

THALIA DEL ROSARIO LOYO CASAO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE POMADA A BASE DE  
EXTRATO DA CASCA DE *Croton urucurana* BAILL. EM  
CAMUDONGOS *KNOCKOUT* IL-10**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS–BRASIL  
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

L923a  
2018 Loyo Casao, Thalia Del Rosario, 1989-  
Avaliação da atividade cicatrizante de pomada a base de  
extrato de *Croton urucurana* Baill. em camundongos *knockout*  
IL-10 / Thalia Del Rosario Loyo Casao. – Viçosa, MG, 2018.  
xii, 60 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: João Paulo Viana Leite.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Croton urucurana*. 2. Cicatrização de ferimentos.  
3. Proantocianidinas. 4. Citocinas. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.


CDD 22. ed. 583.69

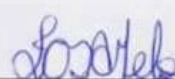
THALIA DEL ROSARIO LOYO CASAO

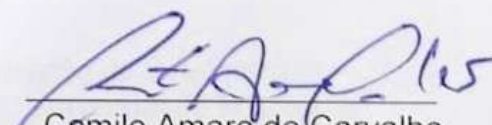
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE POMADA A BASE  
DE EXTRATO DA CASCA DE *Croton urucurana* BAILL. EM  
CAMUDONGOS *KNOCKOUT* IL-10**

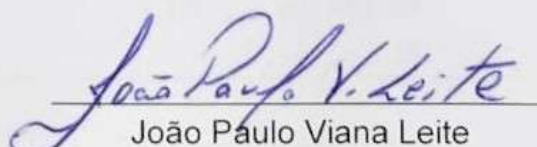
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2018.

  
Reggiani Vilela Gonçalves

  
Fabiana Cristina Silvana Alves de Melo

  
Camilo Amaro de Carvalho

  
João Paulo Viana Leite  
(Orientador)

*“seré un sueño que si se cumplió”*

*José José*

*!Dedicado a la memoria de Jaden Loyo Rosas, un  
recuerdo de una victoria ganada!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida, por cada momento feliz e pelas dificuldades que passei. Obrigada por estar sempre comigo e por todas aquelas pessoas que conheci neste caminhar.

À Universidade Federal de Viçosa juntamente com o programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade de cursar o mestrado e a execução deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor João Paulo Viana Leite, que me deu esta oportunidade e por todo o apoio durante o meu processo acadêmico.

A minha coorientadora Reggiani Vilela Gonçalves, por ter aberto as portas de seu laboratório e sua disposição na colaboração deste trabalho.

A todos meus amigos do Laboratório de Biodiversidade, que tem contribuído de alguma forma na realização deste trabalho em especial a Camila pinheiro pela cooperação deste projeto. .

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Patologia Experimental por sua companhia amizade e contribuição na execução dos experimentos. Mariáurea Matias pela ajuda infinita o tempo todo e sua compreensão; Evaristo Villalba pelo apoio incondicional, muito obrigada a todos vocês.

Ao Prof. Wagner Vilegas e a doutoranda Ana Zanatta do Campus Experimental de São Vicente, UNESP, Universidade do Estado de São Paulo, São Vicente - SP pela obtenção dos dados de análise de LC-MS.

Ao prof. André Talvani e o técnico Rodrigo Dian do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP pela obtenção dos dados de análise de Citometria de Fluxo.

Ao laboratório de Biologia Estrutural junto com o laboratório de morfologia animal pelo fornecimento do material para histologia.

Ao herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa pela identificação e preparo de exsicata.

Ao colega de trabalho; Daniel Bastos pelas sugestões e contribuição na orientação estatística dos dados desse trabalho.

Agradeço ao grupo do FalAê que gostam de ensinar a praticar o português para estrangeiros, foram de muita ajuda em todo tempo, obrigada pela amizade e por todo esse carinho e afeto.

Agradeço à República Federativa do Brasil junto com o grupo Coimbra de Universidades brasileiras pela cooperação acadêmica internacional mediante programas de internacionalização e apoio aos estrangeiros.

Aos órgãos que fomentam a pesquisa e o desenvolvimento da ciência no México. CONACYT, pelo fornecimento de bolsa.

Agradeço a todos meus amigos e familiares no México que acreditaram em mim e mostraram seu apoio incondicional, em especial aos meus pais Dora Maria Casao e Ignacio Loyo pelo exemplo de vida e seus esforços, amo vocês.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT.....	xii
<b>CAPITULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>REVISÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
1.1.1 A FAMÍLIA Euphorbiaceae .....	4
1.1.2 GÊNERO <i>Croton</i> .....	5
1.1.3 <i>Croton urucurana</i> BAILL.....	8
1.1.4 <i>Croton urucurana</i> NA MEDICINA POPULAR.....	10
1.1.5 PELE .....	11
1.1.6 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS .....	12
1.1.7 CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO .....	13
1.2 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO .....	15
<b>1.3 . OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
1.3.1 OBJETIVO GERAL.....	16
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>1.4 REFERENCIAS</b> .....	<b>17</b>
<b>CAPITULO II</b> .....	<b>25</b>
<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE POMADA A BASE DE EXTRATO DA CASCA DE <i>CROTON URUCURANA</i> BAILL. EM CAMUDONGOS <i>KNOCKOUT</i> IL-10</b> .....	<b>25</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>26</b>
<b>2 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
2.1.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	28
2.1.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL.....	29
2.1.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR FIA-ESI-IT-MS/MS <sup>N</sup> .....	29
2.1.4 CLEAN UP EM SPE .....	30
2.1.5 ANÁLISE POR FIA-ESI-IT-MS <sup>N</sup> .....	30
2.1.6 COMPOSIÇÃO DA POMADA A BASE DE EXTRATO DE <i>C. urucurana</i> .....	30
2.1.7 ANIMAIS.....	31
2.1.8 DESENHO EXPERIMENTAL .....	31
2.1.9 INDUÇÃO DE FERIDAS .....	32
2.1.10 CÁLCULO DA ÁREA DA FERIDA E A TAXA DE CONTRAÇÃO TECIDUAL .....	32
2.1.11 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	32
2.1.12 ANÁLISE DE MASTÓCITOS .....	33

2.1.13	ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS .....	33
2.1.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
<b>2.2</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
2.2.1	PERFIL FITOQUÍMICO .....	34
2.2.2	AVALIAÇÃO DA ÁREA DA FERIDA E A TAXA DE CONTRAÇÃO TECIDUAL .....	43
2.2.3	ANALISE HISPATOLOGICA.....	46
2.2.4	AVALIAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATORIAS E ANTI- INFLAMATORIAS NO TECIDO CICATRICAL .....	51
<b>2.3</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>2.4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ESPECIES DE <i>CROTON</i> SPP. CONHECIDAS COMO SANGUE DE DRAGÃO. ....	6
TABELA 2. DADOS DOS ÍONS PRECURSORES E SUAS RESPECTIVAS FRAGMENTAÇÕES OBTIDAS POR FIA-ESI-IT-MSN DE ECU (MODO NEGATIVO) .....	37
TABELA 3. DADOS DOS ÍONS PRECURSORES E SUAS RESPECTIVAS FRAGMENTAÇÕES OBTIDAS POR FIA-ESI-IT-MSN DE ECU (MODO POSITIVO).....	40
TABELA 4. ÁREA (MM <sup>2</sup> ) E TAXA DE CONTRAÇÃO DA FERIDA (TCF) (%) EM CAMUNDONGOS C57 SELVAGENS E CAMUNDONGOS <i>KNOCKOUT</i> IL-10 TRATADOS COM ECU. ....	44

