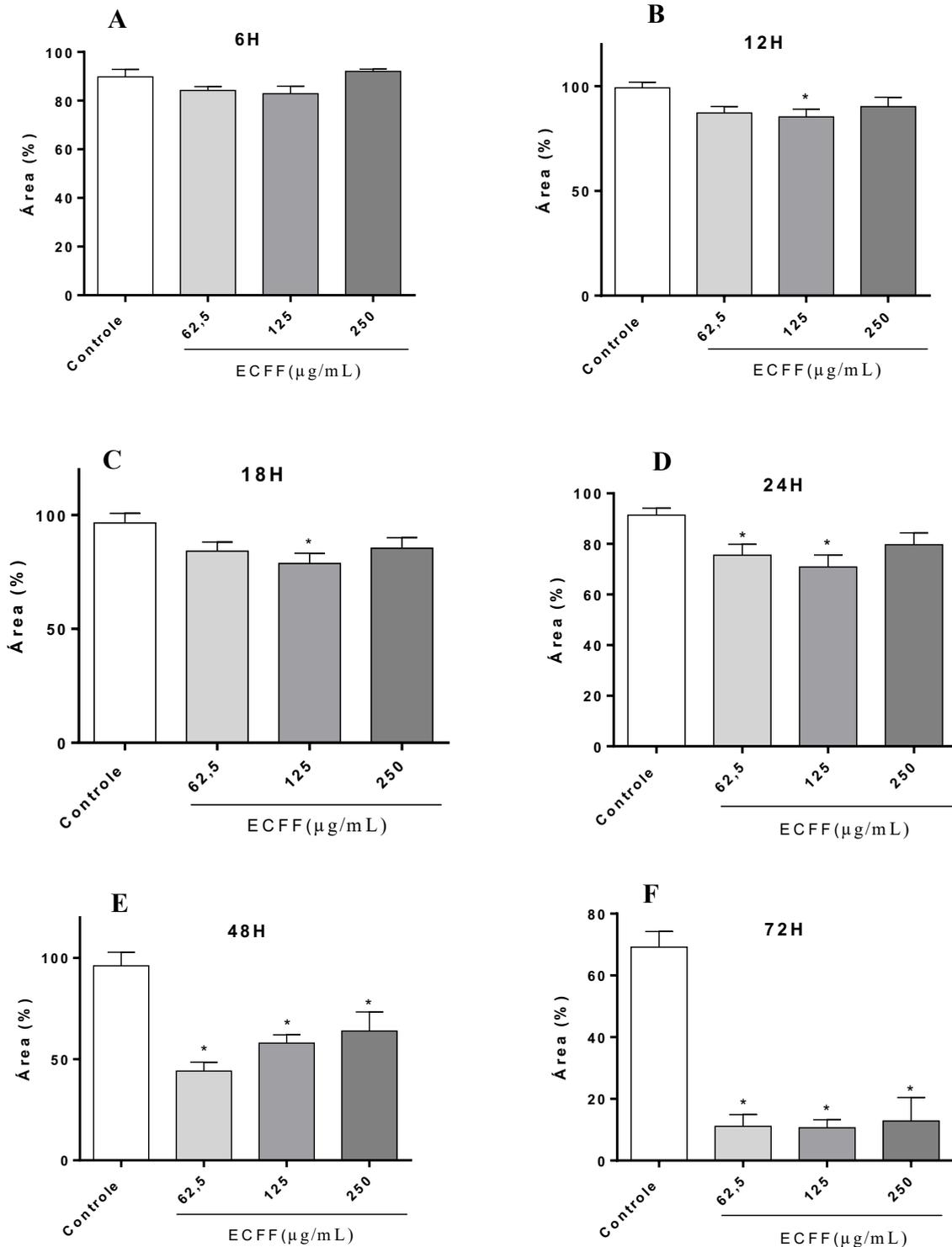
Para avaliar os efeitos de ECFF sobre o processo de cicatrização foi realizado o ensaio de cicatrização *in vitro*, que simula um ambiente de lesão epitelial, onde ocorre a ruptura da continuidade da camada de queratinócitos que proliferam e migram para ocupar novamente o espaço vazio produzido pelo “arranhão” ou *Scratch*.

Após 6h de incubação com ECFF, houve uma discreta diminuição do percentual de área aberta nas concentrações de 62,5 e 125µg/mL, mas esses resultados não foram significantes em relação ao grupo controle (veículo, água) (**Figura 22A**). A partir de 12h de incubação com ECFF, todas as concentrações tratadas apresentaram redução do percentual de área aberta, mas a concentração de 125µg/mL se destacou com resultados significantes ($85,35 \pm 3,71\%$) em relação ao grupo controle ($99,21 \pm 2,73\%$) (**Figura 22B**).

Após 18h de incubação com ECFF os resultados se mantiveram semelhantes, onde a concentração de 125µg/mL se destacou com resultados significantes ($78,77 \pm 4,47\%$) em relação ao grupo controle ($96,60 \pm 4,16\%$) (**Figura 22C**). Com 24h de incubação duas concentrações de ECFF se destacaram, 62,5µg/mL ($75,50 \pm 4,41\%$) e 125µg/mL ($70,86 \pm 4,78\%$) em relação ao grupo controle ($91,38 \pm 2,77\%$) (**Figura 22D**).

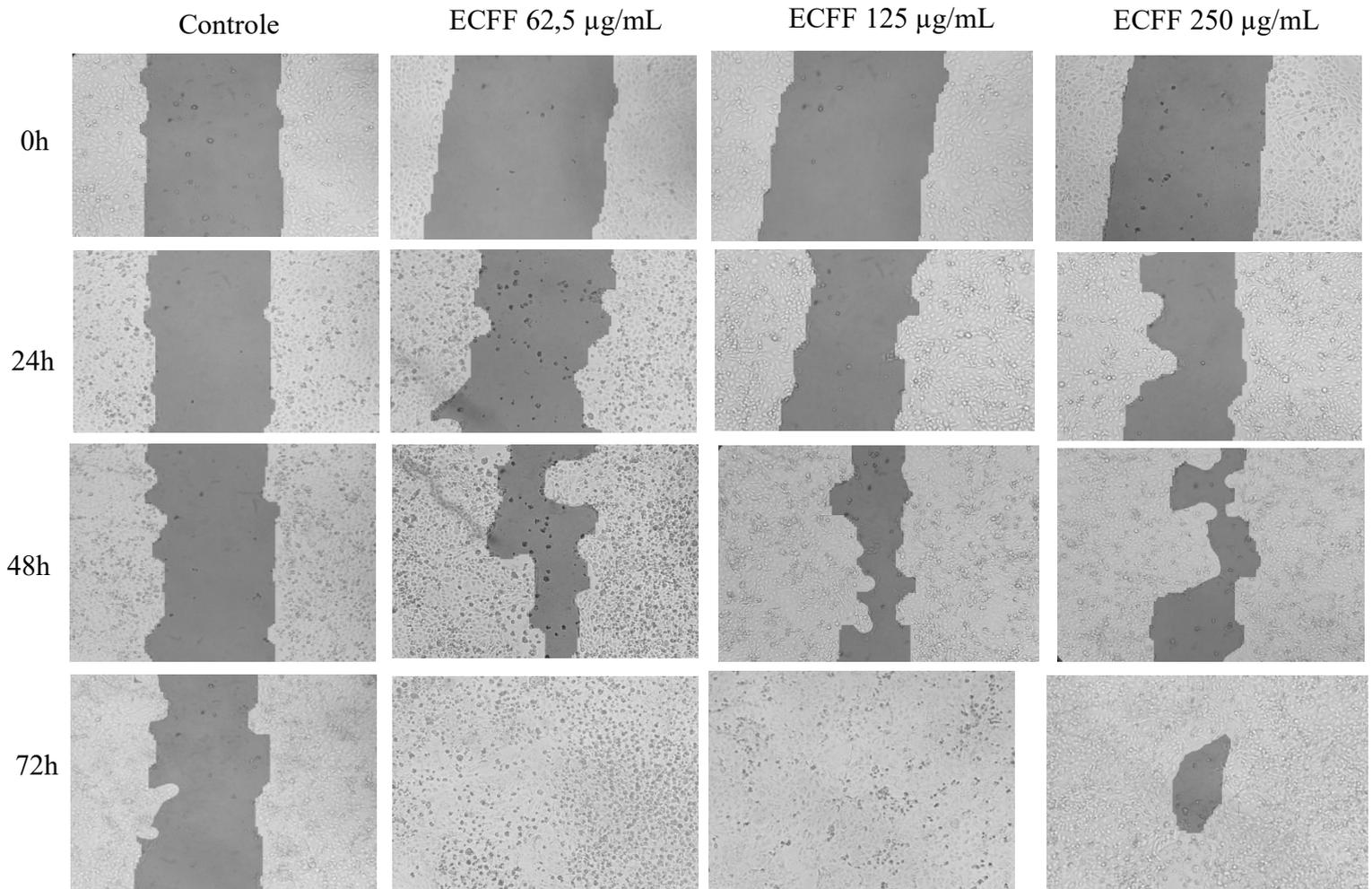
Resultados surpreendentes apareceram após 48h e 72h de incubação com ECFF (**Figuras 22E e F**), onde houve intensa redução da área aberta do *Scratch*, em todos os grupos tratados com o extrato. Todas as concentrações de ECFF (62,5 - 250 µg/mL) após 48h ($44,15 \pm 4,43\%$; $57,92 \pm 4,15\%$; $63,91 \pm 9,45\%$, respectivamente) e 72h ($11,08 \pm 3,79\%$; $10,66 \pm 2,56\%$; $12,85 \pm 7,55\%$, respectivamente) apresentaram resultados significantes em relação ao grupo controle (48h: $96,10 \pm 6,70\%$; $69,16 \pm 5,05\%$), apresentando em alguns poços completa cicatrização e fechamento do *Scratch*. Dessa forma, os resultados demonstraram que ECFF foi capaz de atuar sobre a proliferação e migração de queratinócitos. As fotomicrografias produzidas pela avaliação de área aberta do software TSCRATCH® foram ilustradas de forma representativa na **Figura 23**.

Figura 22 – Proliferação e migração celular de HaCaT no ensaio do *Scratch* após tratamento com ECFE



O *Scratch* foi produzido nos queratinócitos, fotografado no tempo zero e acompanhados após 6h (A), 12h (B), 18h (C), 24h (D), 48h (E) e 72h (F) no aumento de 200x, para análise de área aberta (%) através do programa TSCRATCH®. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como porcentagem média \pm erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p < 0,05$ representam diferença significativa em comparação ao grupo controle (veículo, água).

Figura 23 – Fotomicrografias produzidas pelo ensaio do *Scratch* em HaCaT após tratamento com ECFE



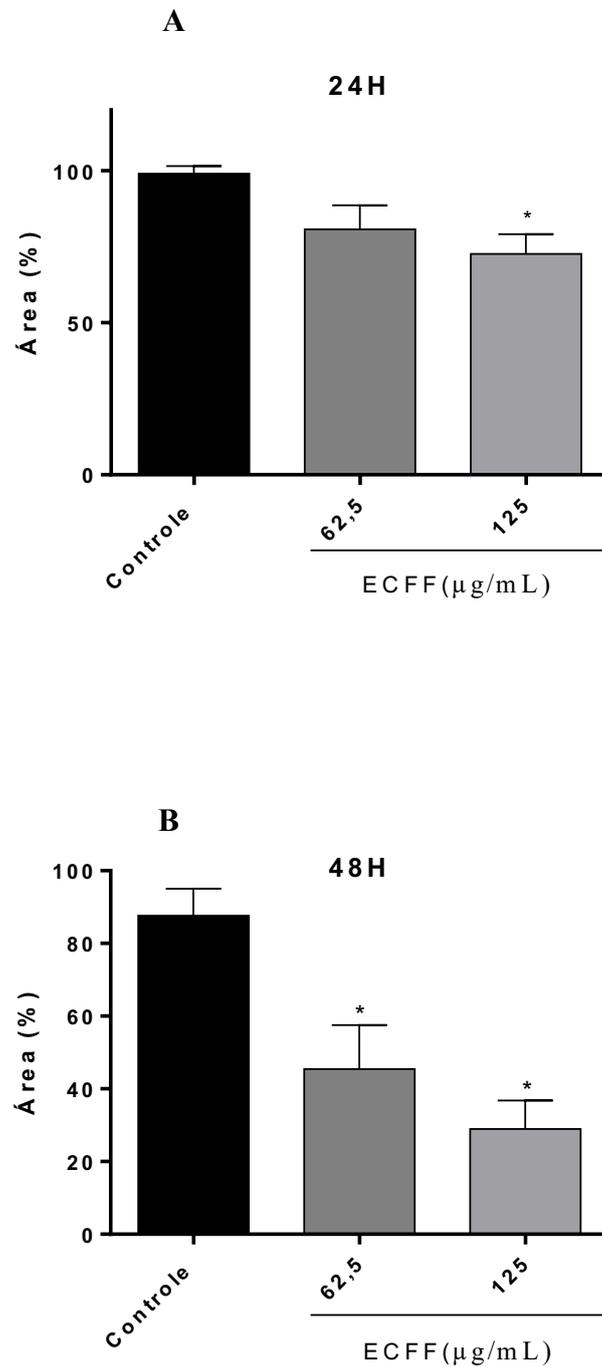
O *Scratch* foi produzido nos queratinócitos, e fotomicrografias dos tempos de 0, 24h, 48h e 72h no aumento de 200x foram analisadas através do programa TSCRATCH® e representadas na figura. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como porcentagem média \pm erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p < 0,05$ representam diferença significativa em comparação ao grupo controle (veículo, água).

5.5.5.2. Tratamento com ECFF aumenta a migração de queratinócitos

Com o intuito de avaliar exclusivamente o processo de migração dos queratinócitos foi utilizada a Mitomicina C (10 $\mu\text{g/mL}$), um agente que inibe a proliferação celular. As melhores concentrações de ECFF (62,5 e 125 $\mu\text{g/mL}$), encontradas no ensaio de cicatrização *in vitro*, foram escolhidas para este ensaio e avaliadas por 24h e 48h de incubação.

Como demonstrado na **Figura 24A e B**, as duas concentrações de ECFF utilizadas para o tratamento reduziram a área de *Scratch* em 24 e 48h de incubação, no entanto 125 $\mu\text{g/mL}$ foi eficiente em estimular a migração das células para o centro da área aberta, após 24h ($72,66 \pm 6,49$) e 48h ($28,96 \pm 7,87$) de incubação em comparação ao grupo controle (24h: $99,04 \pm 2,50$; 48h: $87,58 \pm 7,46$ respectivamente). A concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ também apresentou resultados significantes com 48h de incubação apresentando $45,45 \pm 12,07\%$ de área aberta. Dessa forma, ECFF mostrou ser eficiente além da proliferação, também no processo de migração de queratinócitos.

Figura 24 – Migração celular da HaCaT tratada com ECFF após ensaio de *Scratch*

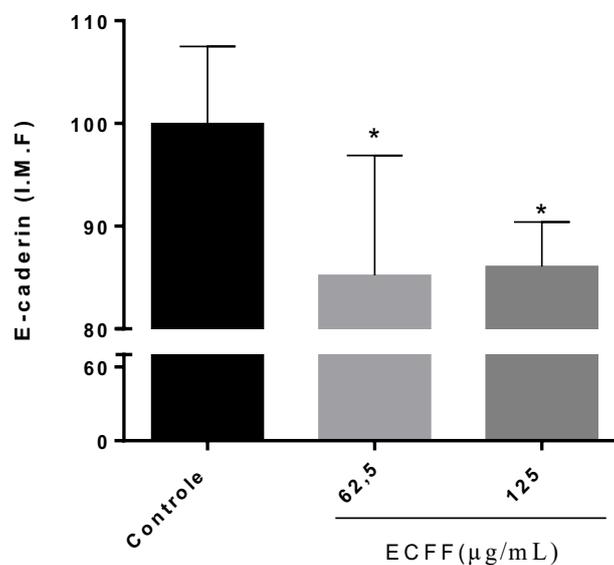


O *Scratch* foi produzido nos queratinócitos, fotografado no tempo zero e acompanhados após 24h (A) e 48h (B) no aumento de 200x, para análise de área aberta (%) através do programa TSCRATCH®. A mitomicina (10 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada neste ensaio para inibir a proliferação celular e assim permitir a avaliação somente da migração dos queratinócitos. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como porcentagem média \pm erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p < 0,05$ representam diferença significativa em comparação ao grupo controle (veículo, água).