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. RELATO DE INCIDÊNCIA DO GÊNERO <i>CROTON</i> NO PLANETA (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2017).....	5
FIGURA 2. ÁRVORE DE <i>CROTON URUCURANA</i> NO LOCAL DA COLETA SERRA DO BRIGADEIRO, MINAS GERAIS, BRASIL (A) LÁTEX VERMELHO SANGUE (B). ....	8
FIGURA 3. COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM <i>CROTON URUCURANA</i> . ADAPTADO DE CORDEIRO ET AL. (2016).....	9
FIGURA 4. VARIAÇÕES ESTRUTURAIS DOS MONÔMEROS DE PROANTOCIANIDINAS. ADAPTADA DE LEITE, (2009). ....	35
FIGURA 5. TIPOS DE LIGAÇÕES FORMADAS PELOS OLIGÔMEROS DE PROANTOCIANIDINAS A PARTIR DE SUA ESTRUTURA BÁSICA. ADAPTADA DE LEITE, (2009). ....	35
FIGURA 6. ESPECTRO DE MASSA EM “FULL SCAN” INDICANDO OS ÍONS [M-H] <sup>-</sup> DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES EM ECU .... <b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>	
FIGURA 7. PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DE PROANTOCIANIDINAS DIMÉRICAS TIPO B PRESENTES EM <i>CROTON URUCURANA</i> RDA: FRAGMENTAÇÃO RETRO-DIELS-ALDER; QM: FRAGMENTAÇÃO QUINONA METÍDEO. ADAPTADO DE JAIDWALL ET AL. (2012).....	39
FIGURA 8. TEMBETARINA (A), MAGNOFLORINA (B), ALCALOIDES IDENTIFICADOS NO EXTRATO DE <i>CROTON URUCURANA</i> , DETERMINADOS POR FIA-ESI-IT-MSN NO MODO POSITIVO.	41
FIGURA 9. PROPOSTA DE MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DO ALCALOIDE MAGNOFLORINA. ADAPTADO DE YAN ET AL. (2013). ....	41
FIGURA 10. ESPECTRO DE FIA-ESI-IT-MSN DE ECU DO ÍON PROTONADO DE M/Z 342, NO MODO POSITIVO. ....	42
FIGURA 11. ESPECTRO DE FIA-ESI-IT-MSN DE ECU DO ÍON PROTONADO DE M/Z 344, NO MODO POSITIVO. ....	43
FIGURA 12. FOTOGRAFIAS REPRESENTATIVAS DAS FERIDAS NOS DIAS 0°, 7°, E 14° DE CAMUNDONGOS C57 SELVAGENS E CAMUNDONGOS <i>KNOCKOUT</i> IL-10. GRUPO SALC57: C57 SELVAGEM SOLUÇÃO SALINA 0,9 %. GRUPOS <i>KNOCKOUT</i> IL-10: SAL, SOLUÇÃO SALINA 0,9%; BAS, POMADA DE POLIETILENOGLICOL; SS, SULFADIAZINA DE PRATA 1%; CR1, POMADA DE <i>C. URUCURANA</i> 5%; CR2, POMADA DE <i>C. URUCURANA</i> 10%. ....	45
FIGURA 13. NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS E VASOS SANGUÍNEOS DO TECIDO CICATRICAL NOS DIAS 0°, 7°, E 14° DE CAMUNDONGOS C57 SELVAGENS E CAMUNDONGOS <i>KNOCKOUT</i> IL-10. GRUPO SALC57: C57 SELVAGEM SOLUÇÃO SALINA 0,9 %. GRUPOS <i>KNOCKOUT</i> IL-10: SAL, SOLUÇÃO SALINA 0,9%; BAS, POMADA DE POLIETILENOGLICOL; SS, SULFADIAZINA DE PRATA 1%; CR1, POMADA DE <i>C. URUCURANA</i> 5%; CR2, POMADA DE <i>C. URUCURANA</i> 10%. OS DADOS SÃO REPRESENTADOS COMO MÉDIA ± DP. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS P <0,05 (TESTE KRUSKAL-WALLIS). ....	47
FIGURA 14. PROPORÇÃO DE MASTÓCITOS NO TECIDO CICATRICAL NOS DIAS 0°, 7°, E 14° DE CAMUNDONGOS C57 SELVAGENS E CAMUNDONGOS <i>KNOCKOUT</i> IL-10. GRUPO SALC57: C57 SELVAGEM SOLUÇÃO SALINA 0,9 %. GRUPOS <i>KNOCKOUT</i> IL-10: SAL, SOLUÇÃO SALINA 0,9%; BAS, POMADA DE POLIETILENOGLICOL; SS, SULFADIAZINA DE PRATA 1%; CR1, POMADA DE <i>C. URUCURANA</i> 5%; CR2, POMADA DE <i>C. URUCURANA</i> 10%. OS DADOS SÃO REPRESENTADOS COMO MÉDIA ± DP. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS P <0,05 (TESTE KRUSKAL-WALLIS).....	49
FIGURA 15. DEPOSIÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS TIPO III E FIBRAS COLÁGENAS TIPO I NOS DIAS 0°, 7°, E 14° DE CAMUNDONGOS C57 SELVAGENS E CAMUNDONGOS <i>KNOCKOUT</i> IL-	

10. GRUPO SALC57: C57 SELVAGEM SOLUÇÃO SALINA 0,9 %. GRUPOS *KNOCKOUT* IL-10: SAL, SOLUÇÃO SALINA 0,9; BAS, POMADA DE POLIETILENOGLICOL; SS, SULFADIAZINA DE PRATA 1%; CR1, POMADA DE *C. URUCURANA* 5%; CR2, POMADA DE *C. URUCURANA* 10%. OS DADOS SÃO REPRESENTADOS COMO MÉDIA ± DP. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS  $P < 0,05$  (TESTE KRUSKAL-WALLIS).

.....50

FIGURA 16. CITOCINAS IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF E IL-17A RELACIONADAS AO PERFIL DE RESPOSTA TH1 E TH17 (PRÓ- INFLAMATÓRIAS) NOS DIAS 0º, 7º, E 14º DE CAMUNDONGOS C57 SELVAGENS E CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* IL-10 (A). GRUPO SALC57: C57 SELVAGEM SOLUÇÃO SALINA 0,9 %. GRUPOS *KNOCKOUT* IL-10: SAL, SOLUÇÃO SALINA 0,9%; BAS, POMADA DE POLIETILENOGLICOL; SS, SULFADIAZINA DE PRATA 1%; CR1, POMADA DE *C. URUCURANA* 5%; CR2, POMADA DE *C. URUCURANA* 10%. OS DADOS SÃO REPRESENTADOS COMO MÉDIA ± DP. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS  $P < 0,05$  (TESTE KRUSKAL-WALLIS). .....

.....52

FIGURA 17. CITOCINAS IL-4, IL-6 E IL-10 RELACIONADAS AO PERFIL DE RESPOSTA TH2 (ANTI- INFLAMATÓRIAS) NOS DIAS 0º, 7º, E 14º DE CAMUNDONGOS C57 SELVAGENS E CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* IL-10 (A). GRUPO SALC57: C57 SELVAGEM SOLUÇÃO SALINA 0,9 %. GRUPOS *KNOCKOUT* IL-10: SAL, SOLUÇÃO SALINA 0,9%; BAS, POMADA DE POLIETILENOGLICOL; SS, SULFADIAZINA DE PRATA 1%; CR1, POMADA DE *C. URUCURANA* 5%; CR2, POMADA DE *C. URUCURANA* 10%. OS DADOS SÃO REPRESENTADOS COMO MÉDIA ± DP. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS  $P < 0,05$  (TESTE KRUSKAL-WALLIS). .....

.....53

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
CEUA - Comissão de Ética para Uso de Animais  
CID – Dissociação induzida por coalisão  
DP - Desvio padrão  
ECU - Extrato etanolico das cascas de *C. urucurana*  
FIA-ESI-IT-MS - Análise por injeção em fluxo direto, fonte de ionização por electrospray e analisador íon trap  
HPLC - Cromatografia Líquida de alto desempenho  
H&E - Hematoxilina e eosina  
H<sub>2</sub>O - Agua  
IL-2 - Interleucina 2  
IL-4 - Interleucina 4  
IL-6 - Interleucina 6  
IL-10 - Interleucina 10  
IL-17A - Interleucina17A  
IFN- $\gamma$  - Interferon (gama)  
MEC - Matriz extracelular  
MS - Espectrometria de Massas  
MeOH - Metanol  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PEG - Polietilenoglicol-400  
PESB - Parque Estadual da Serra do Brigadeiro  
PBS - Solução salina tamponada  
R<sub>f</sub> - Fator de retenção  
SPE - Extração em fase sólida  
Th - Célula T helper  
TCF - Taxa de contração da ferida  
TNF - Fator de Necrose Tumoral

## RESUMO

CASAO, Thalia Del Rosario Loyo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Avaliação da atividade cicatrizante de pomada a base de extrato de *Croton urucurana* Baill. em camundongos *knockout* IL-10.** Orientador: João Paulo Viana Leite.

*Croton urucurana*, conhecida como “sangue de dragão” é utilizada na medicina popular como anti-inflamatória e cicatrizante. A composição química de *C. urucurana* representa uma fonte de estudos farmacológicos. O objetivo do presente estudo foi analisar o perfil fitoquímico e atividade cicatrizante do extrato etanólico das cascas de *C. urucurana* (ECU) em camundongos *Knockout* IL-10. Análises por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> foram realizadas para esclarecer a composição química de ECU. O extrato foi empregado na preparação das pomadas nas concentrações de 5% e 10%. Para avaliação da atividade cicatrizante foram utilizados camundongos *Knockout* IL-10 (n=60), e para o controle camundongos selvagens C57 (n=12) divididos em 6 grupos. Camundongos *knouckout* IL10: SAL (salina 0,9%), BAS (polietilenoglicol), SS (sulfadiazina de prata 1%), CR1 (pomada de ECU 5%), CR2 (pomada de ECU 10%); e camundongos selvagens C57: SALC57 (Salina 0,9%). A área e a taxa de contração da ferida foram calculadas nos dias 0°, 7° e 14° do tratamento. Após a ferida, fragmentos da pele foram utilizados para análises histopatológicas e de citocinas nos perfis de resposta Th1, Th2 e Th17. Os animais que receberam a aplicação tópica da pomada a base de extrato etanólico das cascas de *C. urucurana* (ECU), num efeito dose-resposta estimulou a cicatrização em camundongos *knockout* IL-10. Pomada de ECU nas concentrações de 5% e 10% especialmente 5% apresentaram maior taxa de fechamento da ferida, maior quantidade de células (fibroblastos), mastocitos, vasos sanguíneos e deposição de colágeno tipo III e I. Além de isso, demonstraram um aumento de citocinas no perfil de resposta Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4) no dia 7° do tratamento. Compostos polifenólicos como as proantocianidinas presentes em ECU podem ser responsáveis pela atividade farmacológica e o mecanismo de ação no processo da cicatrização.

## ABSTRACT

CASAO, Thalia Del Rosario Loyo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Evaluation of the cicatrizant activity of ointment from *Croton urucurana* Baill. extracts in the knockout IL-10 mice.** Adviser: João Paulo Viana Leite.

*Croton urucurana* (Euphorbiaceae), known as "dragon's blood" is used in folk medicine as anti-inflammatory and healing. The chemical composition of *C. urucurana* represents a source of pharmacological studies. The objective of the present study was to analyze the phytochemical profile and cicatrizant activity of *C. urucurana* shellfish extract (ECU) in IL-10 Knockout mice. Analyzes by FIA-ESI-IT-MSn were performed to clarify the chemical composition of the ECU extract. The extract was used in the preparation of ointments at concentrations of 5% and 10%. Knockout IL-10 mice (n = 60) and wild-type C57 mice (n = 12) were divided into 6 groups: IL-10 knockout mice: SAL (saline 0.9%), BAS (polyethyleneglycol), SS (1% silver sulfadiazine), CR1 (5% ECU ointment), CR2 (10% ECU ointment); and wild-type C57 mice: SALC57 (Saline 0.9%). The area and rate of wound contraction (10 mm) were calculated on days 0, 7 and 14 of the treatment. After the wound, skin fragments were used for histopathological and cytokine analyzes in the Th1, Th2 and Th17 response profiles. Animals that received topical application of ethanolic extract ointment from *C. urucurana* shells (ECU) in a dose-response effect stimulated healing in IL-10 *Knockout* mice. Ointment of ECU at concentrations of 5% and 10% especially 5% had a higher rate of wound closure, a greater number of cells (fibroblasts), mast cells, blood vessels and deposition of collagens type III and I. In addition, they demonstrated an increase in cytokines in the Th1 response profile (IL-2, IFN- $\gamma$ ) and Th2 (IL-4) on day 7 of the treatment. Polyphenolic compounds such as proanthocyanidins present in ECU may be responsible for the pharmacological activity and mechanism of action in the healing process.

**CAPITULO I**  
**REVISÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais desempenham um papel altamente significativo no desenvolvimento de novos medicamentos (UMAIR et al., 2017). Nos últimos tempos, as práticas tradicionais de espécies vegetais têm desviado a atenção dos pesquisadores, pois varias substâncias encontradas nas plantas têm sido utilizadas em estudos farmacológicos fisiológicos e bioquímicos (RATES, 2001; UMAIR et al., 2017). Consequentemente, o conhecimento sobre o uso de plantas medicinais simbolize um relevante recurso terapêutico para muitas comunidades rurais e grupos étnicos (MACIEL et al., 2002).

O potencial etnofarmacológico das áreas de Mata Atlântica é uma variável econômica significativa para o desenvolvimento local, e o conhecimento tradicional associado ao científico, têm permitido avaliar a eficácia das plantas medicinais utilizadas popularmente (GOMEZ et al., 2016). Além disso, para a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos vigente no Brasil, as plantas medicinais devem ser usadas de forma segura e eficaz seguindo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para produtos fitoterápicos. Assim, as plantas medicinais e fitoterápicos devem contribuir para a acessibilidade aos medicamentos pela população, para o desenvolvimento industrial e tecnológico, como também para o uso sustentável da biodiversidade brasileira, valorização e preservação do conhecimento cultural (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Diversas plantas ditas como medicinais têm sido utilizadas pela população. No entanto, poucas são estudadas cientificamente para averiguar sua ação farmacológica (NEWMAN, 2016). A química do gênero *Croton*, da família Euphorbiaceae, é consideravelmente diversa, fato que qualifica o grupo como altamente promissor para estudos de prospecção de substâncias naturais farmacologicamente ativas, sendo por este motivo, alvo de pesquisas tanto em estudos fitoquímicos como para testes de suas atividades biológicas (RANDAU et al., 2004; AGUIAR et al., 2013). A espécie *Croton urucurana* Baill, conhecida popularmente como “sangra d’água” ou “sangue de dragão” devido a cor de seu látex, é uma árvore do gênero *Croton*, que têm sido empregadas na medicina tradicional e em aplicações artísticas (GUPTA et al., 2008; VIEIRA et al., 2017). Muitos efeitos farmacológicos de sangue de dragão foram descritos na literatura, dentre estes efeitos estão a atividade cicatrizante, antidiarréica, anti-

inflamatória e antibacteriana (GURGUEL et al., 2001). Estas atividades biológicas foram demonstradas pelos componentes químicos isolados do látex, compostos fenólicos como as proantocianidinas (catequina e galocatequina), alcaloides e diterpenos (CHEN et al., 1994; SALATINO et al., 2007). A maioria dos estudos sobre a constituição química das espécies *Croton* refere-se às folhas, cascas e látex da planta (SALATINO et al., 2007). Considerando tais evidências, *Croton urucurana* surge como uma fonte de princípios ativos para desenvolver novos medicamentos fitoterápicos de uso tópico para melhoria do processo de reparo tecidual (LOPES, et al., 2006; ALVES et al., 2008).

Muitos esforços têm sido aplicados para avaliar o processo de cicatrização das feridas, além da compreensão da fisiologia (VELNAR et al., 2009). O processo de reparo tecidual é complexo e compreende alterações vasculares, celulares e bioquímicos que interagem para que ocorra uma reconstituição tecidual completa (ANDRADE et al., 2014). Diferentes fases foram divididas didaticamente: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação (LANIA et al., 2017). A fase conhecida como inflamação é acompanhada por substâncias chamadas de citocinas que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória no processo de reparo (OLIVEIRA et al., 2011; DEMIDOVA-RICE et al., 2012). Incluindo Interleucina IL-1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e IL-2, assim como também IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  envolvidas na mediação de respostas fisiológicas a lesões, infecções e inflamação (ROBSON et al., 2016; SLYEPCHENKO et al., 2016). As citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13, tipicamente, se opõem aos efeitos das citocinas pró-inflamatórias anteriormente descritas como a IL-2 e TNF (SLYEPCHENKO et al., 2016). Assim, o sucesso desta resposta imunológica está diretamente associada no processo da cicatrização (TANG et al., 2014).

Porém, o objetivo deste estudo será avaliar o processo cicatricial na pele de camundongos *knockout* para IL-10 tratados com uso tópico de pomada a base de extrato etanólico das cascas de *C. urucurana* monitorando a ação de marcadores celulares, morfológicos e imunológicos *in vivo*. Além de determinar compostos ativos responsáveis pela atividade cicatrizante da planta.

## 1.1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1.1 A FAMÍLIA Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae apresenta diferentes formas de vida, podendo ser encontradas em árvores, arbustos, plantas perenes e anuais (WEBSTER, 2014). Esta família de angiosperma, distribuída principalmente na região dos trópicos, estão agrupadas em 5 subfamílias: Phyllanthoideae, Oldifieldioideae, Acalyphoideae, Euphorbioideae e Crotonoideae, contendo mais de 9 mil espécies (WEBSTER, 1994; MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2017). Os gêneros mais representativos são *Euphorbia* (1.500 espécies), *Croton* (1.300 espécies) e *Phyllanthus* (400 espécies). No Brasil, estima-se a ocorrência de 1.100 espécies de Euphorbiaceae distribuídas em 72 gêneros. A região Nordeste apresenta cerca de 50 gêneros com 240 espécies, distribuídos em diferentes tipos de vegetação, sendo a maioria nas áreas da Caatinga (OLIVEIRA, 2013).