5.5.5.3. *ECFF diminuiu a expressão de E-caderina em queratinócitos por citometria de fluxo*

Para investigar o mecanismo de ação da estimulação de ECFF sobre a migração de queratinócitos HaCat foi realizada a quantificação de E-caderina por citometria de fluxo após 48h de tratamento com o extrato no ensaio de *Scratch* (estímulo migratório). Pode-se observar na **Figura 25** que ECFF foi capaz de diminuir a expressão de E-caderina nos dois grupos tratados (62,5 e 125µg/mL) de maneira significativa ($85,21 \pm 5,22$ e $86,06 \pm 1,77$, respectivamente) em relação ao grupo controle ($100,0 \pm 2,83$). Dessa forma, os resultados sugerem que ECFF apresenta um importante efeito sobre a migração de queratinócitos e que este parece ocorrer pelo menos em parte pela diminuição da expressão da proteína de adesão E-caderina.

Figura 25 – Efeito de ECFF sobre a expressão de E-caderina em HaCaT



Após o Scratch, o tratamento com ECFF 62,5 e 125µg/mL foi realizado por 48h, sendo posteriormente as células marcadas com anticorpo anti-E-caderina e levadas ao citômetro de fluxo para avaliação de intensidade de fluorescência. Foram realizados dois experimentos independentes e os resultados foram expressos como intensidade média de fluorescência (I.M.F.) ± erro padrão da média. Os dados foram normalizados para o percentual de I.M.F. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. *p<0,05 representam diferença significativa em comparação ao grupo controle (veículo, água).

5.6. Protocolo de cicatrização de feridas excisionais em camundongos

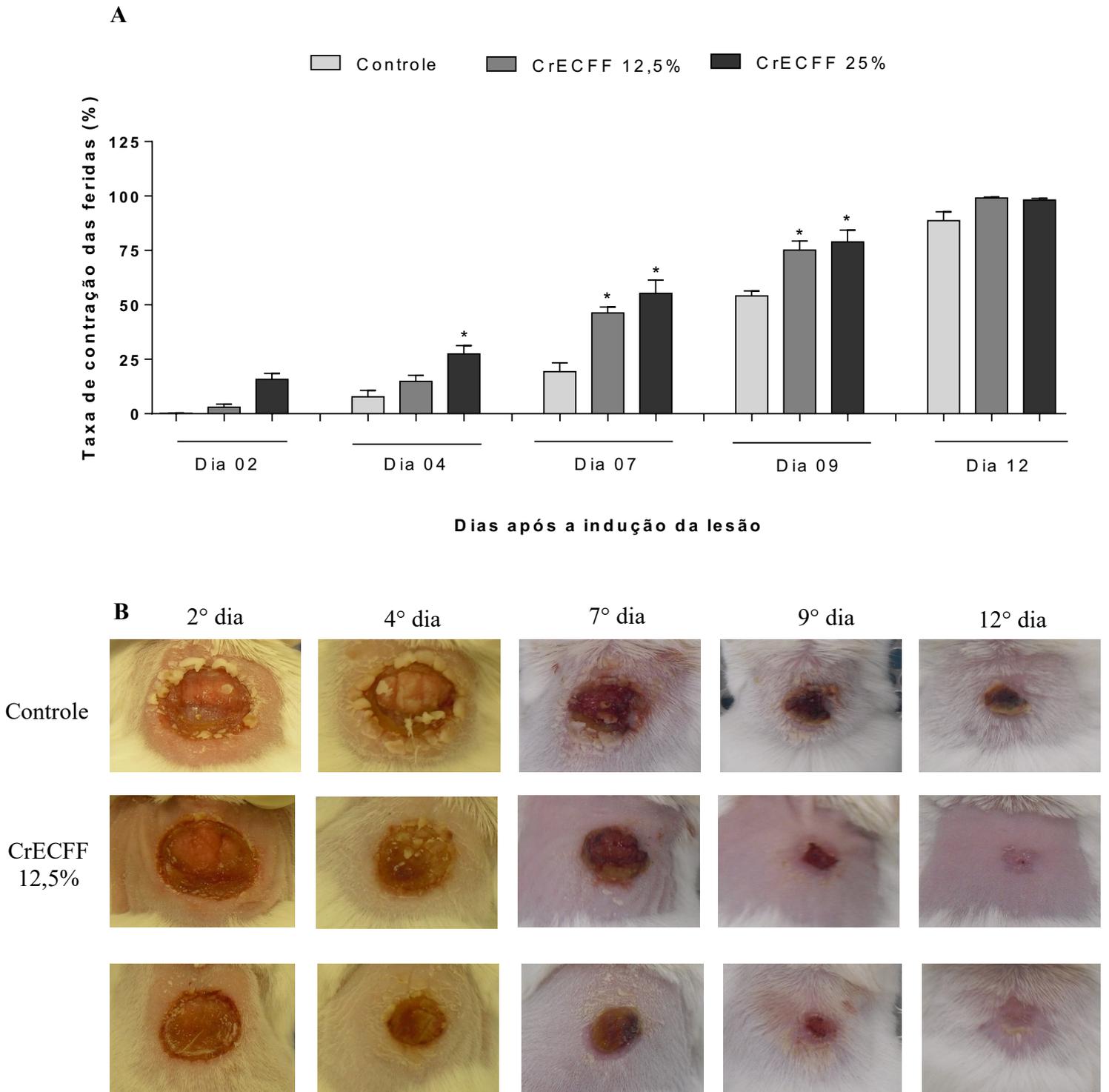
5.6.1. *O tratamento tópico com CrECFF foi capaz de reduzir a área das feridas excisionais*

A contração das lesões foi mensurada com paquímetro digital após 2, 4, 7, 9 e 12 dias de tratamento com CrECFF ou veículo (controle) com o intuito de acompanhar a evolução das feridas em todos os estágios da cicatrização (**Figura 26A**). As lesões também foram acompanhadas por fotografias, sendo uma ferida por grupo experimental ilustrada de forma representativa da sua evolução durante o processo cicatricial (**Figura 26B**).

No 2º dia de tratamento, o grupo CrECFF 25% ($15,74 \pm 2,71\%$) demonstrou aumento no percentual de contração da lesão quando comparado ao grupo controle, veículo ($0,18 \pm 0,18\%$), no entanto esse resultado não foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$). Após o 4º dia de tratamento, ambos os grupos tratados com CrECFF (12,5 e 25%) apresentaram aumento na contração das feridas induzidas ($14,86 \pm 2,80\%$ e $27,46 \pm 3,87\%$, respectivamente) quando comparadas ao grupo controle ($7,76 \pm 2,88\%$), porém apenas a dose de 25% apresentou resultado significativo.

Após sete dias de tratamento, os efeitos produzidos pelo CrECFF 12,5% ($46,31 \pm 2,69\%$) e CrECFF 25% ($55,27 \pm 6,15\%$) foram ainda mais expressivos e significativamente diferentes em relação grupo controle ($19,34 \pm 4,03\%$). Resultados semelhantes foram encontrados após o 9º dia de tratamento com CrECFF 12,5% ($75,18 \pm 4,1\%$) e CrECFF 25% ($78,93 \pm 5,38\%$) em relação ao grupo controle ($54,13 \pm 2,29\%$). Já no 12º dia de análise os grupos tratados não apresentaram diferenças significativas entre si.

Figura 26 – Efeito de CrECFF sobre a contração de feridas excisionais em camundongos



O percentual de contração das feridas (A) e fotografias (B) foram expressas após o 2°, 4°, 7°, 9° e 12° dia de indução das lesões. Os animais foram tratados com aplicação única diária de cremes dermatológicos de CrECFF 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. * $p < 0,05$ representa diferença significativa em comparação ao grupo controle (n=10 animais/grupo).

5.6.2. Efeito de CrECFF na remodelação de feridas excisionais em camundongos

Os tecidos que foram coletados para análise histológica revelaram que no 2º dia de avaliação, todos os grupos experimentais apresentavam-se histologicamente similares com a presença de infiltrado inflamatório agudo e úlcera, não havendo diferenças estatísticas. No 7º dia, o grupo controle (veículo) ainda apresentava úlcera e tecido de granulação, com presença de infiltrado inflamatório agudo. Já o grupo tratado com CrECFF 25% foi capaz de estimular a formação de um novo epitélio que recobriu a úlcera, além de apresentar uma transição do infiltrado inflamatório agudo para crônico e o desenvolvimento de um tecido conjuntivo remodelado (**Tabela 4**).

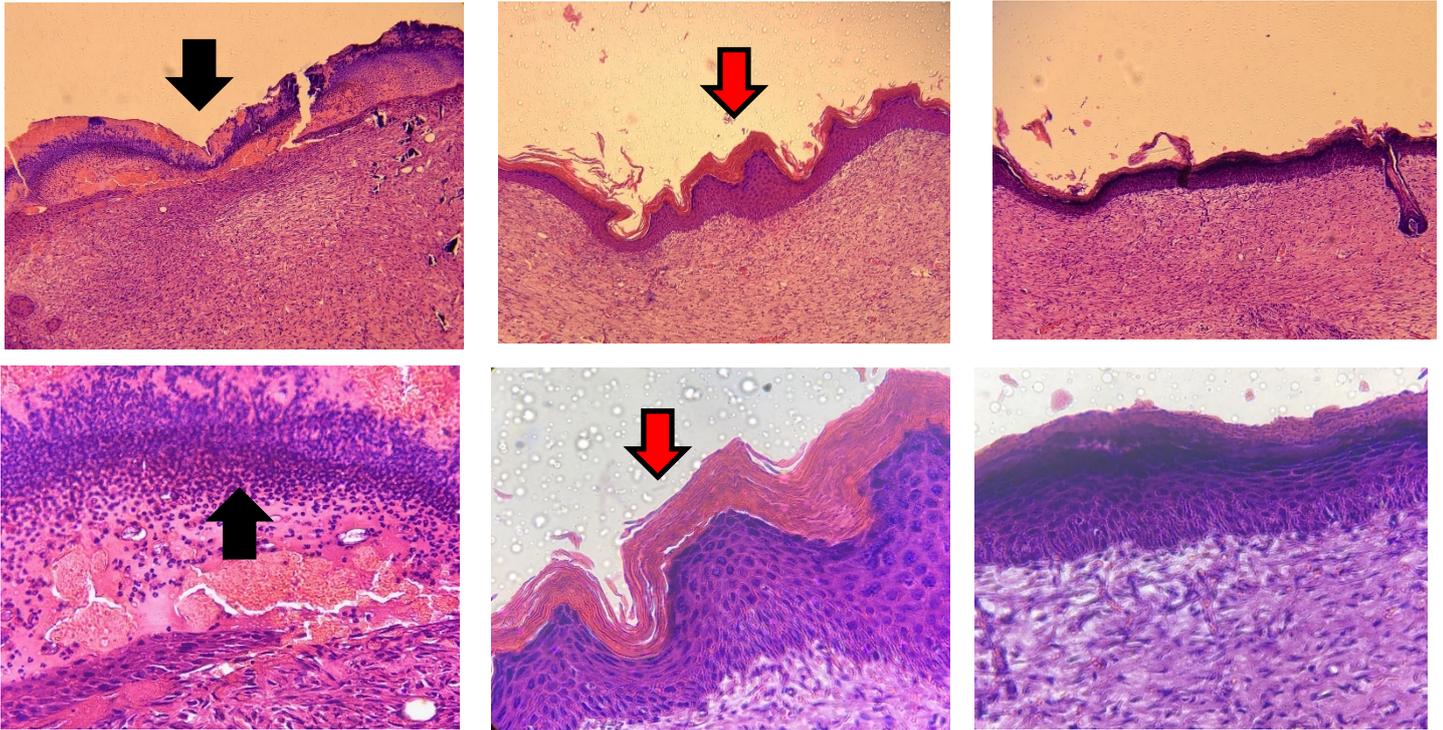
Após o 12º dia de tratamento, o grupo controle apresentou área ulcerada com presença de membrana granulocítica e processo de reepitelização incompleto. Os grupos tratados com CrECFF apresentaram reepitelização completa, ausência de membrana granulocítica e presença de camada córnea revestindo o epitélio. Dessa forma acreditamos que o tratamento com CrECFF favoreceu a cicatrização em comparação ao grupo controle (**Tabela 4 e Figura 27**).

Tabela 4. Representação por escores da análise histológica das feridas excisionais em camundongos

Tratamento			
X	Controle (veículo)	CrECFF 12,5%	CrECFF 25%
Período (dias)			
2º	4,0 (4)	4,0 (4)	4,0 (4)
7º	3,4 (1-4)	3,0 (1-4)	0,8 (0-1) *
12º	1,286 (0-4)	0,4615 (0-2) *	0,4545 (0-1) *

Os resultados foram expressos pela média e intervalo mínimo e máximo de escores adotados no grupo experimental. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. *p<0,05 representa diferença significativa em comparação ao grupo controle (n=5 animais/grupo).

Figura 27. Representação histológica do epitélio de camundongo com ferida excisional após 12 dias de tratamento com CrECFF



Fonte: Elaborada pelo autor

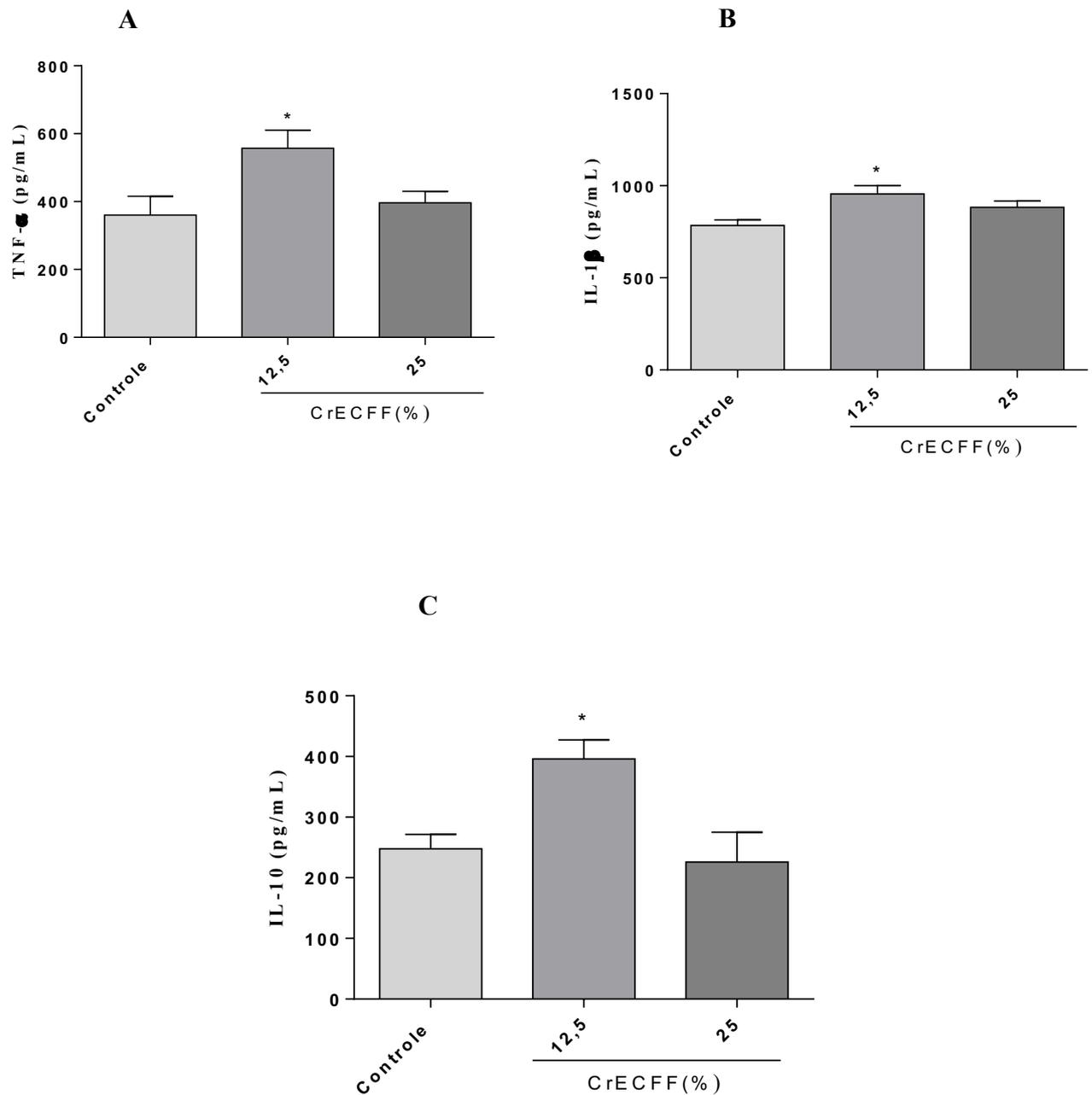
Efeito do CrECFF após 12 dias de tratamento através de análise histológica. Os tecidos provenientes das feridas foram retirados e fixados em paraformaldeído e corados com H&E para análises histopatológicas (ampliação original $\times 100$ e $\times 400$). As setas pretas no grupo controle indicam a presença de área ulcerada com presença de membrana granulocítica e processo de reepitelização incompleto, além de infiltrado inflamatório crônico. Os grupos tratados com CrECFF apresentaram reepitelização completa, ausência de membrana granulocítica e presença de camada córnea revestindo o epitélio, representadas pelas setas em vermelho.