A distribuição mundial desta família expõe as espécies a diferentes condições ambientais, favorecendo a produção de uma grande variedade de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; 2007). Alguns desses metabólitos apresentam propriedades antitumoral, antibacteriana e anti-inflamatória (WANG et al., 2011). Como exemplo disso têm representantes de gêneros da subfamília Crotonoideae, como *Aleurites*, *Croton* e *Jatropha*, que apresentam uma grande variedade de diterpenos, alcaloides e taninos que são comuns em Euphorbiaceae (WEBSTER, 2014). Dessa forma, várias espécies desta família são empregadas na medicina tradicional ou no tratamento de câncer (SALATINO et al., 2007). Possui destacada importância econômica entre as Angiospermas, tendo como principais produtos a borracha e alguns óleos empregados mundialmente. Na alimentação humana a mandioca (*Manihot esculenta*), que apresenta uma importante fonte de carboidratos. Na medicina popular o “óleo-de-rícino”, extraído das sementes da mamona (*Ricinus communis*) que é utilizado como laxante (ORLANDINI e LIMA, 2014).

### 1.1.2 GÊNERO *Croton*

Da família Euphorbiaceae, o *Croton* é um dos maiores gêneros, com cerca de 1.300 espécies distribuídas pelo planeta (SIMIONATTO et al., 2007). É representado por árvores, arbustos e ervas difundidos em zonas tropicais e subtropicais ocorrendo predominantemente nas Américas, sendo algumas espécies também presentes na África, Ásia e Oceania (GOVAERTS et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008;) (Figura 1).

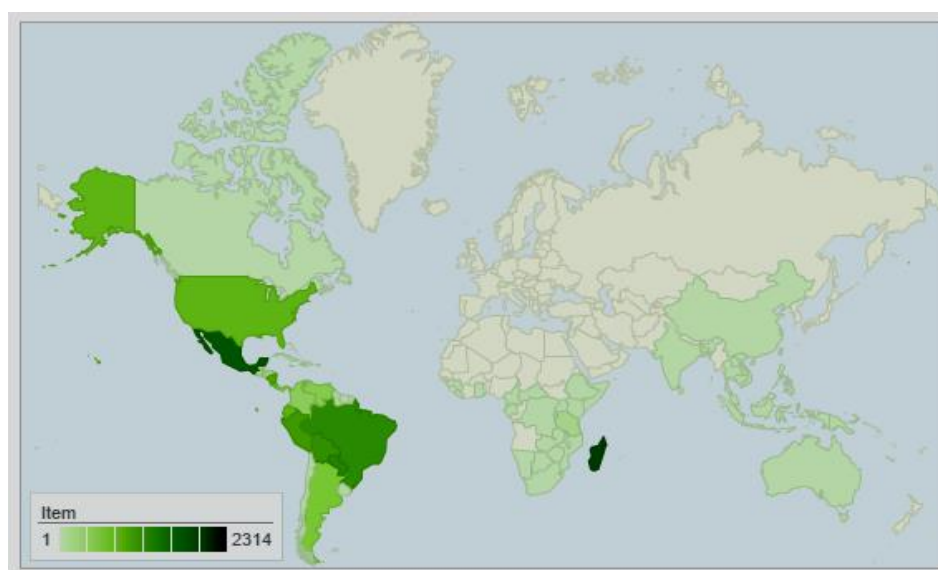


Figura 1. Relato de incidência do gênero *Croton* no planeta (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2017)

No Brasil, o gênero *Croton* é geralmente encontrado nos estados do Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e também na Bahia, vegetando em diferentes tipos de biomas como Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Amazônia e Caatinga. Em relação às espécies de Euphorbiaceae nativas do Brasil, têm maior número de representantes, com total de 350 espécies, distribuídas em 29 seções (LORENZI e MATOS, 2002; BERRY et al., 2005). Neste contexto, a Mata Atlântica apresenta diferentes grupos vegetais ainda pouco estudados, dentre os quais figura o gênero *Croton* (ARRAIS et al., 2014).

Várias espécies do gênero *Croton* conhecidas como “sangue de dragão” ou “sangre de grado” que produzem látex vermelho (MILLER et al., 2000), foram utilizadas pelas culturas indígenas para o tratamento de feridas infectadas e para acelerar a cicatrização (RISCO et al., 2005). Além disso, várias outras propriedades

terapêuticas do “sangue do dragão” foram relatadas (GUPTA et al., 2008), encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1 Espécies de *Croton* spp. conhecidas como “sangue de dragão”.

Nome científico	Ocorrência	Bioatividades	Referências
<i>C. draconoides</i> Mull. Arg.	Bolívia, Brasil, Guiana Francesa, Peru.	Tratamento de câncer	Piacente et al. (1998)
<i>C. erythrochilus</i> Mull. Arg.	Peru	Cicatrizante	Pieters et al. (1993)
<i>C. ferrugineus</i> Kunth.	Colômbia	Cicatrizante	Ubillas et al. (1994)
<i>C. gossypifolius</i> Vahl.	Brasil, Colômbia, México, Venezuela	Adstringente, antibacteriano	Morton (1975)
<i>C. lechleri</i> Mull. Arg.	Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru.	Anti-inflamatória, cicatrizante	Pieters et al. (1993) Chen et al. (1994)
<i>C. palagnostigma</i> Klotsch.	Bolívia, Brasil, Guiana Francesa, Guyana Peru, Venezuela.	Antibacteriano, anti-inflamatória, cicatrizante	Miller (1999) Salatino et al. (2007)
<i>C. panamensis</i> Mull. Arg.	México.	Diurético, antibacteriano, Antipsicóticos	Hirschhorn (1982) Kostova (1999)
<i>C. salutaris</i> Casar.	Brasil	Antibacteriano, anti-inflamatória	Salatino et al. (2007) Itokawa et al. (1991)
<i>C. sordidus</i> Benth.	Colômbia, Equador, Peru.	Antiviral	Ubillas et al. (1994)
<i>C. urucurana</i> Baill.	Bolívia, Brasil, Paraguai	Atividade antibacteriana	Peres et al. (1997)
<i>C. xalapensis</i> H.B.K.	Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá.	Ansiolítico	Arevalo et al. (2009)
<b>Adaptado de Gupta et al. (2008); Missouri botanical garden, (2017)</b>			

Nas últimas três décadas diversas espécies de *Croton* vêm sendo estudadas do ponto de vista químico e farmacológico (AGUIAR et al., 2014). Estudos realizados com

espécies de *Croton* têm revelado vários constituintes químicos como terpenóides, flavonoides e alcaloides, bem como diferentes atividades farmacológicas associadas a estes constituintes (PALMEIRA JÚNIOR et al., 2006). Dentre as substâncias químicas citadas, destacam-se os terpenóides que possuem diversas propriedades farmacológicas, como antisséptica, anti-inflamatória, antiespasmódica, antipirética, expectorante, hipoglicemiante, repelente, anestésica, entre outras (PASSOS et al., 2009).

Em um estudo sobre edema em ratos, Perdue et al. (1979) relataram, pela primeira vez, a atividade anti-inflamatória devido à taspina um alcalóide isolada do látex de *Croton* spp. Alcalóides não são muito comuns em Euphorbiaceae, mas em algumas espécies de *Croton* são notáveis (SALATINO et al., 2007).

Outros compostos que têm assumido papel de destaque nas pesquisas em produtos naturais são os óleos essenciais. Das espécies de *C. zehntneri* e *C. nepetaefolius* o composto fenilpropanoide estragol encontra-se como constituinte majoritário, sendo responsável pela atividade antimicrobiana destas plantas (AGUIAR et al., 2014). Estudos anteriores têm relatado os efeitos, antiulcerogênicos, antidiabéticos e antibacterianos do *C. campestris*, popularmente conhecido como "velame-do-campo". Os principais constituintes do óleo essencial das folhas dessa espécie são  $\beta$ -cariofileno e biciclogermacreno que é um sesquiterpeno encontrado em muitos óleos essenciais que apresentam atividade antibacteriana (ALMEIDA et al., 2012).

Outra espécie com potencial terapêutico e notável importância econômica deste gênero *C. cajucara*. Esta planta é nativa da região amazônica no norte do Brasil e popularmente conhecida como "sacaca", que na língua dos índios Tupi significa "bruxaria". A casca do seu caule é popularmente utilizada para tratar várias doenças infecciosas causadas por parasitas protozoários do gênero *Leishmania* (MACIEL et al., 2006; LIMA et al., 2015).

Porém, diversas aplicações têm sido descritas para este gênero, com destaque no potencial farmacológico dos componentes isolados das espécies, tendo-se em vista a diversidade de uso na medicina popular tradicional (GUPTA et al., 2008).

### 1.1.3 *Croton urucurana* BAILL

Árvores de *C. urucurana* podem atingir de 6 a 8 metros de altura, copa aberta e tronco claro com até 20 cm de diâmetro, suas folhas têm a forma de um coração (LORENZI e MATOS, 2002) Quando seu tronco ou casca são cortados ou feridos libera uma seiva (látex) cor vermelho-sangue, pelo qual é conhecida popularmente como “sangue de dragão” ou “sangra d’água”.



Figura 2. Árvore de *Croton urucurana* no local da coleta Serra do Brigadeiro, Minas Gerais, Brasil (A) Látex vermelho sangue (B).

Esta espécie é comumente encontrada no Paraguai, no norte da Argentina, nas regiões sul e centro-oeste brasileiro e no Uruguai (LORENZI, 1992; BABIERI et al., 2014). *C. urucurana* produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis, caracterizando uma espécie com uma grande fonte de disseminação, sendo propícia para plantio com a finalidade de revegetar uma área degradada (LORENZI, 2008). É notoriamente apreciada na medicina popular onde emprega suas propriedades para o tratamento de cânceres, reumatismos, feridas, diarreia, infecções e uma série de patologias (GURGEL et al., 2001).

A partir do extrato metanólico das cascas de *C.urucurana* estudos demonstraram a presença de compostos como ácido acetilaleuritólico, catequinas, sonderianina, além dos esteróides  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol (PERES et al., 1997). Num estudo fitoquímico do látex da *C. urucurana* revelou a presença de saponinas, esteróides, taninos pirogálicos, taninos catéquicos, catequinas, flavonóis,

flavonas e alcaloides, dentre os quais foi identificada a taspina (GURGEL, 2000) (Figura 3). Também foi encontrado do látex, açúcares como a fucose, arabinose e galactose. (MILO et al., 2002).

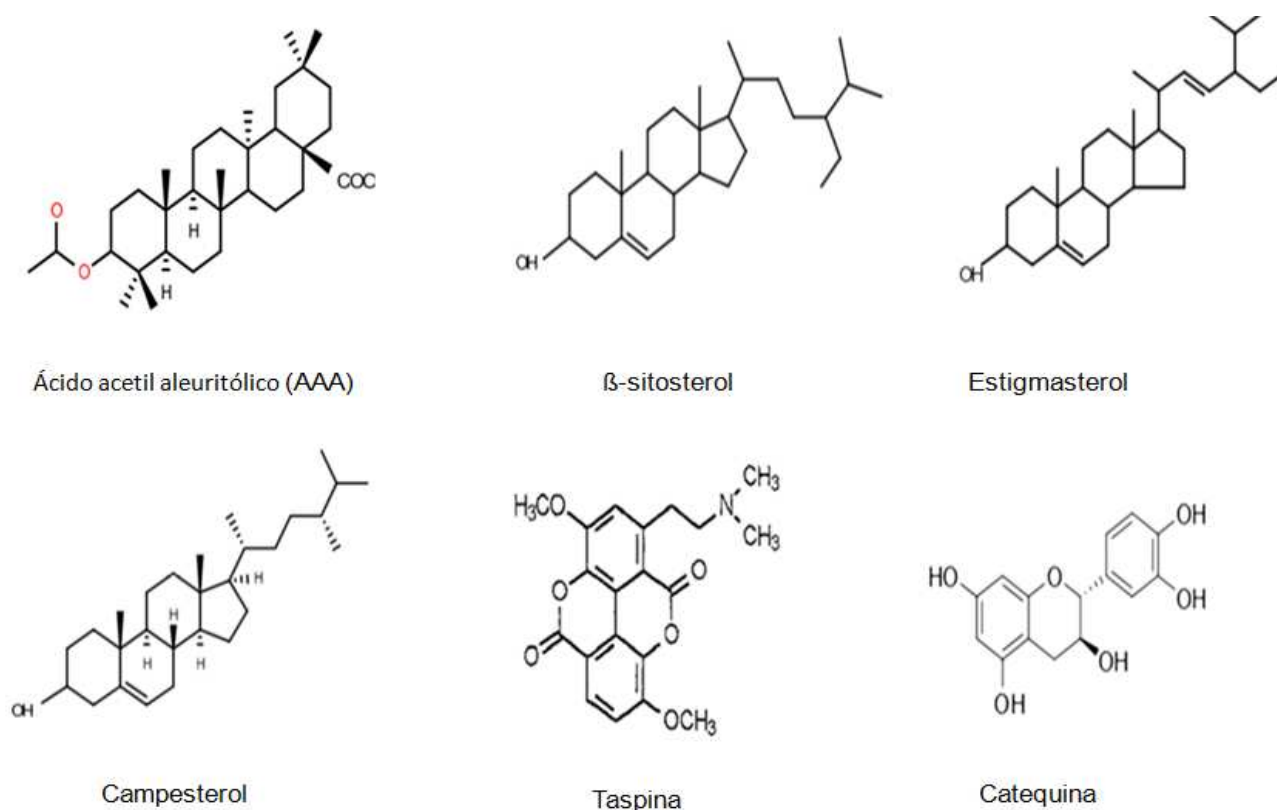


Figura 3. Compostos identificados em *Croton urucurana*. Adaptado de Cordeiro et al. (2016)

O extrato das cascas de *C.urucurana* apresentou atividade gastroprotetora em ratos sem causar toxicidade (CORDEIRO et al., 2012). Também foi identificado um potente efeito inibitório da diarreia induzida pelo óleo de rícino em ratas (GURGEL et al., 2002). Além disto, foi demonstrada a atividade antifúngica do látex de *C. urucurana* frente a fungos causadores de micose da pele, como os dermatófitos *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum* (GURGEL et al., 2005).

Ratos machos pré-tratados com o látex liofilizado de *C.urucurana* (200 a 400 mg/kg) e posteriormente diluído em água destilada, foram posteriormente examinados em relação a frequência de locomoção em campo aberto e em testes do tempo de sono induzido por pentobarbital. Foi evidenciado que o extrato não exerce um efeito

sedativo e nem causa deficiências motoras, apresentando um potencial de toxicidade baixo, associada a distúrbios gastrointestinais (RAO et al., 2007).

#### 1.1.4 *Croton urucurana* NA MEDICINA POPULAR

O uso de plantas medicinais têm demonstrado que elas fazem parte da evolução humana e foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados pelas comunidades e grupos étnicos (GINDRI et al., 2013). As antigas civilizações têm suas próprias referências históricas acerca das plantas medicinais (SILVA et al., 2006). Casca, folhas, raízes e sementes foram utilizadas no tratamento de uma série de males, tais como diabetes, colesterol alto, problemas gastrointestinais, reumatismo, diarreia, obesidade e inflamação (SALATINO et al., 2007). A partir destes relatos, a ciência realiza pesquisas, os quais abordam o conhecimento da medicina popular pelo levantamento em comunidades tradicionais com relação ao uso de plantas, pelo qual subsidia a realização de pesquisas farmacológicas e fitoquímicas (AMOROSO, 1996).

*C. urucurana* é uma espécie arbórea popularmente utilizada para cicatrização de feridas, no combate da inflamação e como analgésico (CORDEIRO et al., 2016). Ficou popularmente conhecida por possuir na casca uma resina vermelha empregada por indígenas e raízeros (GUPTA et al., 2008). Preparações de *C. urucurana* são usadas popularmente na forma oral ou tópica. No primeiro caso são usadas contra a disenteria, tratamento de câncer, reumatismo, dor, lesões, úlceras e diarreia (RAO et al., 2007). Da mesma forma, preparações de chás e infusões com espécies de *Croton* são aplicadas no tratamento de tumor, epilepsia, malária, tuberculose e em uma série de sintomas gastrointestinais (ABREU et al., 2001; PALMEIRA JUNIOR et al., 2006). Informações obtidas da medicina popular são um aspecto muito importante a ser considerado quando se procura obter substâncias ativas em uma planta. Assim, a espécie *C. urucurana* pode representar grande importância na elaboração de medicamentos fitoterápicos (GURGEL et al., 2001; GINDRI et al., 2013; MACHADO et al., 2015).