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

Após o 2º dia de tratamento com CrECFF na dose de 12,5 e 25%, constatamos que este foi capaz de aumentar os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α ($557,2 \pm 53,1$; $396,0 \pm 34,0$ pg/mL, respectivamente) e IL1- β ($955,0 \pm 45,1$; $883,0 \pm 34,4$ pg/mL, respectivamente) em relação ao grupo controle (TNF- α : $360,1 \pm 55,8$; IL1- β : $784,8 \pm 29,5$ pg/mL), no entanto apenas a dose de 12,5% apresentou resultados significantes ($p < 0,05$) (**Figura 28A e B**). Além disso, o tratamento com CrECFF na dose de 12,5% ($396,1 \pm 31,4$ pg/mL) foi capaz de alterar de maneira significativa os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 em relação ao grupo controle ($247,6 \pm 23,9$ pg/mL) (**Figura 28C**).

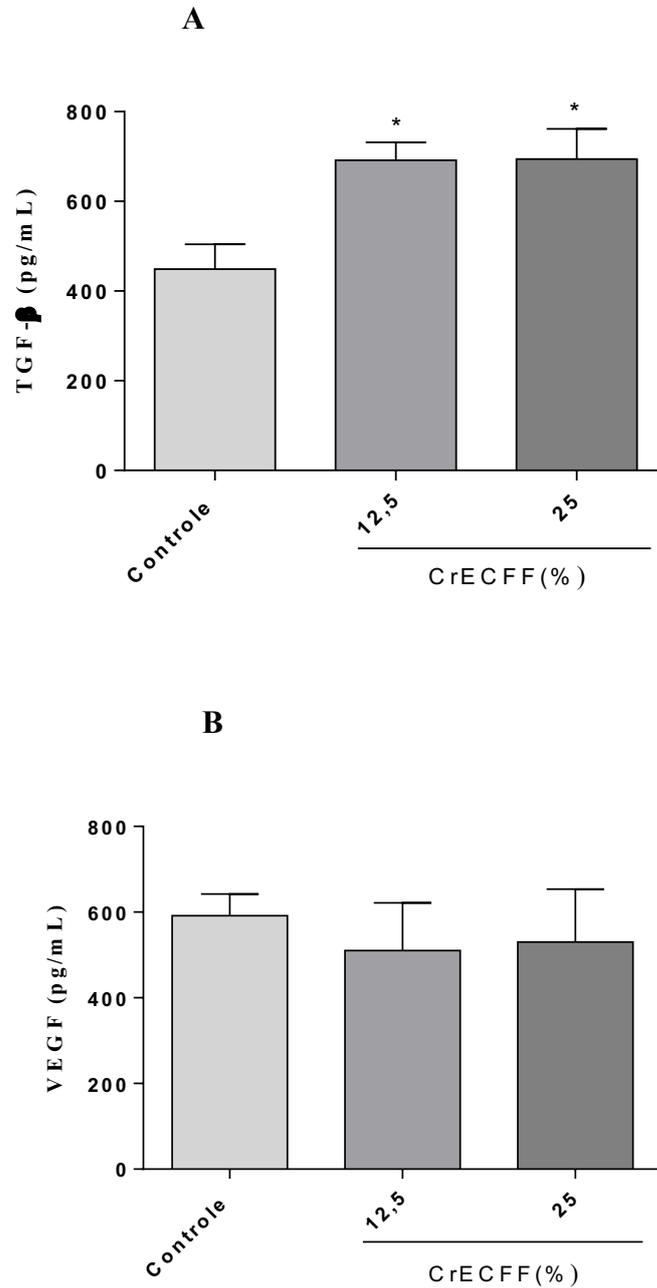
Após 7 dias de tratamento, CrECFF 12,5 e 25% foi capaz de aumentar os níveis do fator de crescimento TGF- β de maneira expressiva ($691,3 \pm 40,1$; $694,2 \pm 67,2$ pg/mL respectivamente) e significativa em relação ao grupo controle ($448,8 \pm 55,7$ pg/mL) mas não aumentou os níveis do fator de angiogênese VEGF (**Figura 29A e B**)

Figura 28 – Níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 após 2 dias de tratamento com CrECFF



Os mediadores TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-10 (C) foram mensurados no homogenato de tecido produzido após coleta da lesão dos animais após 2 dias de tratamento com CrECFF. 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 controle, veículo (n=5 animais/grupo).

Figura 29 – Níveis dos fatores de crescimento TGF- β e VEGF após 7 dias de tratamento com CrECFF



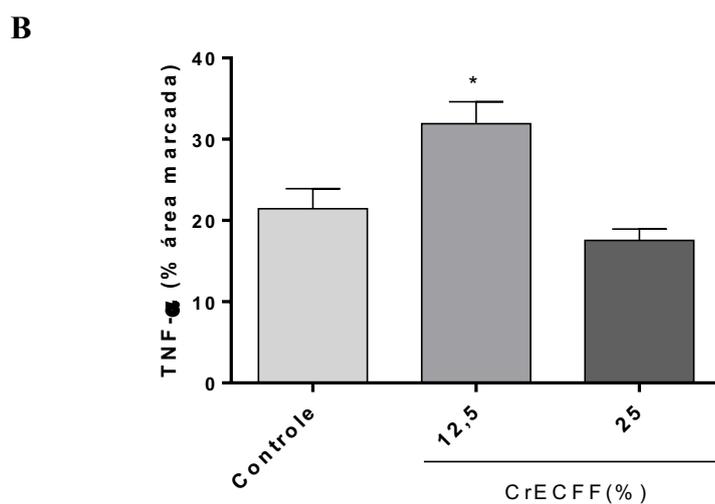
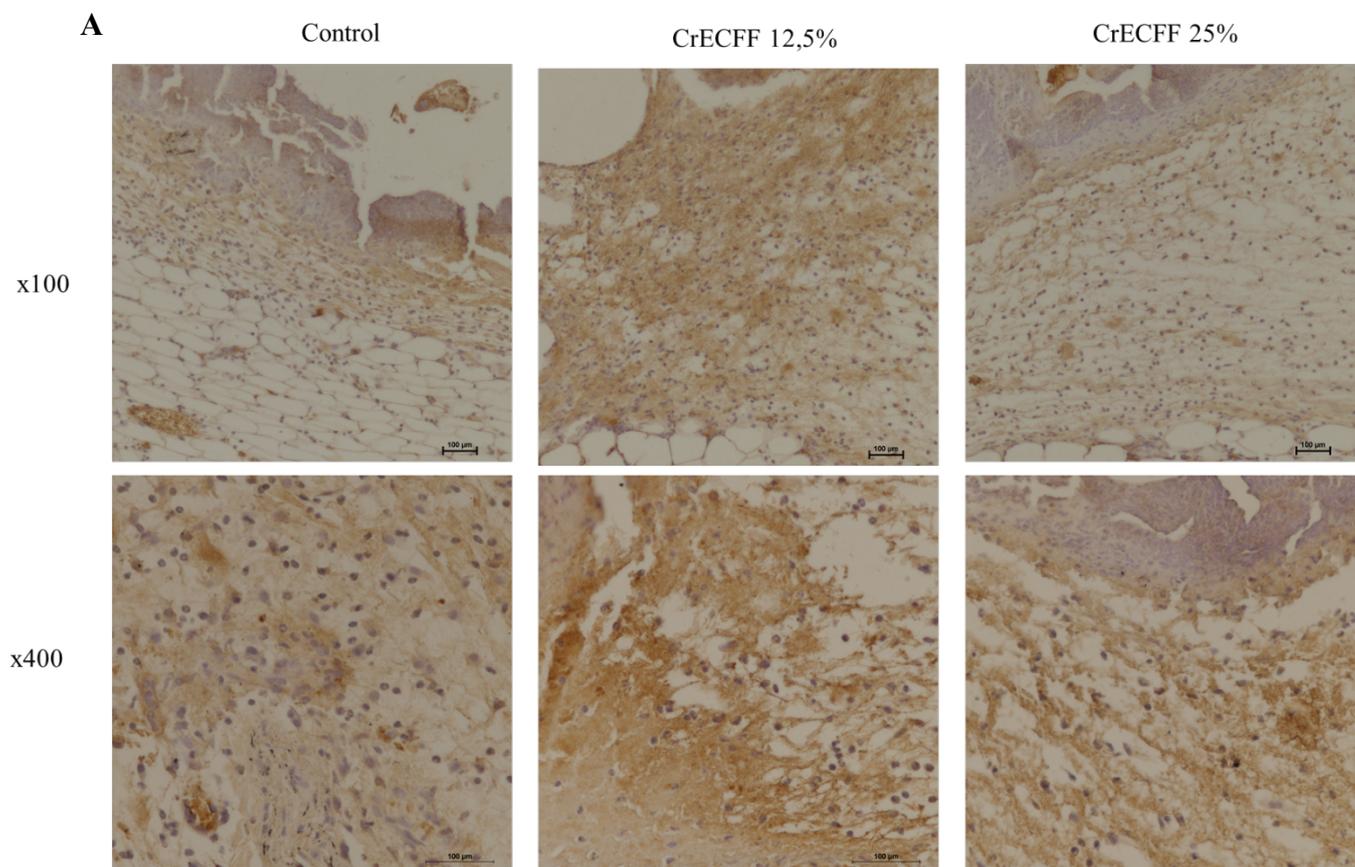
Os mediadores TGF- β (A) e VEGF (B) foram mensurados no homogenato de tecido produzido após coleta da lesão dos animais após 7 dias de tratamento com CrECFF. Os resultados (picograma/mL) foram expressos pela média \pm E.P.M. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Tukey. * $p < 0,05$ representa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

5.6.4. Tratamento com CrECFF aumenta a imunomarcção de TNF- α no epitélio de camundongos submetidos à feridas excisionais

A marcação de TNF- α em amostras do tecido epitelial de camundongos foi realizada dois dias após cirurgia de indução de feridas excisionais e tratamento com CrECFF ou veículo. A marcação foi realizada através de imunohistoquímica e os resultados obtidos foram apresentados na **Figura 30A e B**.

A análise da marcação no tecido epitelial dos animais do grupo tratado com CrECFF na dose de 12,5% apontou uma maior imunomarcção para TNF- α ($31,9 \pm 2,7$ % de área marcada) quando comparado ao grupo controle ($21,5 \pm 2,5$ % de área marcada) e os resultados foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). O tratamento de CrECFF na dose de 25% diminuiu a imunomarcção para TNF- α ($17,5 \pm 1,4$ % de área marcada) mas os resultados não foram significantes em relação ao grupo controle.

Figura 30 – Imunomarcção para TNF- α no epitélio de camundongos submetidos à feridas excisionais após 2 dias de tratamento com CrECFF



Os tecidos provenientes das feridas foram retirados e utilizados para a confecção das lâminas. (A) As fotomicrografias (100x e 400x) da imunohistoquímica para TNF- α revelaram intensa marcação no grupo CrECFF 12,5% quando comparado ao controle. (B) A intensidade da imunomarcção foi quantificada no software ImageJ e os resultados expressos como média \pm E.P.M do percentual (%) de área marcada. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Tukey. * $p < 0,05$ representa a diferença significativa em comparação ao grupo controle, veículo (n=5 animais/grupo).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo elucidou pela primeira vez o efeito do extrato etanólico padronizado das flores de *Cassia fistula* Linn (ECFF) na cicatrização de feridas *in vitro*, por meio da avaliação do seu efeito em fibroblastos (L929), macrófagos (Raw 264.7) e queratinócitos (HaCaT), além dos seus efeitos *in vivo*, em feridas excisionais em camundongos, bem como os mecanismos de ação envolvidos.

Sabe-se que a indústria farmacêutica utiliza amplamente as plantas medicinais como fontes de matéria-prima para a extração de princípios ativos e para a produção de derivados vegetais: tinturas, xaropes, chás, extratos fluidos e secos. Os metabólitos secundários isolados dessas plantas são ainda comercializados como fitofármacos ou usados como protótipos para a síntese de novos compostos. No entanto, para que possam atender aos requisitos de qualidade, efetividade e segurança exigidos pelos órgãos regulatórios, os extratos vegetais devem estar em uma forma padronizada, com a caracterização qualitativa e quantitativa dos seus princípios ativos, podendo assim serem considerados e comercializados como medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2014; WILLS; BONE; MORGAN, 2000).

Segundo a RDC 26/2014 da ANVISA, droga vegetal é o nome dado à planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias responsáveis pela sua ação terapêutica, após processos de coleta/colheita, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (BRASIL, 2014). Esse processo de transformação da planta medicinal em droga vegetal é imprescindível para que seja garantida a qualidade do medicamento fitoterápico que se deseja produzir. A constatação do excesso de umidade nas amostras em estudo pode favorecer a ação de enzimas, podendo acarretar na degradação dos constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias, alterando assim, a qualidade do material vegetal (AMARAL *et al.*, 2003).

Diante disso, a primeira etapa da padronização e controle de qualidade do material vegetal deve começar pela preparação da droga vegetal. De acordo com a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010), a droga vegetal deve conter entre 8 e 14% de umidade para que seja evitada a contaminação microbiológica. Após 48h de secagem, as flores de *Cassia fistula*, através do método gravimétrico, mostraram um percentual de umidade de $10,9 \pm 0,35\%$. Outros autores também já demonstraram a importância da padronização da droga vegetal, como a obtida de espécies de importância para a medicina popular, tais como *Amburana cearensis* (cumaru) cultivada, *Justicia pectoralis* (chambá), *Erythrina velutina* (mulungu) e mostraram

que esta padronização pode influenciar diretamente na qualidade do produto final (FONSECA, 2009; LIMA, 2013; SILVA, 2012).