### 1.1.5 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano e sua principal função é servir como uma barreira protetora contra o ambiente externo e perda de água excessiva (TANG et al., 2014). É composta por uma camada epitelial superficial chamada epiderme e uma camada mais profunda de tecido conjuntivo chamado derme (PLOCHOCKI et al., 2017). A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. As células mais abundantes nesse epitélio são os queratinócitos, também melanócitos, células de *Langerhans* e as de *Merkel* (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). Além disso, é constituída em cinco camadas ou estratos. A partir da camada mais interna para a superfície encontram-se: o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso, o estrato lúcido e o estrato córneo (GUIRRO e GUIRRO, 2004; ROCHA, 2009). Estes estratos intimamente unidos uns aos outros, fornecem a barreira epidérmica em resposta a lesões, importante para evitar infecções e feridas crônicas (GUIRRO & GUIRRO, 2004; ROUPÉ et al., 2014).

Para sustentar dar força e elasticidade à pele a derme, localizada logo abaixo da epiderme, composta de tecido conjuntivo constituída principalmente por fibrilas de colágeno, proteoglicanos e microfibrilas (TAKEHANA et al., 2014). Suas interações celulares são complexas com diferentes origens e funções. Algumas células desse tecido, como os fibroblastos, originam-se localmente a partir de uma célula mesenquimal indiferenciada, que permanecem toda sua vida no tecido conjuntivo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). É rica em diferentes estruturas: vasos sanguíneos que transportam oxigênio e nutrientes, folículos pilossebáceos, glândulas sudoríparas e terminações nervosas (SAMPAIO, 2008). A derme pode ser dividida em camada papilar, mais externa, e camada reticular, mais interna (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). A combinação da derme com a epiderme transforma a pele em um efetivo obstáculo contra invasão microbiana, desidratação e agressões químicas, osmóticas, mecânicas, térmicas e fóticas. A epiderme e a derme formam uma dupla cápsula ao longo de todo o organismo. Isso impede tanto a entrada de agressões do ambiente como perdas de substâncias vitais (SOUZA, 2010).

### 1.1.6 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS

Uma ferida pode ser definida como uma interrupção da continuidade tecidual e funcional de uma estrutura. Assim, a cicatrização de feridas é uma sucessão de eventos bioquímicos e celulares que visam restaurar a integridade estrutural e funcional do tecido ferido (FRONZA et al., 2014). O processo de reparação da ferida pode ser dividido em quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação (formação de tecido de granulação) e remodelação tecidual (LANIA et al., 2017). A primeira fase é conhecida como hemostasia que acontece imediatamente após o aparecimento da lesão e apresenta como principais características: a constrição vascular, desgranulação do tecido e a formação de fibrina (GUO e DIPIETRO, 2010). O objetivo desta fase é evitar a perda de sangue pela produção do tampão plaquetário (TANG et al., 2014). Após evitar o extravasamento de sangue, é iniciada quase simultaneamente a fase inflamatória caracterizada pela migração de neutrófilos e linfócitos e, além disso, monócitos vão infiltrar o tecido conjuntivo até diferenciar em macrófagos (XING et al., 2015), que posteriormente vão atuar nas diferentes fases do processo de reparo por meio da liberação de citocinas e fatores de crescimento (HSU e MUSTOE, 2010). Nesta fase as citocinas pró-inflamatórias como Interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-8 e TNF (fator de necrose tumoral), e as anti-inflamatórias como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  (fator transformador de crescimento  $\beta$ ) (OLIVEIRA et al., 2011), serão necessários para conduzir uma resposta efetiva nos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida (RAM et al., 2015). Moléculas como TGF- $\beta$  (Fator de crescimento transformante beta), atuam ativando a expressão de outros fatores de crescimento como VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular) (PARK et al., 2014), que mediarão processos de migração, proliferação de queratinócitos e diferenciação celular, atuarão como potentes fatores angiogênicos (RAM et al., 2015).

A angiogênese ocorre no início da fase proliferativa, e é sucedida pela migração das células mesenquimais hematopoiéticas e é regulado por fatores como SDF-1  $\alpha$  (fator 1 derivado de células estromais), encarregados de mediar atividade das integrinas e estimular a formação de novos vasos (RAM et al., 2015). Nesta fase do processo cicatricial, ocorre a proliferação de células do tecido que são responsáveis pela regeneração da pele e, neste momento a reepitelização e a síntese dos

componentes da matriz como colágenos, glicosaminoglicanos e proteoglicanos são fundamentais. Todo este processo requer um alto custo energético dependente de ATP (BRANCO-NETO et al., 2006; GONÇALVES et al., 2014). Na fase proliferativa é importante a atuação de ferro (Fe), vitamina C e arginina como cofatores da síntese de colágeno, além de outros fatores como a glutamina e aminoácidos do plasma que atuam estimulando a proliferação de fibroblastos e células endoteliais (GAINZA et al., 2015). Todos esses eventos são necessários para a formação de tecido de granulação, ao mesmo tempo em que favorecem a epitelização (DEMIDOVARICE et al., 2012).

A fase final da cicatrização de feridas conhecida como remodelação, é responsável pelo desenvolvimento do novo epitélio e formação final do tecido cicatricial (VELNAR et al., 2009). Nesta fase ocorre diminuição do número de capilares e células especialmente fibroblastos, substituição de colágeno do tipo III por colágeno do tipo I aumentando assim, a força de tensão da matriz (GUO e DIPIETRO, 2010; RAM et al., 2015). Outras enzimas como as Metaloproteinases (MMPs), também desempenham importante papel neste processo, atuando na degradação da matriz extracelular (MEC) e promovendo remodelação do tecido neo-formado (ARMSTROM e JUDE, 2002). Há evidências de que tanto os fatores bioquímicos como o TGF, bem como estímulos mecânicos, induzem a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, levando à contração da ferida (VALERO et al., 2014).

### 1.1.7 CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO

Muitas citocinas têm sido um foco particular em pesquisas recentes, devido aos seus papéis importantes na cicatrização de feridas. Juntamente com as citocinas da resposta inflamatória, são observadas também, a presença de células auxiliares CD4+ T(Th). Estas desempenham papéis essenciais na regulação da inflamação e respostas imunes através da diferenciação em várias linhagens de células T *helper*, incluindo Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 e *Tregs* (LI et al., 2012). A maioria das funções da célula Th são cumpridas através da secreção de várias citocinas, que podem desempenhar um papel duplo na regulação da inflamação (OLIVEIRA et al., 2011). Algumas citocinas podem ter ações pró-inflamatórias relacionadas à Th1, como IL-1, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que promovem o desenvolvimento e

progressão da inflamação. Estas citocinas também são importantes na imunidade celular contra vírus e patógenos intracelulares (MAI et al., 2010; LI et al., 2012). Citocinas pró-inflamatórias podem ser encarregadas de mediar a migração de macrófagos e promover a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias (HSU e MUSTOE, 2010; XING et al., 2015). Por outro lado, as células Th2, que secretam IL-4, IL-9, IL-10 IL-13 e TGF- $\beta$  (fator transformador de crescimento  $\beta$ ), são mediadores no processo anti-inflamatório (MAI et al., 2010). Durante este processo, citocinas como IL-10 e IL-13 inibem as citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias (OLIVEIRA et al., 2011; RAM et al., 2015). Existe uma classe que representam uma linhagem que é independente das células Th1 e Th2. Um subtipo de células auxiliares T CD4 + (células Th) que produzem IL-17 caracterizando-se como Th17. Células Th17 produz em grande parte citocinas pró-inflamatórias. Vários autores relataram que a IL-17 ou IL-17A tem um papel na proteção de organismos contra bactérias extracelulares e fungos, devido à capacidade de recrutar macrófagos e neutrófilos para as áreas de infecção ou lesão (NORMANTON et al., 2013; SLYEPCHENKO et al., 2016). Um equilíbrio dinâmico e em constante mudança existe entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, elas influenciam vários processos no local da ferida, durante a inflamação e na regulação da resposta imune (OPAL et al., 2000; MAI et al., 2010).