No presente estudo, ECFE foi obtido pelo método de Soxhlet, que utiliza o aumento da temperatura para favorecer a extração de princípios ativos e é caracterizado pela extração completa até esgotamento da droga vegetal. Após a extração, foi realizada a caracterização fitoquímica do extrato, além da quantificação dos seus teores de fenóis e flavonoides totais. Para identificar a presença dos grupos químicos presentes em ECFE foram realizadas reações colorimétricas conforme descrito por Matos (2009). Os resultados revelaram a presença de várias classes de metabólitos secundários, como flavonoides, alcalóides, taninos e antraquinonas. Nossos resultados estão de acordo com outros autores (JARALD *et al.*, 2013; PRIYADHARSHINI; SUJATHA, 2012) que também mostraram a presença desses metabólitos nas flores de *Cassia fistula*.

De acordo com o método espectrofotométrico utilizando reagente de Folin, ECFE apresentou um teor de fenóis totais em torno de $128,00 \pm 0,14$ mg EGA/g, resultado superior ao obtido por Barnaby e colaboradores (2016) que mostraram que o mesmo tipo de extrato das flores de *C. fistula* apresentou menores níveis de fenóis totais, em torno de $54,05 \pm 5,09$ mg EGA/g, utilizando um método de extração à temperatura ambiente (BARNABY; REID; WARREN, 2016). Sugerimos assim, que possivelmente a temperatura utilizada para a extração e obtenção de ECFE utilizada neste trabalho, favoreceu a extração de fenóis totais.

Ácidos fenólicos e flavonóides são conhecidos por sua atividade antioxidante atuando na depleção de radicais livres, que estão envolvidos em vários processos patológicos no organismo (HUYUT; BEYDEMIR; GÜLÇİN, 2017). Acredita-se que a terapia antioxidante tenha benefícios significativos no processo de reparo de feridas cutâneas relacionadas ao estresse oxidativo (KANT *et al.*, 2014; PINNELL, 2003). Limtrakul e colaboradores (2016) demonstraram que o extrato butanólico das flores de *C. fistula* apresentou atividade antienvhecimento e aumento da produção de colágeno que pode estar associada à presença de seus marcadores químicos, que são compostos fenólicos: ácido protocatecúico, ácido vanílico, ácido clorogênico e ácido ferúlico. Portanto, acreditamos que os ácidos fenólicos e flavonóides presentes em ECFE podem ter contribuído para o efeito cicatrizante demonstrado neste estudo.

A cromatografia de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massa (UPLC-ESI-QTOF MS/MS) tem sido aplicada com sucesso na identificação de compostos químicos em materiais vegetais (HERNÁNDEZ *et al.*, 2018). No presente estudo, utilizamos esta técnica

para identificação dos componentes químicos presentes em ECFF baseando-se nos espectros de massa obtidos, em comparação com a literatura científica. Nossos resultados mostraram a presença de rutina, kaempferol-3-O-rutinosídeo, kaempferol e réina em ECFF. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos anteriores que demonstraram que as flores de *Cassia fistula* possuem antraquinonas, taninos, óleos voláteis, réina (CHOPRA; NAYAR, 1956), kampferol, triterpenos, fistulina e rutina (CHANDRA *et al.*, 2015; KUMAR, A.; PANDE; KAUL, 1966) em sua composição.

Alguns trabalhos relataram que os compostos químicos rutina, kaempferol-3-O-rutinosídeo, kaempferol e réina possuem atividade cicatrizante (ALMEIDA *et al.*, 2012; ASFOUR *et al.*, 2017; ATARZADEH *et al.*, 2017; PETPIROON *et al.*, 2015; SEO *et al.*, 2016; TRAN *et al.*, 2011) sendo todos estes identificados em ECFF. Dessa forma, sugerimos que o efeito cicatrizante de ECFF pode ser atribuído, pelo menos em parte, à presença dessas moléculas no extrato.

Estudos em cultura de células estão entre as abordagens laboratoriais mais amplamente utilizadas graças a diversos aspectos, que vão desde a minimização do uso de animais, ao período relativamente curto de tempo necessário para obtenção dos resultados. Em farmacologia e pesquisas terapêuticas, a cultura celular tem como um dos seus principais objetivos identificar compostos ativos a partir de elementos naturais, que podem constituir um ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos (DOKE; DHAWALE, 2015; GHANEMI, 2015). Dentre as diversas linhagens utilizadas para investigação do processo de cicatrização de feridas estão: fibroblastos de linhagens murinas (L929, C3H-L, Balb/c 3T3), fibroblastos cultivados de pele humana, células epiteliais humanas (HeLa); queratinócitos humanos (HaCaT), macrófagos e linfócitos T (WIEGAND; HIPLER, 2008).

Dois ensaios de viabilidade celular com princípios distintos foram escolhidos para avaliar o efeito de ECFF em fibroblastos murinos (L929) e queratinócitos humanos (HaCaT). O ensaio de MTT avalia a viabilidade celular através da função mitocondrial, pela transformação do reagente de MTT para sal de formazan por mitocôndrias viáveis. O método de SRB avalia, além da viabilidade, a proliferação celular, através da quantificação de proteínas por se ligar aos aminoácidos de células viáveis. O método de SRB é considerado mais sensível, reprodutível e linear do que o de MTT, que pode ter interferência de drogas antioxidantes que induzem o metabolismo mitocondrial, revelando um resultado falso positivo em relação à proliferação (VAN TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015). Isso foi demonstrado por Bruggisser e colaboradores (2002), que obtiveram resultados conflitantes quando analisaram os

efeitos do kampferol sobre a proliferação de células de câncer de mama, através dos ensaios de coloração com cristal violeta e de MTT. Os autores mostraram que o número de células diminuiu após o tratamento com kaempferol, pelo ensaio de coloração com cristal violeta, mas houve aumento da formação de sal formazan no ensaio de MTT. Assim, os autores sugeriram que houve uma ativação do metabolismo mitocondrial nas células pelo kampferol, que transformaram o MTT em formazan e não houve aumento da proliferação celular.

Nossos resultados mostraram que ECFF foi capaz de aumentar de forma expressiva o metabolismo mitocondrial após 24, 48 e 72h de incubação em fibroblastos L929, através do teste de MTT, no entanto não aumentou a proliferação dessas células pelo ensaio de SRB. Sugerimos que a presença de compostos fenólicos e com atividade antioxidante em ECFF podem ter induzido o metabolismo mitocondrial que resultaram no efeito observado, da mesma forma que demonstrado por Bruggisser e colaboradores (2002) em seu estudo com o kampferol.

Muitos trabalhos já relataram o potencial das plantas como uma importante fonte de antioxidantes exógenos (KASOTE *et al.*, 2015). Acredita-se que dois terços das espécies de plantas do mundo tenham importância medicinal, e que a maioria possui excelente potencial antioxidante (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011). O interesse pelos antioxidantes vegetais exógenos tem recebido muito destaque, principalmente após estudos que mostram que o aumento do estresse oxidativo é um dos principais fatores para o desenvolvimento e progressão de doenças potencialmente fatais, como as neurodegenerativas, cardiovasculares e o câncer. Diante disso, a suplementação com antioxidantes exógenos ou o reforço das defesas antioxidantes endógenas do corpo, a partir de espécies vegetais, tem se mostrado um método promissor ao combate dos efeitos indesejáveis do estresse oxidativo (KASOTE; HEGDE; KATYARE, 2013).

O método de DPPH já foi extensamente relatado pela simplicidade de sua execução, baixo custo e efetividade para triagem e detecção de extratos de plantas com potencial antioxidante, mesmo em baixas concentrações dos compostos (PITZ *et al.*, 2017; RAVI *et al.*, 2018; TONIN, 2016). Diante disso, e pela presença de grupos fenólicos identificados em ECFF, foi investigada a sua capacidade sequestrante de radicais livres através deste método. ECFF (250 e 500 µg/mL) apresentou atividade de inibição do radical DPPH em torno de 70,1% e 85,7%, evidenciando sua atividade antioxidante comparada à vitamina E (87,3%). Outros autores também já haviam demonstrando o potencial antioxidante não apenas das flores de *Cassia fistula* (PRIYADHARSHINI; SUJATHA, 2012), mas também de seu caule

(ILAVARASAN; MALLIKAB; VENKATARAMANC, 2005), folhas (THABIT *et al.*, 2018), frutos e sementes (IRSHAD *et al.*, 2012), que foram atribuídas à presença de diferentes tipos de compostos químicos.

O termo espécies reativas de oxigênio (EROs) refere-se a todas as moléculas quimicamente reativas que contêm um átomo de oxigênio na sua composição, incluindo ou não elétrons desemparelhados. Os vários tipos de EROs são classificados como fatores mitocondriais endógenos ou fatores extracelulares (POLJŠAK; DAHMANE; GODIĆ, 2012). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um subproduto reativo da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias que em altas concentrações são lesivos aos lipídios, ácidos nucleicos e proteínas celulares (GALICKA *et al.*, 2014). Estudos mostram que a produção excessiva de EROs interrompe mecanismos de defesa antioxidante e induz a resposta inflamatória celular (DAVALLI *et al.*, 2016). Os fibroblastos, importantes células do processo de cicatrização, podem sofrer agressões de EROS, que em excesso, interferem na síntese de colágeno e reduzem a reparação tecidual (LANDÉN; LI; STÅHLE, 2016). Deste modo, foi realizado o protocolo experimental de estresse celular induzido por H_2O_2 em fibroblastos *in vitro*, com o intuito de simular a condição de agressão decorrente do aumento dos níveis de EROs produzidos durante o processo inflamatório em feridas cutâneas.

Diante disso, ECFE (250 μ g/mL) incubado por 24h, foi capaz de reduzir a morte celular provocada pela adição de H_2O_2 em fibroblastos L929. Resultado similar foi obtido com o extrato hidroalcolico do fruto da *Plinia peruviana* (Jaboticaba) que também foi eficaz ao prevenir os danos causados pelo H_2O_2 (1 mM) por 24h aumentando a viabilidade celular de L929 (PITZ *et al.*, 2017). O extrato etanólico de própolis também foi capaz de reduzir o estresse oxidativo em fibroblastos L929 provocado pelo H_2O_2 (0,8 mM) e aumentou o percentual de viabilidade celular, efeito atribuído à sua atividade antioxidante (CAO *et al.*, 2017). Outro trabalho mostrou que frações extraídas de *Wedelia lobata* foram capazes de prevenir os danos celulares à fibroblastos expostos ao H_2O_2 (0,5 mM) por 24h, além de estimular sua migração e síntese de colágeno (BALEKAR *et al.*, 2012).

A primeira defesa do organismo ao dano tecidual é a resposta inflamatória, um complexo processo biológico que envolve componentes vasculares e celulares, e uma diversidade de substâncias que são liberadas com o intuito de remover o estímulo indutor da lesão e iniciar a recuperação do tecido (SERRA *et al.*, 2017). As principais células da imunidade inata que atingem o local da lesão são neutrófilos e macrófagos, que exercem sua

atividade fagocitária liberando substâncias destrutivas, gerando produtos químicos reativos. Padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) como o lipopolissacarídeo (LPS), um produto de bactérias gram-negativas, ativam macrófagos que atuam na defesa do hospedeiro, pela ativação de receptores toll-like 4 (TLR4), que leva à fosforilação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e ativa o fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B). Este por sua vez, estimula a expressão e a liberação de mediadores pró-inflamatórios como óxido nítrico (NO), TNF- α , IL-1 β , prostaglandinas, quimiocinas e enzimas como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (JOSE; KURUP, 2017; KIM, M. *et al.*, 2017; KUO *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2017).

Este estudo mostrou que ECFE não apresentou citotoxicidade após 24h de incubação em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS, e este resultado permitiu a avaliação do seu efeito nestas células. Além disso, os resultados deste estudo mostraram que ECFE foi capaz de diminuir os níveis de nitrito liberados pelos macrófagos ativados em 56% após 24h de incubação com o extrato, quando comparado ao grupo controle (veículo). De acordo com a literatura, substâncias com potencial efeito anti-inflamatório promovem uma redução nos níveis de NO, em consequência da estimulação por LPS (AHN; HANIF, 2015; DAMODAR *et al.*, 2018; KIM, M. *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2018) de forma que ECFE parece ser importante na modulação da resposta inflamatória que é uma etapa crucial para a cicatrização de feridas.

IL-1 β é uma interleucina chave da resposta antimicrobiana que estimula o recrutamento de leucócitos, a liberação de proteínas na fase aguda e o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, além de estimular a expressão de COX II e, conseqüentemente, a formação e liberação de prostanóides (SERRA *et al.*, 2017). Já TNF- α é uma citocina pleiotrópica produzida por uma variedade de tipos de células, incluindo queratinócitos, macrófagos e mastócitos. Atua em várias etapas do mecanismo de recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos, induzindo a regulação da adesão molecular, produção de quimiocinas e matriz de metaloproteinases (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; FENG *et al.*, 2016).

Nesse trabalho foi investigado o papel das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , da citocina anti-inflamatória IL-10, e do fator de crescimento TGF- β em macrófagos murinos RAW 264.7 ativados por LPS. Os resultados mostraram que ECFE foi capaz de diminuir os níveis de TNF- α , IL-1 β , TGF- β e aumentar IL-10, sugerindo que ECFE parece modular a inflamação ao diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumentar uma citocina anti-inflamatória por macrófagos. Resultados semelhantes foram obtidos por Tewtrakul e

colaboradores (2015) que mostraram que o extrato etanólico de *Caesalpinia sappan* foi capaz de reduzir a expressão de TNF- α , NO e PGE2 em RAW 264.7, comprovando seu efeito anti-inflamatório e sustentando seu uso para afecções cutâneas por atuar na cicatrização.

Segundo Frykberg e Banks (2015), os macrófagos são células que predominam na fase tardia da inflamação e que quando ativadas excessivamente nas lesões, na presença de comorbidades ou infecção, podem intensificar e prolongar a fase inflamatória e atrasar a cicatrização de feridas. Em contrapartida, diversos autores já demonstraram o potencial antimicrobiano de *Cassia fistula*. Duraipandiyar e Ignacimuthu (2007) mostraram que diferentes tipos de extrato das flores de *Cassia fistula* (solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água) apresentaram atividade antibacteriana contra microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Dessa forma, diante do efeito de ECFF sobre macrófagos ativados por LPS e seu potencial antimicrobiano acreditamos que o extrato possa trazer benefícios para o tratamento de feridas infectadas.

É importante ressaltar que este trabalho mostrou pela primeira vez o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico das flores de *Cassia fistula* sobre macrófagos murinos ativados por LPS, no entanto, outros trabalhos já haviam demonstrado o potencial anti-inflamatório do caule e folhas desta espécie. Raju e colaboradores (2005) mostraram que extratos do caule de *C. fistula* apresentaram efeito anti-inflamatório significativo em modelos de inflamação aguda e crônica. Outro estudo mostrou o efeito anti-inflamatório das folhas de *C. fistula*, em comparação com fenilbutazona, usando carragenina, histamina e dextrano em modelo de edema de pata (BHAKTA, TEJENDRA *et al.*, 2000), enquanto outro estudo mostrou também efeito anti-inflamatório do extrato das folhas em granuloma de pellet de algodão (GOBIANAND *et al.*, 2010).

A cicatrização de feridas é um processo delicado e extremamente complexo, composto por uma cascata de eventos biológicos interligados, entre os quais a transição da inflamação para a regeneração tecidual pode ser uma das etapas mais críticas (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016). Durante a cicatrização, numerosos mecanismos intra e intercelulares acontecem com o objetivo de restaurar a integridade e a homeostase da pele (BOATENG; CATANZANO, 2015). A barreira epidérmica é composta por várias camadas de queratinócitos que protegem o organismo do ambiente externo, e estes participam desta restauração quando a pele é lesionada, através de intensa atividade migratória e proliferativa para reocupar o local desprotegido (FOX *et al.*, 2017). Os queratinócitos migrantes sofrem diversas modificações celulares, que incluem

desmobilização de hemidesmossomos entre epiderme e a matriz biológica, retração intracelular de filamentos de queratina e dissolução da maioria dos desmossomos, que permitem que eles tenham uma maior flexibilidade para deslizarem sobre a matriz recém-sintetizada (SANTORO; GAUDINO, 2005).

Dessa forma foi investigado o papel de ECFF sobre a viabilidade e proliferação de queratinócitos humanos HaCaT. Os resultados mostraram que ECFF foi capaz de aumentar a viabilidade e proliferação de queratinócitos HaCaT após 24, 48 e 72h de incubação, através dos ensaios de MTT e SRB. Outros extratos com ácidos fenólicos e flavonóides, como o extrato hidroalcoólico da casca de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), espécie nativa do Brasil, também foram capazes de aumentar a viabilidade de queratinócitos HaCaT (PELLENZ *et al.*, 2018). Outro estudo mostrou que astragalosídeos isolados de *Astragali Radix*, espécie amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa também foi capaz de aumentar a proliferação de HaCaT (LEE, S. Y. *et al.*, 2018).

Para confirmar o efeito de ECFF sobre a proliferação de HaCaT, foi realizado o teste *in vitro* de cicatrização de feridas ou *Scratch* que teve o objetivo de simular um ambiente de lesão epitelial, onde foi avaliada a continuidade da camada de queratinócitos que proliferam e migram para reocupar o vazio e conseqüentemente fechar a lesão. Os resultados mostraram que ECFF tem um importante efeito na proliferação e migração de queratinócitos humanos HaCaT, onde foi capaz de reduzir a lesão de maneira significativa a partir de 12 horas de incubação com o extrato, apresentando uma taxa de redução da área aberta em torno de 54% e 84% após 48 e 72 horas, respectivamente em relação ao grupo controle (veículo, água).

Uma substância isolada de Jawoongo, uma pomada tradicional feita a partir da raiz seca de *Lithospermum erythrorhizon* e muito utilizada na Coreia para afecções cutâneas e queimaduras, induziu a proliferação e migração da HaCaT após 24h de incubação, em baixas concentrações, através da ativação de ERK e MAPKs, além de apresentar efeito cicatrizante sobre feridas excisionais em camundongos (PARK *et al.*, 2017). Estudo realizado com folhas de *Aloe vera*, *Aloe ferox* e *Aloe marlothii* também apresentaram rápidas taxas de cicatrização, quando avaliaram o efeito destas espécies em queratinócitos HaCaT através do ensaio de *Scratch*, além de apresentarem baixa citotoxicidade celular (FOX *et al.*, 2017). Outro estudo mostrou que um óleo essencial das flores de *Erigeron annuus* estimulou a proliferação e migração de HaCaT com provável mediação das vias AKT e ERK (KIM, D. *et al.*, 2018). Diante disso, investigamos também o efeito de ECFF sobre a migração celular isoladamente.

Durante as primeiras 24 horas após a lesão tecidual, a migração de queratinócitos acontece de forma precoce a partir das bordas da ferida e avança à medida que as células se proliferam com o intuito de reocupar a membrana basal (ROUSSELLE; BRAYE; DAYAN, 2018). A fim de investigar se o efeito cicatrizante de ECFE sobre queratinócitos poderia também estar associado à migração celular, foi utilizado um agente anti-proliferativo, a mitomicina C, que é capaz de interferir na duplicação celular e evidenciar somente a migração de células (PATRUNO *et al.*, 2018). Nossos achados mostraram que ECFE (62,5 e 125 µg/mL) foi capaz de induzir também a migração de queratinócitos de forma significativa após 24 e 48h de tratamento. Assim, ECFE estimula não só a proliferação, mas também a migração de queratinócitos humanos. Um resultante semelhante foi produzido pela fração metanólica do extrato de *Centella asiatica* (100 µg/mL) que aumentou a taxa de migração celular, além de auxiliar no remodelamento durante a cicatrização de feridas excisionais em coelhos (AZIS *et al.*, 2017).

A E-caderina é uma das principais moléculas que medeiam a adesão das células epiteliais. A relação entre E-caderina e invasão tumoral tem sido bem estudada, já que as células tumorais que diminuem a expressão de E-caderina possuem alto potencial de invasão, pois conseguem migrar com mais facilidade, gerando metástases (TAKEICHI, 1988). No entanto, Grzesiak e Pierschbacher (1995) também demonstraram o potencial benéfico da diminuição da expressão de E-caderina em seu estudo *in vitro*, que mostrou que o aumento da migração de queratinócitos induz a regulação negativa da expressão de E-caderina. Dessa forma, a expressão de E-caderina é reduzida em células epiteliais durante o curso da cicatrização de feridas, simbolizando a atividade de migração e mitose na camada epidérmica (KUWAHARA *et al.*, 2001).

Nossos resultados sugerem que ECFE apresenta um efeito na migração de queratinócitos, e este efeito parece ocorrer parcialmente em resposta à diminuição da expressão da proteína de adesão da E-caderina, avaliada por citometria de fluxo. Kim e colaboradores (2017) demonstraram o importante papel das proteínas de adesão, como a β -catenina, promovendo a cicatrização de feridas em queratinócitos HaCaT, e em feridas excisionais em animais, com o extrato de *Stellera chamaejasme* L. (Thymelaeaceae), uma planta bastante utilizada na medicina tradicional chinesa. Outro estudo mostrou que o mel foi capaz de estimular a atividade celular que envolve a proliferação e migração de queratinócitos HaCaT após ensaio de MTT e *Scratch*, além da redução da expressão gênica de E-caderina e de outros

genes, que estão envolvidos nas atividades de adesão célula-célula, necessárias à reepitelização na cicatrização de feridas (CHAUDHARY *et al.*, 2015).

A interação entre fibroblastos e queratinócitos é um componente vital do processo de cicatrização de feridas, e envolve a liberação e atividade de vários fatores de crescimento e citocinas. A cicatrização de feridas cutâneas é controlada principalmente pela proliferação, migração e interações complexas entre esses dois tipos de células (MENON *et al.*, 2012; WANG, Z. *et al.*, 2012). Para investigar as interações entre queratinócitos e fibroblastos, tratamos previamente os fibroblastos com ECFF e em seguida os queratinócitos com o sobrenadante liberado dos fibroblastos após tratamento com ECFF. Observamos que o tratamento com ECFF em fibroblastos L929 estimulou significativamente a proliferação de queratinócitos em comparação ao grupo controle, que foi tratado apenas com ECFF. Dessa forma, mostramos que os mediadores químicos liberados por fibroblastos após o tratamento com ECFF podem atuar aumentando a proliferação de queratinócitos HaCaT. No entanto, outros protocolos experimentais como ensaios *in vitro* de co-cultura com fibroblastos e queratinócitos, ou até mesmo modelo equivalente de pele humana 3D poderiam auxiliar a compreensão de como ECFF atuaria sobre esses tipos celulares e que mediadores podem estar envolvidos nesse processo.

A partir dos efeitos de ECFF sobre os ensaios *in vitro*, realizamos ensaios *in vivo* em modelo de feridas excisionais a fim de investigar o efeito de ECFF sobre a injúria tecidual, mediante a interação de vários tipos celulares que formam o processo de cicatrização. Um creme contendo o extrato de flores de *C. fistula* (CrECFF) foi elaborado nas concentrações de 12,5% e 25% e as feridas tratadas foram observadas durante o período de 12 dias, tempo suficiente para acompanhar o processo completo de reparação da lesão tecidual em camundongos. O percentual de ECFF foi escolhido de acordo com a extrapolação das melhores concentrações (62,5 e 125 µg/mL) obtidas nos ensaios *in vitro*.

A realização de protocolos experimentais em animais são eficientes e relevantes para se estudar a fisiopatologia da cicatrização e são obrigatórios para o seguimento de ensaios clínicos em seres humanos. Já foram desenvolvidos modelos de ferida excisional, incisional, isquemia, feridas infectadas, úlcera aberta entre outros, que permitem estudar a complexidade da cicatrização e testar novos agentes e estratégias terapêuticas para proteger e acelerar a cicatrização das lesões (GRADA; MERVIS; FALANGA, 2019; HAMBLIN, 2018).

Estudos mostram que produtos naturais que possuem propriedades emolientes,

adstringentes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes podem acelerar o processo de cicatrização pois estimulam um ou mais fases deste processo (IBRAHIM *et al.*, 2018). Além disso, formulações umectantes permitem uma maior retenção da umidade e favorecerem o movimento de queratinócitos, sendo esse mecanismo apoiado por trabalhos que mostram que feridas abertas ressecadas demoram mais tempo para cicatrizar do que as feridas ocluídas e úmidas (JUNKER *et al.*, 2013; LODÉN, 2012). Considerando que a substâncias de origem natural são de fácil acesso e baixo custo, muito interesse têm sido aplicado na identificação de constituintes ativos a partir de plantas medicinais que possuam atividade cicatrizante, além do mecanismo de ação pelo qual essas substâncias atuam (IBRAHIM *et al.*, 2018).

Neste estudo, mostramos que o creme contendo o extrato padronizado das flores de *C. fistula* (CrECFF) promoveu o aumento da taxa de contração das feridas e reepitelização em camundongos Swiss. As feridas tiveram um aumento da taxa de contração significativa a partir do 4º dia de tratamento com CrECFF e estavam quase totalmente fechadas no dia 12. Através de análise histológica com coloração H&E e escores mostramos que os grupos tratados com CrECFF apresentaram reepitelização completa, ausência de membrana granulocítica e presença de camada córnea revestindo o epitélio após o 12º dia de tratamento. Dessa forma, acreditamos que o tratamento com CrECFF favoreceu a cicatrização das feridas em comparação ao grupo controle (veículo).

Além disso, as feridas excisionais apresentam maior risco de infecção por propiciar uma porta de entrada, especialmente por bactérias. Se o tecido infeccionar, a ferida demora mais tempo para cicatrizar e um forte exsudato é formado em consequência da infecção (SCHMIDT *et al.*, 2009). No entanto, no presente estudo não houve presença de infecção nas feridas avaliadas, já que não apresentaram sinais sugestivos, como pus ou odor fétido, nem retardo no processo cicatricial. 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, demonstrada por parâmetros histopatológicos, e fechamento de feridas infectadas (KUMAR, M. *et al.*, 2006). Outro estudo 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 escisionais e incisionais (BHAKTA, T *et al.*, 1998). Diante do potencial antimicrobiano das flores de *Cassia fistula*, anteriormente descrito, acreditamos que CrECFF teria um potencial cicatrizante também em feridas infectadas.

A cicatrização de feridas é um processo delicado e extremamente complexo, composto por uma cascata de eventos biológicos inter-relacionados. Durante a resposta inflamatória, neutrófilos e macrófagos ativados liberam uma série de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6, que neutralizam agentes invasivos e limitam o dano tecidual, além de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e inibidores de metaloproteinases, que combatem o recrutamento e ativação de células inflamatórias, reduzindo a formação de EROs (KRZYSZCZYK *et al.*, 2018). Nosso trabalho mostrou que houve aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , e da citocina anti-inflamatória IL-10, em homogenato do tecido de feridas excisionais de camundongos após 2 dias de tratamento com CrECFF.

Na cicatrização, células epiteliais e macrófagos são fontes de IL-1 β , que desempenha um importante papel na transição entre a inflamação e o reparo da ferida, pois além de estimular o recrutamento de neutrófilos, promove a proliferação de células epiteliais e fibroblastos, e aumento da expressão de fator de crescimento de queratinócitos. Em relação às etapas mais tardias da cicatrização, IL-1 β também age através da regulação da colagênese (ELLIS; LIN; TARTAR, 2018; SERRA *et al.*, 2017). IL-10 é produzida por diversas células, entre elas por queratinócitos epidérmicos e é importante na supressão de ROS, NO e no controle de citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos (THARUKA *et al.*, 2018). Esta citocina tem o papel para prevenir os danos excessivos da inflamação, sendo sua expressão aumentada no período que vai de 12 horas até o 7º dia após a lesão cutânea (KUBO *et al.*, 2014). Lin e colaboradores (2017) mostra que a liberação de IL-10 parece ocorrer em resposta ao aumento do perfil pró-inflamatório. O TNF- α pode atuar de forma benéfica ou deletéria na cicatrização de feridas e sua elevação leva à diminuição da produção de tecido de granulação, enquanto a sua redução promove um melhor arranjo das fibras de colágeno. Outra função desse fator é atuar indiretamente na reepitelização, induzindo a produção do fator de crescimento de queratinócitos, juntamente com a IL-1 (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; FENG *et al.*, 2016).

Dessa forma, sugerimos que CrECFF promove uma modulação na resposta inflamatória tecidual, aumentando a liberação de IL-1 β , TNF- α e IL-10 pelas células epiteliais, favorecendo a cicatrização do tecido. O aumento dos níveis de TNF- α foram também comprovados por análise imunohistoquímica. Estudos do nosso grupo de pesquisa, realizado 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 se destacar por um excelente efeito cicatrizante. Este trabalho atualmente encontra-

se em estudo de fase clínica 1 (dados não-publicados).

VEGF é produzido em resposta a lesões por uma variedade de células, incluindo queratinócitos, macrófagos e fibroblastos, desenvolvendo vários papéis no processo de cicatrização. Agudamente, eles aumentam a permeabilidade vascular, a expressão de células de adesão e selectinas, recrutando células inflamatórias, como macrófagos e mastócitos, importantes em vários estágios da cicatrização (SERRA *et al.*, 2017). Sabe-se que na fase proliferativa, VEGF regula vários aspectos, incluindo reparo epidérmico e barreiras da derme, atuando diretamente em queratinócitos e macrófagos que também expressam receptores (VEGFRs), cujas atividades celulares também são favorecidas por oxigênio e nutrientes transportados por novos vasos sanguíneos (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016; SERRA *et al.*, 2017). No presente estudo mostramos que fibroblastos murinos L929 incubados com ECFE foram capazes de aumentar a expressão de VEGF, no entanto esse resultado não foi observado quando mensurado no tecido dos animais após 7 dias de tratamento com CrECFE. Acreditamos que outros estudos são necessários para elucidar o papel de VEGF no aumento da cicatrização induzida por ECFE.

Numerosos estudos ressaltam o papel do TGF- β na cicatrização de feridas cutâneas. Denton e colaboradores (2009) mostraram que a falta do receptor para TGF- β em camundongos transgênicos resultou em comprometimento da cicatrização de feridas, embora a proliferação epidérmica tenha aumentado. Este estudo concluiu que a funcionalidade do TGF- β e seus receptores são críticos no processo de cicatrização de feridas. A liberação de TGF no estágio inicial da cicatrização leva ao 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, os tecidos de granulação são gradualmente formados e o TGF- β promove a expressão dos principais componentes das proteínas da MEC, como fibronectina, colágeno tipos I e III e VEGF. Além disso, o TGF- β melhora as propriedades angiogênicas das células endoteliais por facilitar o fornecimento de sangue ao local lesionado e estimular a contração de fibroblastos para permitir o fechamento da ferida. A migração de queratinócitos também é promovida pelo TGF- β via regulação de integrinas associadas à migração celular. Além disso, TGF- β é um dos principais fatores estimuladores de colágeno, especialmente o tipo I em fibroblastos (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 aumento de moléculas da MEC, como

o colágeno tipo I e III. Outro estudo em feridas agudas induzidas por irradiação demonstrou que a administração oral de *Aloe vera* induziu a estimulação de TGF- β e FGF, que aumentou a proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e angiogênese. Acredita-se que esse efeito tenha relação com a ativação de macrófagos, que por sua vez ativam a fagocitose, a produção de óxido nítrico e fatores de crescimento contribuindo para a contração da ferida (ATIBA *et al.*, 2011).

Nosso estudo mostrou que o tratamento de 7 dias com CrECFF foi capaz de aumentar os níveis de TGF- β de maneira significativa em homogenato de feridas excisionais em camundongos, e diante da importância deste fator de crescimento para o processo de cicatrização ele parece estar envolvido diretamente no efeito cicatrizante demonstrado por ECFF durante este estudo. No entanto, não observamos o aumento de TGF- β após tratamento de fibroblastos e macrófagos com ECFF, por isso outros estudos são necessários para elucidar quais células podem ser responsáveis pela liberação deste fator de crescimento que está diretamente relacionado ao efeito de ECFF.