Posteriormente, outros mediadores envolvidos no processo de reparo como o PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas) (RODRIGUEZ et al., 2012) que exerce importante função na indução de quimiotaxia para a ativação de macrófagos, assim como liberação de FGF (Fator de crescimento fibroblástico) (KUMAR et al., 2010; GAINZA et al., 2015), tem participação na fase proliferativa onde medeia a produção e a migração de fibroblastos (GAINZA et al., 2015). O EGF (Fator de crescimento epidermal) é outro fator importante para o processo cicatricial, o qual também induz a proliferação de células precursoras e síntese de proteínas na área da lesão (GAINSFORD et al., 1996). O VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) é produzido na fase inflamatória e exerce importante função na estimulação e migração de queratinócitos e fibroblastos (STOJADINOVI et al., 2007). O IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) juntamente com o SDF-1 $\alpha$  (fator um  $\alpha$  derivado de células estromais) estimula a vascularização do tecido, promovendo a angiogênese

(RAM et al., 2015). IGF-1, SDF-1  $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1 são degradados na fase de proliferação pelas metaloproteinases (MMPs) com objetivo de cessar o processo de neovascularização e proliferação de fibroblastos dando forma à matriz extracelular (MEC) rica em colágeno. Nesta fase também ocorre a ativação de fatores transcricionais como Rac 1 (RAM et al., 2015), que promove força e elasticidade ao novo tecido (GUO e DIPRIETO, 2010).

## 1.2 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Dentro do gênero *Croton*, a espécie *Croton urucurana* Baill., conhecida popularmente como “sangra d’água” ou “sangue de dragão”, faz parte da medicina tradicional em diferentes comunidades brasileiras (MATTOS, et al., 2002). As cascas dessa árvore são utilizadas pela população para formulação de medicação cicatrizante (ALVES et al., 2008; SILVA JUNIOR, et al., 2009). Além disso, compostos isolados de *C. urucurana* foram reconhecidos pelas suas propriedades terapêuticas dentre elas anti-inflamatória, antioxidante e cicatrizante (SALATINO et al., 2007).

Com o aumento da utilização de produtos naturais, cresce a busca por alternativas de substâncias que possibilitem a prevenção e tratamento de doenças sem agredir o organismo. As pesquisas por novas formas farmacêuticas fitoterápicas vêm crescendo de forma eficaz, seguro e com boa disponibilidade, entre estas formas pode-se destacar a aplicação na pele (LOPES et al., 2006). Porém no presente estudo, foi avaliado o potencial cicatrizante da espécie *C. urucurana*. Com ajuda de uma formulação semissólida em forma de pomada contendo o extrato da casca da planta em diferentes concentrações, foi aplicada topicamente em camundongos *knockout* IL-10. Camundongos *knockout* para IL-10 é um modelo animal que pode desenvolver maior inflamação durante o processo da cicatrização (BETELLI et al., 1998). Nesse cenário haverá um grande acúmulo celular e de mediadores inflamatórios relacionados à resposta imunológica. Dessa maneira, os resultados deste estudo contribuirão na pesquisa relacionada ao tratamento tópico em feridas cutâneas e seus compostos químicos da planta que facilitam a cicatrização, utilizando fitomedicamentos oriundos de *C. urucurana* como agentes cicatrizantes sugerindo que está poderia ser uma alternativa terapêutica mais acessível à população além de agregar valor à biodiversidade brasileira.

## 1.3 . OBJETIVOS

### 1.3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil fitoquímico e atividade cicatrizante do extrato etanólico da casca de *C. urucurana* em camundongos *Knouckout* para IL10.

### 1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análise química comparativa por FIA-ESI-IT-MSn do extrato etanólico das cascas de *C. urucurana*;
- Analisar *in vivo*, a velocidade de fechamento das feridas de segunda intenção em camundongos *knockout* IL-10 tratados com pomada a base de extratos da casca de *C. urucurana*;
- Identificar o efeito da pomada a base do extrato da casca de *C. urucurana* sobre a celularidade, mastócitos, vascularização e deposição de fibras colágenas no tecido cicatricial em formação;
- Avaliar o efeito da pomada a base do extrato da casaca de *C. urucurana* na produção de citocinas com padrões imunológicos Th1, Th2 e Th17 em camundongos *knockout* IL-10 no tecido cicatricial;
- Investigar a relação entre a atividade biológica e o componente ativo presente no extrato.

## 1.4 REFERENCIAS

- ABREU, A. S.; BARBOSA, P. S.; MÜLLER, A. H. & GUILHON, G. M. S. P. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Científica UFPA**, v. 1, n. 2, p. 1-9, 2001.
- AGUIAR, U. N.; SIDNEY, G. L.; ROCHAA, M. S.; FREITASA, R. M.; OLIVEIRA, T. M.; SILVA, R. M.; MOURA, L. C. B. & ALMEIDA, L. T. G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *croton zehntneri* com b-ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 50-55, 2014.
- ALMEIDA, T. S. de; ROCHA, J. B. T.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R. & DA COSTA, J. G. M. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 630-633, 2012.
- ALVES, E.O.; MOTA, J.H.; SOARES, T.S. & VIEIRA, M.C. Crescimento e distribuição espacial de *Croton urucurana* Baill. Dourados-MS. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, p. 83-88, 2008.
- AMOROZO, M. D. M. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. Plantas medicinais: arte e ciência. **Um guia de estudo interdisciplinar**, p. 47-68, 1996.
- ANDRADE, F. S. S. D.; CLARK, R. M. O. & FERREIRA, M. L. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 41, n. 2, p. 129-133, 2014.
- AREVALO, C.; LOTTI, C.; PICCINELLI, A. L.; RUSSO, M.; RUIZ, I. & RASTRELLI, L. Magnoflorine and phenolic derivatives from the leaves of *Croton xalapensis* L.(Euphorbiaceae). **Natural product communications**, v. 4, n. 12, p. 1697-1700, 2009.
- ARMSTRONG, D. G. & JUDE, E. B. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. **J. Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 92, p. 12-18, 2002.
- ARRAIS, L.G.; LYRA, H.F.S.; BATISTA, D.C.A.; COUTINHO, F.N.; SARAIVA, A.M.; PEREIRA, R.C.A.; PISCIOTTANO, M.N.C.; XAVIER, H.S.; MELO, S.J. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill. (Zabelê). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 316-322, 2014.
- BABIERI, D. S. V.; TONIAL, F.; LOPEZ, P. V. A.; MAIA, B. H. L. N.; SANTOS, G. D.; RIBAS, M. O.; GLIENKE, C. & VICENTE, V. A. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 59, p. 887-896, 2014.
- BERRY, P. E.; HIPPI, A. L.; WURDACK, K. J.; VAN, E. B. & RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe *Crotoneae* (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF sequence data. **America Jornal of Botany**, v. 92, p. 1520-1534, 2005.
- NETO, M. L. C.; RIBAS-FILHO, O.; MALAFAIA, M. A.; OLIVEIRA-FILHO, N. G.; CZECZKO, S.; AOKI, R.; CUNHA, V. R.; FONSECA, H. M.; TEIXEIRA, L. R. F. & AGUIAR, L. R. F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p.17-22, 2006.

CHEN, Z.P.; CAI, Y.; PHILLIPSON, J.D. Studies on the Anti-Tumour, AntiBacterial, and Wound-Healing Properties of Dragon's Blood. **Planta Medica**, v. 60, p. 541- 545, 1994.

CORDEIRO, K. W.; FELIPE, J. L.; MALANGE, K. F.; DO PRADO, P. R.; DE OLIVEIRA FIGUEIREDO, P.; GARCEZ, F. R.; DE CÁSSIA FREITAS, K.; GARCEZ, W. S. & TOFFOLI-KADRI, M. C. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Croton urucurana Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 128–135, 2016.

CORDEIRO, K. W.; PINTO, L. A.; FORMAGIO, A. S. N.; ANDRADE, S. F.; KASSUYA, C. A. L. & FREITAS, K. C. Antiulcerogenic effect of Croton urucurana Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 331–337, 2012.

DEMIDOVA-RICE, T. N.; HAMBLIN, M. R. & HERMAN, I. M. Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 25, n. 7, p. 304–314, 2012.

FRONZA, M.; CAETANO, G. F.; LEITE, M. N.; BITENCOURT, C. S.; PAULA-SILVA, F. W. G.; ANDRADE, T. A. M.; FRADE, M. A. C., MERFORT, I. & FACCIOLI, L. H. Hyaluronidase Modulates Inflammatory Response and Accelerates the Cutaneous Wound Healing. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, e112297, 2014.

GAINSFORD, T.; WILLSON, T. A.; METCALF, D.; HANDMAN, E. & MCFARLANE, C. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 14564–14568, 1996.

GAINZA, G.; VILLULLAS, S.; PEDRAZ, J. L.; HERNANDEZ, R. M. & IGARTUA, M. Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. Nanomedicine: Nanotechnology. **Biology and Medicine**, v. 11, n. 6, p. 1551-1573, 2015.

GINDRI, A. L.; SOUZA, L. B. & ATHAYDE, M. L. Caracterização botânica da urtiga-brava: estudos farmacológicos e químicos. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 125-136, 2013.