Em resumo, ECFF não demonstrou citotoxicidade nas linhagens de fibroblastos, macrófagos e queratinócitos; apresentou efeito antioxidante e citoprotetor em fibroblastos sob estresse celular; efeito anti-inflamatório através da modulação de mediadores inflamatórios liberados por macrófagos ativados; efeito sobre a proliferação e migração de queratinócitos em ensaios de cicatrização, que parecem ser modulados pela diminuição da expressão de E-caderina; além da atividade cicatrizante em feridas excisionais em camundongos, pela modulação de mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e estimulação da reepitelização.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou o potencial do ECFE como agente terapêutico para cicatrização de feridas cutâneas. ECFE atuou na cicatrização de feridas tanto *in vitro* como *in vivo*, e este efeito pode ser atribuído, pelo menos em parte, aos compostos químicos identificados no extrato. ECFE atuou na redução dos danos provocados pelo estresse oxidativo, aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias na fase aguda e modulação da inflamação na fase crônica, diminuição da proteína de adesão E-caderina e aumento de fatores de crescimento, além de estimular a reepitelização de feridas excisionais.

Dessa forma, acreditamos que o potencial antioxidante, anti-inflamatório e cicatrizante de ECFE dá suporte para maiores estudos que viabilizem o desenvolvimento de um produto fitoterápico a partir desta planta para a cicatrização de feridas. Este estudo não apenas contribui para a comprovação do uso tradicional da espécie *Cassia fistula*, mas também fornece uma nova abordagem terapêutica para o desenvolvimento de futuros tratamentos para a cicatrização.

Como perspectivas futuras acreditamos que o tratamento com CrECFE poderia também beneficiar a cicatrização de feridas infectadas. Além disso, testes de sensibilidade cutânea e ensaios clínicos de fase 1 e 2, bem como a elucidação de outros mecanismos de ação atrelados ao efeito cicatrizante de ECFE, são necessários para que este possa ser disponibilizado como um medicamento fitoterápico para o tratamento de feridas cutâneas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADJÉ, F. A. *et al.* Phenolic acid and flavonol water extracts of *Delonix regia* red flowers. *Industrial Crops & Products*, v. 37, n. 1, p. 303–310, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.008>>.
- AHN, S.; HANIF, M. Anti-inflammatory activity of ginsenosides in LPS-stimulated. *Science Bulletin*, v. 60, p. 773–784, 2015.
- ALMEIDA, J. S. *et al.* Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: Efficacy in wound healing in rats. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 38, n. 7, p. 792–799, 2012.
- AMARAL, F. M. M. *et al.* Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, p. 27–30, 2003.
- ANDRADE, V. S. *et al.* A Possible Anti-Inflammatory Effect of Proline in the Brain Cortex and Cerebellum of Rats. 2017.
- ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in immunology*, v. 5, p. 491, 7 out. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339958>>.
- ARDA, O.; GÖKSÜGÜR, N.; TÜZÜN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*, v. 32, n. 1, p. 3–13, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X13000886>>.
- ASFOUR, M. H. *et al.* Chitosan based Pickering emulsion as a promising approach for topical application of rutin in a solubilized form intended for wound healing: In vitro and in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 534, n. 1–2, p. 325–338, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.044>>.
- ATARZADEH, F. *et al.* Cassia fistula: A remedy from Traditional Persian Medicine for treatment of cutaneous lesions of pemphigus vulgaris. *Avicenna J Phytomed*, v. 7, n. 2, p. 107–115, 2017.
- AZIS, H. A. *et al.* In vitro and In vivo wound healing studies of methanolic fraction of *Centella asiatica* extract. *South African Journal of Botany*, v. 108, p. 163–174, 2017.
- AZIZ, M. A. *et al.* Traditional uses of medicinal plants practiced by the indigenous communities at Mohmand Agency, FATA, Pakistan. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, v. 14, n. 1, p. 2, 9 jan. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29316948>>.
- BALEKAR, N. *et al.* Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L .) leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 141, n. 3, p. 817–824, 2012.
- BARNABY, A.; REID, R.; WARREN, D. Antioxidant Activity, Total Phenolics and Fatty Acid Profile of *Delonix regia*, *Cassia fistula*, *Spathodea campanulata*, *Senna siamea* and *Tibouchina granulosa*. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, v. 3, n. 2, p. 1–7, 17 out. 2016.
- BERGMEIER, W.; HYNES, R. O. Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 4, n. 2, p. a005132, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21937733>>.
- BHAKTA, T *et al.* Studies on in vivo wound healing activity of *Cassia fistula* linn. Leaves (*Leguminosae*) in rats. [S.l: s.n.], 1998. v. 4.
- BHAKTA, TEJENDRA *et al.* Evaluation of Anti-Inflammatory Effects of *Cassia fistula* (*Leguminosae*) Leaf Extract on Rats. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, v. 6, n. 4, p. 67–72, 17 jan. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1300/J044v06n04_08>.

- BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing — A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 104, n. 11, p. 3653–3680, 2015.
- BORGES, D. B. *et al.* Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. e. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 3, p. 229–236, 2005.
- 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*. [S.l: s.n.]. , 2010
- BRASIL. *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais*. [S.l: s.n.], 2017.
- 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. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf>.
- BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 117, n. 5, p. 1219–1222, 1 maio 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1172/JCI32169>>.
- BROWN, K. L.; PHILLIPS, T. J. Nutrition and wound healing. *Clinics in Dermatology*, v. 28, n. 4, p. 432–439, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X10000520>>.
- BRUGGISSER, R. *et al.* Interference of Plant Extracts, Phytoestrogens and Antioxidants with the MTT Tetrazolium Assay. [S.l: s.n.], 2002. v. 68.
- CALEY, M. P.; MARTINS, V. L. C.; O'TOOLE, E. A. Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances in Wound Care*, v. 4, n. 4, p. 225–234, 1 abr. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/wound.2014.0581>>.
- CAO, X. *et al.* Phytomedicine Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its in vitro antioxidant activity. *Phytomedicine*, v. 34, n. December 2016, p. 76–84, 2017.
- CARDOSO, J. F. *et al.* Effects of Cigarette Smoke in Mice Wound Healing is Strain Dependent. *Toxicologic Pathology*, v. 35, n. 7, p. 890–896, 2007.
- 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.
- CERQUEIRA, M. T.; PIRRACO, R. P.; MARQUES, A. P. Stem Cells in Skin Wound Healing: Are We There Yet? *Advances in Wound Care*, v. 5, n. 4, p. 164–175, 4 maio 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/wound.2014.0607>>.
- CHANDRA, P. *et al.* Quantification of multianalyte by UPLC – QqQ LIT – MS / MS and in-vitro anti-proliferative screening in Cassia species. *Industrial Crops & Products*, v. 76, p. 1133–1141, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.030>>.
- CHAUDHARY, A. *et al.* Modulating prime molecular Expressions and in vitro wound healing rate in keratinocyte (HaCaT) population under characteristic Honey dilutions. [S.l: s.n.], 2015. v. 166.
- CHOI, J. H. *et al.* Skin renewal activity of non- thermal plasma through the activation of β -catenin in keratinocytes. *Scientific Reports*, v. 5, n. July, p. 1–11, 2017.
- CHOPRA, R. N.; NAYAR, S. L. *Glossary of Indian medicinal plants*. [S.l.]: Council of Scientific And

Industrial Research; New Delhi, 1956.

CORSETTI, G. *et al.* Topical application of dressing with amino acids improves cutaneous wound healing in aged rats. *Acta Histochemica*, v. 112, n. 5, p. 497–507, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006512810900052X>>.

DABIRI, G.; DAMSTETTER, E.; PHILLIPS, T. Choosing a Wound Dressing Based on Common Wound Characteristics. *Advances in wound care*, v. 5, n. 1, p. 32–41, 1 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26858913>>.

DAMODAR, K. *et al.* Synthesis and in vitro evaluation of homoisoflavonoids as potent inhibitors of nitric oxide production in RAW-264 . 7 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 28, n. 11, p. 2098–2102, 2018.

DARBY, I. A. *et al.* Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, v. 7, p. 301–311, 6 nov. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25395868>>.

DAVALLI, P. *et al.* ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2016, p. 3565127, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27247702>>.

DENTON, C. P. *et al.* Inducible Lineage-Specific Deletion of T β RII in Fibroblasts Defines a Pivotal Regulatory Role during Adult Skin Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 129, n. 1, p. 194–204, 1 jan. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/jid.2008.171>>.

DICKINSON, L. E.; GERECHT, S. Engineered Biopolymeric Scaffolds for Chronic Wound Healing. *Frontiers in Physiology*, v. 5, n. 7, p. 341, 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2016.00341>>.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, n. 3, p. 223–229, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319016413001096>>.

DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial and antifungal activity of Cassia fistula L.: An ethnomedicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 112, n. 3, p. 590–594, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887410700205X>>.

DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, Country in focus: Pharmacology in Brasil, v. 112, p. 4–29, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661816000232>>.

EDEOGA, H. O.; OKWU, D. E.; MBAEBIE, B. O. Phytochemical Constituents of Some Nigerian Medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 7, p. 685–688, 2005.

ELIAS, P. M.; WAKEFIELD, J. S. Skin Barrier Function. In: KRUTMANN, J.; HUMBERT, P. (Org.). *Nutrition for Healthy Skin*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. p. 35–48.

ELLIS, S.; LIN, E. J.; TARTAR, D. Immunology of Wound Healing. *Current dermatology reports*, v. 7, n. 4, p. 350–358, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30524911>>.

EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.*, v. 6, n. 265, p. 1–36, 2016.

FENG, Y. *et al.* Potential roles of suppressor of cytokine signaling in wound healing. *Regenerative Medicine*, v. 11, n. 2, p. 193–209, 15 fev. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.2217/rme.16.4>>.

FONSECA, F. *Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de Justicia pectoralis - chambá:*

obtenção do extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica. 2009. 131 f. 2009.

FOX, L. T. *et al.* In vitro wound healing and cytotoxic activity of the gel and whole-leaf materials from selected aloe species. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 200, p. 1–7, 2017.

FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, v. 4, n. 9, p. 560–582, 17 jul. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/wound.2015.0635>>.

GALICKA, A. *et al.* Anethole prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis and collagen metabolism alterations in human skin fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 394, n. 1–2, p. 217–224, 2014.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, v. 19, n. 3, p. 441–453, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1064740611000290>>.

GARODIA, P. *et al.* From ancient medicine to modern medicine: ayurvedic concepts of health and their role in inflammation and cancer. *Journal of the Society for Integrative Oncology*, v. 5, n. 1, p. 25–37, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17309811>>.

GARRAUD, O.; HOZZEIN, W. N.; BADR, G. Wound healing: time to look for intelligent, ‘natural’ immunological approaches? *BMC Immunology*, v. 18, n. 1, p. 23, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12865-017-0207-y>>.

GHANEMI, A. Cell cultures in drug development: Applications, challenges and limitations. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, v. 23, n. 4, p. 453–454, set. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27134549>>.

GHASEMIAN, M.; OWLIA, S.; OWLIA, M. B. Review of Anti-Inflammatory Herbal Medicines. *Adv Pharmacol Sci.*, 2016.

GIRARDI, M. Cutaneous Perspectives on Adaptive Immunity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, v. 33, n. 1, p. 4–14, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12016-007-0040-9>>.

GOBIANAND, K. *et al.* Anti-inflammatory and antipyretic activities of Indian medicinal plant *Cassia fistula* Linn. (Golden Shower) in Wistar Albino rats. *International Journal of Pharmacology*. [S.l.: s.n.], 2010

GONZALEZ, A. C. DE O. *et al.* Wound healing - A literature review. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 91, n. 5, p. 614–620, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27828635>>.

GRADA, A.; MERVIS, J.; FALANGA, V. Research Techniques Made Simple : Animal Models of Wound Healing. 2019.

GRZESIAK, J. J.; PIERSCHBACHER, M. D. Changes in the Concentrations of Extracellular Mg⁺⁺ and Ca⁺⁺ Down-Regulate E-Cadherin and Up-Regulate $\alpha 2\beta 1$ Integrin Function, Activating Keratinocyte Migration on Type I Collagen. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 104, n. 5, p. 768–774, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15421268>>.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, v. 89, n. 3, p. 219–229, mar. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20139336>>.

GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. *Nature*, v. 453, p. 314–321, 14 maio 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature07039>>.

- Hahn, H. *et al.* Protective effects of rosmarinic acid against hydrogen peroxide-induced cellular senescence and the inflammatory response in normal human dermal fibroblasts. *Molecular Medicine Reports*, v. 16, n. 6, p. 9763–9769, 2017.
- HAMBLIN, M. R.; HAMBLIN, M. R. Expert Opinion on Pharmacotherapy Novel pharmacotherapy for burn wounds : what are the advancements Novel pharmacotherapy for burn wounds : what are the advancements. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 00, n. 00, p. 1–17, 2018.
- 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. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28108895>>.
- HEIDARI, M.; BAHRAMSOLTANI, R.; HOSSEIN, A. Journal of Traditional and Complementary Medicine Efficacy of topical application of standardized extract of *Tragopogon graminifolius* in the healing process of experimental burn wounds. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, p. 1–6, 2018.
- HERNÁNDEZ, M. *et al.* UPLC-ESI-QTOF-MS²-Based Identification and Antioxidant Activity Assessment of Phenolic Compounds from Red Corn Cob (*Zea mays* L.). *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 23, n. 6, p. 1425, 12 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29895792>>.
- HOFFMAN, M. The Tissue Factor Pathway and Wound Healing. *Semin Thromb Hemost*, v. 44, n. 02, p. 142–150, 2018.
- HONNEGOWDA, T. M. *et al.* Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing. *Plastic and Aesthetic Research*, v. 2, p. 243–249, 2015.
- HOUGHTON, P. *et al.* The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, v. 42, n. 4, p. 377–387, 2007.
- HUANG, C. *et al.* Negative pressure induces p120-catenin – dependent adherens junction disassembly in keratinocytes during wound healing. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1863, n. 9, p. 2212–2220, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.05.017>>.
- HUNG, C.-F. *et al.* E-cadherin and its downstream catenins are proteolytically cleaved in human HaCaT keratinocytes exposed to UVB. *Experimental Dermatology*, v. 15, n. 4, p. 315–321, 1 abr. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2006.00411.x>>.
- HUYUT, Z.; BEYDEMİR, Ş.; GÜLÇİN, İ. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochemistry research international*, v. 2017, p. 7616791, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29158919>>.
- IBRAHIM, N. *et al.* Wound Healing Properties of Selected Natural Products. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. [S.l: s.n.], 2018
- ILAVARASAN, R.; MALLIKAB, M.; VENKATARAMANC, S. Anti-Inflammatory and Antioxidant of Cassia fistula bark extracts. *Afr. J. Trad. CAM*, v. 2, n. 1, p. 70–85, 2005.
- IRSHAD, M. *et al.* Comparative Analysis of the Antioxidant Activity of Cassia fistula Extracts. *International journal of medicinal chemistry*, v. 2012, p. 157125, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25374682>>.
- JANG, J. K. *et al.* Wound healing effect of cuttlebone extract in burn injury of rat. *Food Science and Biotechnology*, v. 22, n. SUPPL. 1, p. 99–105, 2013.
- JARALD, E. *et al.* Biochemical Evaluation of the Hypoglycemic Effects of Extract and Fraction of

Cassia fistula Linn. in Alloxan-induced Diabetic Rats. *Indian J Pharm Sci.*, v. 75, n. 4, p. 427–434, 2013.

JENSEN, J.; PROKSCH, E. The skin's barrier. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*, v. 144, n. 6, p. 689–700, 2009.

JOSE, G. M.; KURUP, G. M. The efficacy of sulfated polysaccharides from *Padina tetraströmatica* in modulating the immune functions of RAW 264 . 7 cells. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, v. 88, p. 677–683, 2017.

JUNKER, J. P. E. *et al.* Clinical Impact Upon Wound Healing and Inflammation in Moist, Wet, and Dry Environments. *Advances in wound care*, v. 2, n. 7, p. 348–356, set. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587972>>.

KANT, V. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Immunopharmacology*, v. 20, n. 2, p. 322–330, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156757691400112X>>.

KASOTE, D. M. *et al.* Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International journal of biological sciences*, v. 11, n. 8, p. 982–991, 11 jun. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26157352>>.

KASOTE, D. M.; HEGDE, M. V; KATYARE, S. S. Mitochondrial dysfunction in psychiatric and neurological diseases: Cause(s), consequence(s), and implications of antioxidant therapy. *BioFactors*, v. 39, n. 4, p. 392–406, 1 jul. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/biof.1093>>.

KECK, M. *et al.* Pathophysiology of burns. *Wien Med Wochenschr*, v. 159, n. 13–14, p. 327–336, 2009.

KEEPERS, Y. P. *et al.* Comparison of the Sulforhodamine B Protein and Tetrazolium (MTT) Assays for in vitro Chemosensitivity Testing. v. 27, n. 7, p. 1–4, 2003.

KIM, D. *et al.* Chemical Composition of Essential Oil from *Erigeron annuus* (L .) Pers . Flower and its Effect on Migration and Proliferation in Keratinocyte. *Journal of essential oil-bearing plants JEOP*, v. 21, n. 5, p. 1–9, 2018.

KIM, M. *et al.* *Stellera chamaejasme* and its constituents induce cutaneous wound healing and anti-inflammatory activities. *Sci Rep., Nature Publishing Group*, v. 7, p. 1–12, 2017.

KIRFEL, G.; HERZOG, V. Migration of epidermal keratinocytes: Mechanisms, regulation, and biological significance. *Protoplasma*, v. 223, n. 2–4, p. 67–78, 1 jul. 2004.

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. v. 13, n. e23, p. 1–12, 2011a.

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, v. 13, p. e23–e23, 11 jul. 2011b. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740602>>.

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. Disponível em: <https://journals.lww.com/jdnaonline/Fulltext/2011/07000/Anatomy_and_Physiology_of_the_Skin.3.aspx>.

KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Science International*, v. 203, n. 1, p. 93–98, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073810003336>>.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. *A review of the antioxidant potential of medicinal plant species*. [S.l: s.n.], 2011. v. 89.

KRZYSZCZYK, P. *et al.* The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in physiology*, v. 9, p. 419, 1 maio 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29765329>>.

KUBO, H. *et al.* Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. *Legal Medicine*, v. 16, n. 1, p. 8–13, 2014.

KUMAR, A.; PANDE, C. S.; KAUL, R. K. *Chemical examination of Cassia fistula flowers*. *Indian Journal of Chemistry*. [S.l.]: NATL INST SCIENCE COMMUNICATION DR KS KRISHNAN MARG, NEW DELHI 110 012, INDIA. , 1966

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, C. *et al.* Comparison of anti-inflammatory effect and protein profile between the water extracts from Formosan sambar deer and red deer. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 26, n. 4, p. 1275–1282, 2018.

KUPPER, T. S.; FUHLBRIGGE, R. C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature Reviews Immunology*, v. 4, p. 211–222, 1 mar. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nri1310>>.

KUTNER, A.; FRIEDMAN, A. Nitric oxide nanoparticles for wound healing: future directions to overcome challenges. *Expert Review of Dermatology*, v. 8, n. 5, p. 451–461, 1 out. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1586/17469872.2013.837670>>.

KUWAHARA, M. *et al.* E-cadherin expression in wound healing of mouse skin. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 28, p. 191–199, 2001.

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÅHLE, M. Transition from inflammation to proliferation : a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 73, p. 3861–3885, 2016.

LEE, C. K.; HANSEN, S. L. Management of Acute Wounds. *Surgical Clinics of North America*, v. 89, n. 3, p. 659–676, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039610909000413>>.

LEE, S. Y. *et al.* Astragaloside VI and cycloastragenol-6-O-beta-D-glucoside promote wound healing in vitro and in vivo. *Phytomedicine*, v. 38, n. September 2017, p. 183–191, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.12.003>>.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *The American journal of pathology*, v. 78, n. 1, p. 71–100, jan. 1975. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1109560>>.

LIMA, N. R. *Desenvolvimento farmacêutico e avaliação farmacológica do extrato padronizado (CLAE-DAD) e constituintes químicos de Amburana cearensis (cumaru) cultivada*. 2013. 144 f. 2013.

LIMTRAKUL, P. *et al.* Anti-aging and tyrosinase inhibition effects of Cassia fistula flower butanolic extract. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 16, n. 1, p. 497, 3 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27912751>>.

LODÉN, M. *Effect of moisturizers on epidermal barrier function*. [S.l: s.n.], 2012. v. 30.

LUO, J.; CHEN, A. F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 26, p. 259, 1 mar. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1745->

7254.2005.00058.x>.

MARMITT, D. *et al.* The healing properties of medicinal plants used in the Brazilian public health system: a systematic review. *J Wound Care*, v. 27, n. Sup6, p. S4–S13, 2018.

MATHES, S. H.; RUFFNER, H.; GRAF-HAUSNER, U. The use of skin models in drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 69–70, p. 81–102, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X13002925>>.

MATOS, F. J. DE A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 3. ed. ed. Fortaleza: [s.n.], 2009.

MCDOUGALL, S. *et al.* Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modelling and clinical implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, v. 364, p. 1385–1405, 15 jun. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rsta.2006.1773>>.

MENON, S. N. *et al.* Modelling the interaction of keratinocytes and fibroblasts during normal and abnormal wound healing processes. *Proceedings. Biological sciences*, v. 279, n. 1741, p. 3329–3338, 22 ago. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22628464>>.

MINUTTI, C. M. *et al.* Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 61, p. 3–11, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.006>>.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radicals DPPH for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, v. 26, n. 2, p. 211–219, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, v. 65, p. 55–63, 1983.

MOURA, L. I. F. *et al.* Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review. *Acta Biomaterialia*, v. 9, n. 7, p. 7093–7114, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706113001633>>.

MURRAY, R. Z. *et al.* Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns & Trauma*, v. 7, n. 1, p. 2, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s41038-018-0139-7>>.

NATARAJAN, V. T. *et al.* Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nature Chemical Biology*, v. 10, p. 542, 17 jun. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nchembio.1548>>.

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. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587812>>.

NESTLE, F. O. *et al.* Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, p. 679, 18 set. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nri2622>>.

NYAME, T. T.; CHIANG, H. A.; ORGILL, D. P. Clinical Applications of Skin Substitutes. *Surgical Clinics of North America*, v. 94, n. 4, p. 839–850, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039610914000851>>.

ODA, H.; TAKEICHI, M. Structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *J Cell Biol.*, v. 193, n. 7, p. 1137–1146, 2011.

OJEH, N. *et al.* *Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. International Journal of Molecular Sciences*. [S.l.: s.n.], 2015

OLÁH, A.; SZÖLLÖSI, A. G.; BÍRÓ, T. The Channel Physiology of the Skin. In: NILIUS, B. *et al.*

(Org.). *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 65–131. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/112_2012_7>.

OLIVEIRA, G. L. S. *Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH": estudo de revisão*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. [S.l.]: scielo . , 2015

PAKYARI, M. *et al.* Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Advances in wound care*, v. 2, n. 5, p. 215–224, jun. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24527344>>.

PAN, S.-Y. *et al.* New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, p. 627375, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2013/627375>>.

PAPAZISIS, K. T. *et al.* Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods*, v. 208, n. 2, p. 151–158, 1997.

PARK, J. Y. *et al.* Wound healing effects of deoxyshikonin isolated from Jawoongo: In vitro and in vivo studies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 199, n. September 2016, p. 128–137, 2017.

PASTAR, I. *et al.* Epithelialization in Wound Healing : A Comprehensive Review. *Advances in wound care*, v. 3, n. 7, p. 445–464, 2014.

PATRUNO, A. *et al.* Extremely low-frequency electromagnetic fields accelerates wound healing modulating MMP-9 and inflammatory cytokines. *Cell Proliferation*, v. 51, n. 2, p. 1–9, 2018.

PELLENZ, N. L. *et al.* Analysis of In Vitro Cyto- and Genotoxicity of Barbatimão Extract on Human Keratinocytes and Fibroblasts. *Biomed Res Int*, v. 2018, p. 1942451, 2018.

PEREIRA, R. F.; BÁRTOLO, P. J. Traditional Therapies for Skin Wound Healing. *Advances in wound care*, v. 5, n. 5, p. 208–229, 1 maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27134765>>.

PERIAYAH, M. H.; HALIM, A. S.; MAT SAAD, A. Z. Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, v. 11, n. 4, p. 319–327, 1 out. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29340130>>.

PETPIROON, N. *et al.* Kaempferol-3-O-rutinoside from *Afgekia mahidoliae* promotes keratinocyte migration through FAK and Rac1 activation. *Journal of Natural Medicines*, v. 69, n. 3, p. 340–348, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11418-015-0899-3>>.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 48, n. 1, p. 1–22, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962203500056>>.

PIRIZ, M. A. *et al.* *Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. [S.l.]: scielo . , 2014

PITZ, H. *et al.* Cytoprotective Effects of Jaboticaba (*Plinia peruviana*, Poir. Govaerts) Fruit Peel Extracts against H₂O₂-Induced Oxidative Stress. *Reactive Oxygen Species*, n. January, 2017.

POLJŠAK, B.; DAHMANE, R. G.; GODIĆ, A. Intrinsic skin aging: The role of oxidative stress. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica*, v. 21, n. 2, p. 33–36, 2012.

POWERS, J. G. *et al.* Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 74, n. 4, p. 607–625, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962215021830>>.

- POZZI, A.; YURCHENCO, P. D.; IOZZO, R. V. The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biology*, v. 57–58, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X16303262>>.
- PRATA, M. *et al.* Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em rato. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 3, n. 2, p. 43–48, 1988.
- PRENTICE, W. E.; QUILLEN, W. S.; UNDERWOOD, F. Using Therapeutic Modalities to Affect the Healing Process. *Therapeutic Modalities in Rehabilitation*. 4 ed ed. [S.l.]: McGraw-Hill Education, 2005. .
- PRIYADHARSHINI, S.; SUJATHA, V. Antioxidant assessment for various solvent fractions Of Cassia fistula Linn. flowers. *International Journal of PharmTech Research*, v. 4, n. 1, p. 510–517, 2012.
- PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J.-M. *The skin: an indispensable barrier. Experimental dermatology*. [Copenhagen, DK] : Munksgaard. , 2008
- QUAGLINO, J. D. *et al.* Transforming growth factor-beta stimulates wound healing and modulates extracellular matrix gene expression in pig skin: incisional wound model. *The Journal of investigative dermatology*, v. 97, n. 1, p. 34–42, 1991.
- RAJU, I.; MALLIKA, M.; VENKATARAMAN, S. Anti-inflammatory and antioxidant activities of Cassia fistula Linn bark extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, v. 2, n. 1, p. 70–85, 22 dez. 2005.
- RAMOS, M. V *et al.* Wound healing modulation by a latex protein-containing polyvinyl alcohol biomembrane. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 389, n. 7, p. 747–756, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00210-016-1238-2>>.
- RÄSÄNEN, K.; VAHERI, A. Proliferation and motility of HaCaT keratinocyte derivatives is enhanced by fibroblast nemesi. *Experimental Cell Research*, v. 316, n. 10, p. 1739–1747, 2010.
- RAVI, A. *et al.* Antioxidant Activity and In Silico Analysis of Centella asiatica and Indigofera aspalathoides in Psoriasis. *Biomedical and Pharmacology Journal*, v. 11, n. 3, p. 1403–1412, 2018.
- RAWLINGS, A. V. Recent advances in skin ‘barrier’ research. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 62, n. 6, p. 671–677, 1 jun. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1211/jpp.62.06.0002>>.
- REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012. Disponível em: <<https://www.karger.com/DOI/10.1159/000339613>>.
- RICHMOND, N. A. *et al.* US–National Institutes of Health-funded research for cutaneous wounds in 2012. *Wound Repair and Regeneration*, v. 21, n. 6, p. 789–792, 1 nov. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/wrr.12099>>.
- RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *Journal of Cell Communication and Signaling*, v. 10, n. 2, p. 103–120, 2016.
- RODRIGUES, M. *et al.* Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews*, v. 99, n. 1, p. 665–706, 26 nov. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>>.
- ROUSSELLE, P.; BRAYE, F.; DAYAN, G. Re-epithelialization of adult skin wounds : Cellular mechanisms and therapeutic strategies ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018.
- RUTTER, L. Obtaining the optimum moist wound healing environment. *British Journal of Community Nursing*, v. 22, n. Sup12, p. S36–S40, 30 nov. 2017. Disponível em:

<<https://doi.org/10.12968/bjcn.2017.22.Sup12.S36>>.

SAINT-CRICQ DE GAULEJAC, N.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, n. 2, p. 425–31, 1999.

SALAMONE, A. B. *et al.* Grand challenge in Biomaterials-wound healing. *Regenerative Biomaterials*, v. 3, n. 2, p. 127–128, 8 mar. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/rb/rbw015>>.

SALO, T. *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest.*, v. 70, n. 2, p. 176–182, 1994.

SAMI, D. G.; HEIBA, H. H.; ABDELLATIF, A. SC. *Biochemical Pharmacology*, 2018.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental Cell Research*, v. 304, n. 1, p. 274–286, 2005.

SAVOJI, H. *et al.* Skin Tissue Substitutes and Biomaterial Risk Assessment and Testing. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. 6, p. 86, 26 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30094235>>.

SCHÄFER, B. M. *et al.* Plasminogen activation in healing human wounds. *The American journal of pathology*, v. 144, n. 6, p. 1269–1280, jun. 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8203466>>.

SCHMIDT, C. *et al.* Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 122, n. 3, p. 523–532, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109000385>>.

SEN, C. K. *et al.* Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*, v. 17, n. 6, p. 763–771, 1 nov. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x>>.

SEO, S. H. *et al.* Polygonum aviculare L. And its active compounds, quercitrin hydrate, caffeic acid, and rutin, activate the Wnt/ β -catenin pathway and induce cutaneous wound healing. *Phytotherapy Research*, v. 30, n. 5, p. 848–854, 2016.

SERRA, M. B. *et al.* From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing. *International journal of inflammation*, v. 2017, p. 3406215, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28811953>>.

SHPICHKA, A. *et al.* Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 3, p. 1–16, 2019.

SHUPP, J. W. *et al.* A Review of the Local Pathophysiologic Bases of Burn Wound Progression. *Journal of Burn Care & Research*, v. 31, n. 6, p. 849–873, 2010.

SILVA, A. H. *Desenvolvimento e caracterização do extrato de Erythrina velutina para o tratamento de doença neurodegenerativa*. 2012. 113 f. 2012.

SINDRILARU, A. *et al.* An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice Find the latest version : An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. 2011.

SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C.-E. The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*, v. 35, n. 9, p. 473–477, 2017. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263931917301369>>.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, p. 144–158, 1965. Disponível em: <<http://sci-hub.cc/http://www.ajeonline.org/content/16/3/144.short>>.

SINNO, H.; PRAKASH, S. Complements and the wound healing cascade: an updated review. *Plastic surgery international*, v. 2013, p. 146764, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23984063>>.

SOOD, A.; GRANICK, M. S.; TOMASELLI, N. L. Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data. *Advances in wound care*, v. 3, n. 8, p. 511–529, 1 ago. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25126472>>.

SORG, H. *et al.* Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*, v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 2017. Disponível em: <<https://www.karger.com/DOI/10.1159/000454919>>.

SOUZA, T. DE F. G. EFEITO CICATRIZANTE DA FRAÇÃO METANÓLICA DAS FOLHAS DE *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn: ESTUDO *in vitro* E EM QUEIMADURAS SUPERFICIAIS EM CAMUNDONGOS. 2019. 135 f. Universidade Federal do Ceará (UFC), 2019.

STRONG, A.; NEUMEISTER, M.; LEVI, B. Stem Cells and Tissue Engineering: Regeneration of the Skin and Its Contents. *Clin Plast Surg.*, v. 44, n. 3, p. 635–650, 2017.

SU, Y.; RICHMOND, A. Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of Skin Wounds. *Advances in Wound Care*, v. 4, n. 11, p. 631–640, 6 ago. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/wound.2014.0559>>.

SUDSAI, T.; WATTANAPIROMSAKUL, C.; TEWTRAKUL, S. Wound healing property of isolated compounds from *Boesenbergia kingii* rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 184, p. 42–48, 2016.

SUN, H. *et al.* Vaccaria hypaphorine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation via inactivation of NFκB and ERK pathways in Raw 264.7 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 17, p. 1–11, 2017.

SÜNTAR, I. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, v. 19, n. 5, p. 1199–1209, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11101-019-09629-9>>.

TAKEICHI, M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, v. 102, n. 4, p. 639–655, 1 abr. 1988. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/content/102/4/639.abstract>>.

TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 5, n. 1, p. a023267, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25561722>>.

TEWTRAKUL, S. *et al.* Antiinflammatory and Wound Healing Effects of *Caesalpinia sappan* L. *Phytother Res.*, v. 29, n. 6, p. 850–856, 2015.

THABIT, S. *et al.* Evaluation of antioxidant and neuroprotective activities of *Cassia fistula* (L.) using the *Caenorhabditis elegans* model. *PeerJ*, v. 6, p. e5159–e5159, 13 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30023139>>.

THARUKA, M. *et al.* Molecular characterization and expression analysis of big-belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*) interleukin-10 and analysis of its potent anti-inflammatory properties in

LPS-induced murine macrophage RAW 264.7 cells. *Gene*, p. #pagerange#, 2018.

TONIN, T. D. *Atividade anti-inflamatória e cicatrizante in vivo e in vitro do extrato metanólico e niga-ichigosídeo F1 obtidos das partes aéreas de Rubus imperialis Cham. Schl. (Rosaceae)*. 2016. 1–84 f. Universidade do Vale do Itajaí, 2016.

TRAN, N. Q. *et al.* In situ forming and rutin-releasing chitosan hydrogels as injectable dressings for dermal wound healing. *Biomacromolecules*, v. 12, n. 8, p. 2872–2880, 2011.

UD-DIN, S.; BAYAT, A. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair : In silico , in vitro , ex vivo , and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Repair and Regeneration*, v. 25, n. 2, p. 164–176, 2017.

VALLI, M. *et al.* Development of a Natural Products Database from the Biodiversity of Brazil. *Journal of Natural Products*, v. 76, n. 3, p. 439–444, 22 mar. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/np3006875>>.

VAN DE GRAAFF, K. M. *Anatomia Humana*. Manole ed. Barueri: [s.n.], 2003.

VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2015.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/147323000903700531>>.

WALLACE, H.; ZITO, P. Wound Healing Phases. *StatPearls*. [S.l.]: StatPearls Publishing, 2019. .

WANG, J. H.-C. *et al.* Mechanoregulation of gene expression in fibroblasts. *Gene*, v. 391, n. 1, p. 1–15, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111907000339>>.

WANG, Y.; CARRIM, N.; NI, H. Fibronectin orchestrates thrombosis and hemostasis. *Oncotarget*, v. 6, n. 23, p. 19350–19351, 3 ago. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26305982>>.

WANG, Z. *et al.* *Enhanced Keratinocyte Proliferation and Migration in Co-culture with Fibroblasts*. [S.l: s.n.], 2012. v. 7.

WIEGAND, C.; HIPLER, U.-C. Methods for the measurement of cell and tissue compatibility including tissue regeneration processes. v. 3, n. 1, p. 1–9, 2008.

WILLS, R.; BONE, K.; MORGAN, M. Herbal products: Active constituents, modes of action and quality control. *Nutrition research reviews*, v. 13, n. 1, p. 47–77, 1 jul. 2000.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1 jan. 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>>.

WU, X. *et al.* Dihydrontanshinone, a natural product, alleviates LPS-induced inflammatory response through NF- κ B, mitochondrial ROS, and MAPK pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 355, p. 1–8, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X18302655>>.

YANG, H. L. *et al.* Lucidone Promotes the Cutaneous Wound Healing Process via Activation of the PI3K/AKT, Wnt/ β -catenin and NF- κ B Signaling Pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1864, n. 1, p. 151–168, 2017.

YOUNG, P. *et al.* E-cadherin controls adherens junctions in the epidermis and the renewal of hair follicles. *The EMBO journal*, v. 22, n. 21, p. 5723–5733, 3 nov. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14592971>>.

ZHAO, R. *et al.* Inflammation in Chronic Wounds. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 12, p. 2085, 11 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27973441>>.

9. APÊNDICES

APÊNDICE A:



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DO EXTRATO PADRONIZADO DAS FLORES DE *Cassia fistula* Linn. (CHUVA-DE-OURO) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO IN VITRO E IN VIVO E ELUCIDAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO", protocolada sob o CEUA nº 8846160418 (ID 000853), sob a responsabilidade de **Nylane Maria Nunes de Alencar e equipe; Taiana Magalhaes Pierdoná Martins** - 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 12/03/2019.

We certify that the proposal "EFFECT OF THE STANDARD EXTRACT OF THE FLOWERS OF *Cassia fistula* Linn. (GOLD RAIN) ON THE IN VITRO AND IN VIVO HEALING PROCESS AND THE ELUCIDATION OF THE POSSIBLE MECHANISM OF ACTION", utilizing 130 Heterogenics mice (130 females), protocol number CEUA 8846160418 (ID 000853), under the responsibility of **Nylane Maria Nunes de Alencar and team; Taiana Magalhaes Pierdoná Martins** - 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 03/12/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [04/2019](#) a [10/2019](#)

Área: [Departamento de Fisiologia E Farmacologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [5 a 6 semanas](#)

N: [130](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [20 a 25 g](#)

Local do experimento: Os experimentos serão realizados em salas de cirurgia adequadas para os procedimentos situadas no biotério do NPDM. As salas possuem uma estrutura que combina aspectos construtivos e equipamentos que buscam estabilizar as condições ambientais das áreas fechadas e restritas, e minimizar a probabilidade de patógenos e outros organismos indesejáveis de infectarem os animais em experimentação.

Fortaleza, 22 de março de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

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

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari

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

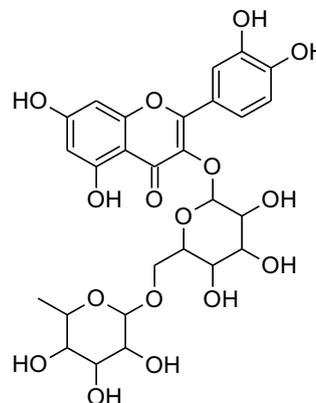
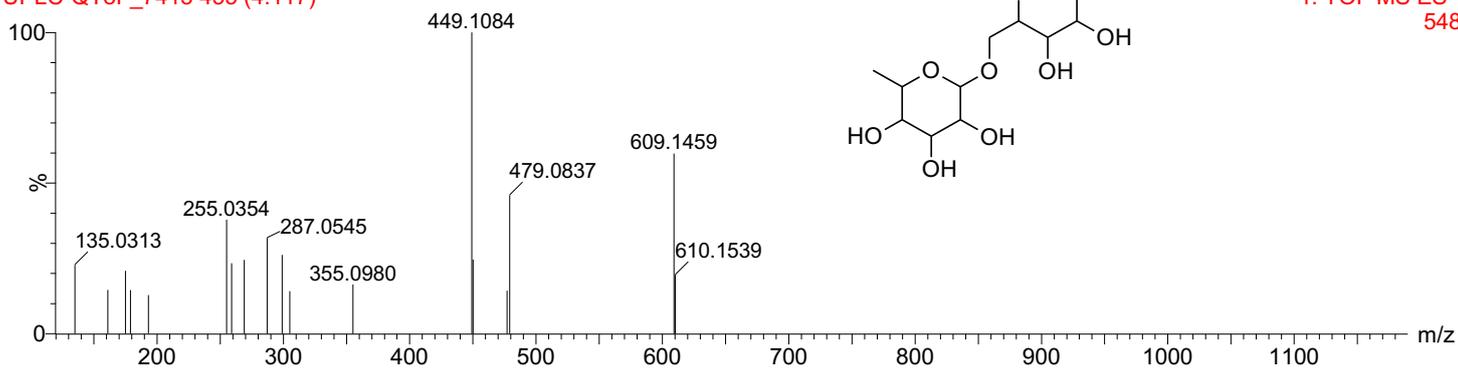
APÊNDICE B:

Espectros de massa e estruturas químicas identificadas no extrato etanólico das flores de *Cassia fistula* Linn.

A

FCF11

UPLC-QToF_7413 455 (4.117)

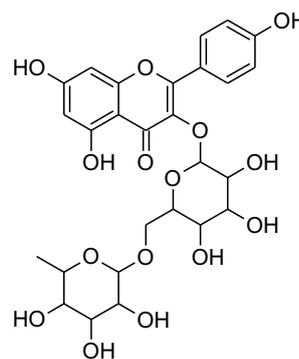
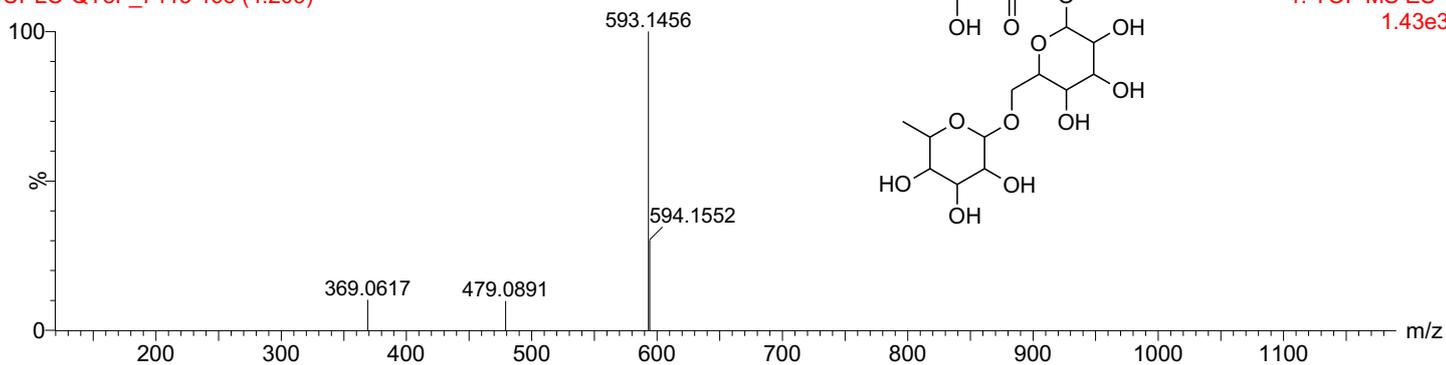


1: TOF MS ES-
548

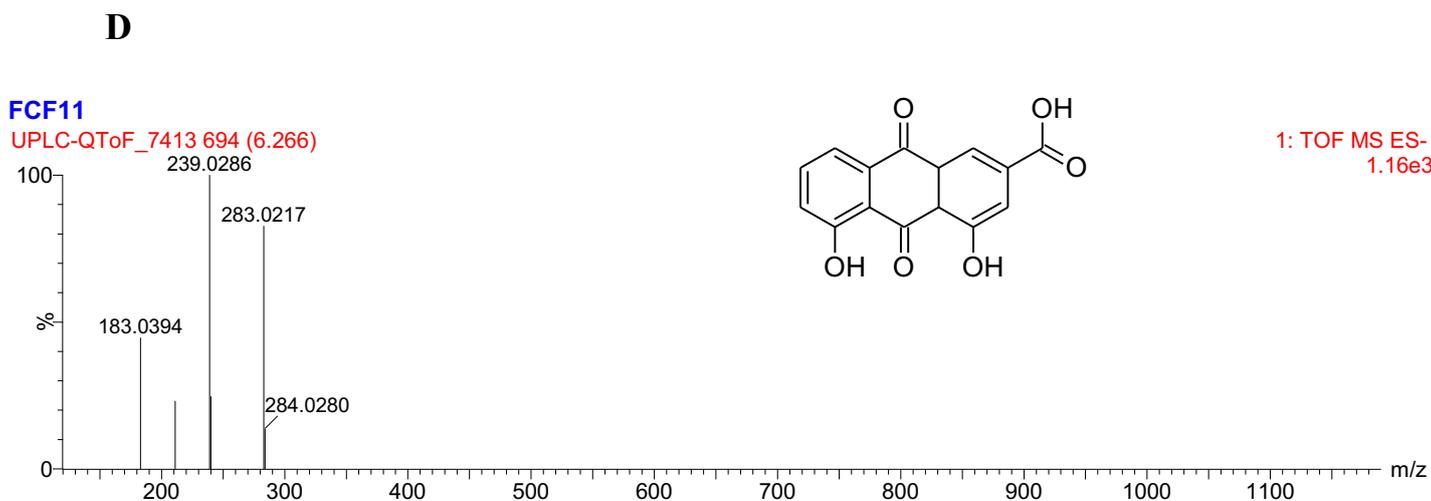
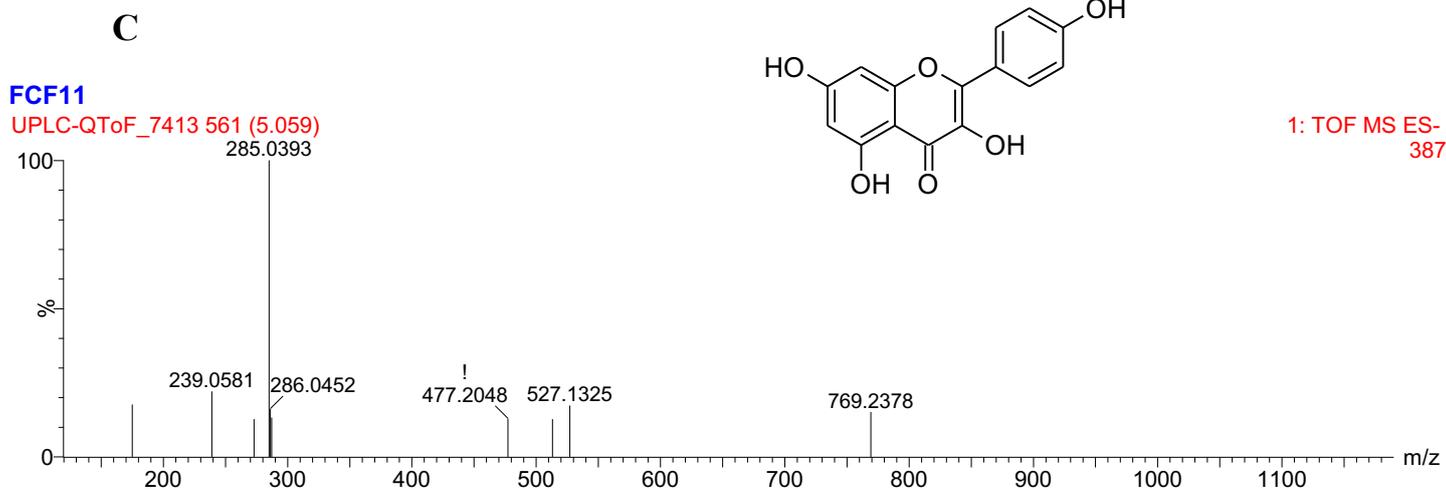
B

FCF11

UPLC-QToF_7413 466 (4.209)



1: TOF MS ES-
1.43e3



Legenda: A: rutina, B: Kampferol 3-O-rutinosideo, C: Kampferol, D: Reína