GOBBO-NETO L, LOPES NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMEZ, M.; ROCHA, E. A. & GOMBERG, E. Analysis of ethnobotanical publications on medicinal plants of the forest Atlantic in the South of Bahia, Brazil. **Revista Fitos**, v. 10, n. 2, p. 95-219, 2016.

GONÇALVES, R. V.; NOVAES, R. D.; CUPERTINO, M. C.; ARAÚJO, B. M.; VILELA, E. F.; MACHADO, A. T.; LEITE, J. P.V. & MATTA, S. L. P. Bathysa cuspidata Extract Modulates the Morphological Reorganization of the Scar Tissue and Accelerates Skin Wound Healing in Rats: A Time-Dependent Study. **Cells Tissues Organs**, v. 199, p. 266–277, 2014.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G. & RADCLIFFE-SMITH, A. Croton. In: World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae). **Royal Botanic Gardens Kew**, v. 2, p. 417-536. 2000.

GUIRRO, ELAINE; GUIRRO, RINALDO. **Dermatologia Funcional**. 3ª Ed. São Paulo: Manole, 2004.

GUO, S. & DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219–229, 2010.

GUPTA, D.; BLEALEY, B. & GUPTA, R. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 338-361, 2008.

GURGEL, L. A. Avaliação experimental da atividade antidiarreica do látex do *Croton urucurana* Baill. 134 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal do Ceara, **Fortaleza**, 2000.

GURGEL, L. A.; SIDRIM, J. J. C.; MARTINS, D.; CECHINEL, F. & RAO, V. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 409-412, 2005.

GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; MARTINS, D. T.; MATTOS, P. O. & RAO, V. S. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 319-322, 2001.

GURGEL, L.; TABAJARA, O. & SATYANARAYANA, R. Estudo da atividade antidiarreica e antisecretoria intestinal do latex de *Croton urucurana* Baill. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p. 39-42, 2002.

HIRSCHHORN, H. H. Botanical remedies of South and Central America, and the Caribbean: an archival analysis. Part II. Conclusion. **Journal of ethnopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 163-180, 1982.

HSU, A. & MUSTOE, T. A. The Principles of Wound Healing. **Plastic Surgery Secrets**, v. 2, p. 3-7, 2010.

ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; TAKEYA, K.; MORITA, H. & MOTIDOME, M. Diterpenes from *Croton salutaris*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 4071-4073, 1991.

JUNQUEIRA, L. C. U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KOSTOVA, I.; IOSSIFOVA, T.; ROSTAN, J.; VOGLER, B.; KRAUS, W. NAVAS, H. Chemical and biological studies on *Croton panamensis* latex (Dragon's Blood). **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v. 9, n. 1, p. 34-36, 1999.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. & ASTER, J. Ch3-Tissue Renewal, Regeneration and Repair. Saunders (Elsevier). **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (8th edition)**. New York, 2010.

LANIA, B. G.; MORARI, J.; SOUZA, A. L. D.; SILVA, M. N. D.; DE ALMEIDA, A. R.; VEIRA-DAMIANI, G.; ALEGRE, S. M.; CÉSAR, C. L.; VELLOSO, L. A.; CINTRA, M. L.; MAIA, N. B. & VELHO, P. E. N. F. Topical use and systemic action of green and roasted coffee oils and ground oils in a cutaneous incision model in rats (*Rattus norvegicus albinus*). **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, e0188779, 2017.

LI, X.; MAI, J.; VIRTUE, A.; YIN, Y.; GONG, R.; SHA, X.; GUTCHIGIAN, S.; FRISCH, A.; HODGE, I.; JIANG, X.; WANG, H. AND YANG, X. IL-35 Is a Novel Responsive Anti-inflammatory Cytokine — A New System of Categorizing Anti-inflammatory Cytokines. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, e33628, 2012.

LIMA, G. S.; DENISE, B.; CASTRO-PINTO, C.; GERZIA, C.; MACHADO, C.; MARIA, A. M. & MACIEL, A. E. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**, v. 22, p. 1133–113, 2015.

LOPES, A. R. A.; VARGAS, M. L. S.; CAVALCANTI, A. S. S. & SILVA, A. G. Plants and their extracts – administration and bioavailability of phytochemicals applied on the skin. **Natureza on line**, v. 4, n. 2, p. 62-66, 2006.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Plantarum**, p. 114, 2008.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas. **Nova Odessa**, São Paulo: Instituto Plantarun, p. 512, 2002.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Editora Plantarum**, v. 4, p. 352, 1992.

MACHADO, L. C. S.; PFRIMER, H. I. A. & MAGALHÃES, M. R. Cicatrização de feridas induzidas por peçonha de *Bothrops moojeni* pelo extrato de *Croton urucurana*. **Estudos**, v. 42, n. 4, p. 597-611, 2015.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIRO, V. F.; GRYNBERG, N. F. & ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MACIEL, M.A.M.; DANTAS, T.N.C.; CÂMARA, J.K.P.; PINTO, A.C.; VEIGA, J.R.; KAISER, C.R.; PEREIRA, N.A.; CARNEIRO, C.M.T.S.; VANDERLINDE, F.A.; LAPA, A.J.; AGNER A.R.; CÔLUS, I.M.S.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; GRYNBERG, N.F.; ESTEVES-SOUZA, A.; PISSINATE, K. & ECHEVARRIA, A. Pharmacological and biochemical profiling of lead compounds from traditional remedies: the case of *Croton cajucara*. **Advances in Phytomedicine. Elsevier**, v. 2, p. 225-253, 2006.

MAI, J.; WANG, H. & YANG, X. F. T. Helper 17 Cells Interplay with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs in Regulation of Inflammations and Autoimmune Diseases. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 15, p. 986-1006, 2010.

MATTOS, P. E. O.; GEREMIAS, R.; CORDOVA, C. A. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; REBELLO, J. M.; WILHELM-FILHO, D.; MARTINS, D. T. O.; LLESUY, S. F. & CURI-PEDROSA, R. Protective properties of *Croton urucurana* latex against lipid peroxidation and action as free radical scavenger. Em: XI Meeting of the Society for Free Radical Research International, Paris. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 33, p. S242-S242, 2002.

MILLER, M. J. S.; MACNAUGHTON, W. K.; ZHANG, X. J.; THOMPSON, J. H.; CHARBONNET, R. M.; BOBROWSKI, P.; LAO, J.; TRENTACOSTI, A. M. & SANDOVAL, M. Treatment of gastric ulcers and diarrhea with the Amazonian herbal medicine *sangre de grado*. **American Journal of Physiology**, Gastrointestinal and Liver Physiology, v. 279, p. 192-200, 2000.

MILLER, M. J.; CLARK, D. A.; ZHANG, X. J. & SANDOVAL, M. Healing of Gastric Ulcers in Rats by the Herbal Medicine, *Sangre de Grado*: Implications for the Developing World. **Pediatric Research**, v. 45, n. 4, p. 113A, 1999.

MILO, B.; RISCO, E.; VILA, R.; IGLESIAS, J. & CAÑIGUERAL, S. Characterization of a Fucoarabinogalactan, the main polysaccharide from the gum exsudate of *Croton urucurana*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 8, p. 1143- 1146, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápico**. Ministério da Saúde, Brasília, 2006.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Euphorbiaceae Juss**. Missouri Botanical Garden [on line]. 2017. Disponível em: <http://www.tropicos.org>. Acesso em: 06/05/17.

MORTON, J. F. Current folk remedies of northern Venezuela. **Quarterly Journal of Crude Drug Research**, v. 13, n. 3-4, p. 97-121. 1975.

NEWMAN, D. J. The Influence of Brazilian Biodiversity on Searching for Human Use Pharmaceuticals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 00, n. 00, p. 1-13, 2016.

NORMANTON, M.; MARTI, L. C. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. **Einstein**, v. 11, n. 2, p. 237-46, 2013.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R. & SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 260-265, 2011.

OLIVEIRA, D. G. A família Euphorbiaceae Juss. em um fragmento de caatinga em Sergipe. **Scientia Plena**. v. 9, n. 4, p. 1-7, 2013.

OLIVEIRA, I. S.; LIMA, J. C.; SILVA, R. M. & MARTINS, D. T. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 587-593, 2008.

OPAL, S. M. & VERA A. P. DE. Anti-inflammatory cytokines. **Chest Journal**, v. 117, n. 4 p. 1162-1172, 2000.

ORLANDINI, P. & LIMA, L. R. Sinopse do gênero *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, v. 41, n. 1, p. 51-60, 2014.

PALMEIRA JUNIOR, S. F.; CONSERVA, L. M. & SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 397-402, 2006.

PARK, S. A.; RAGHUNATHAN, V. K.; SHAH, N. M.; TEIXEIRA, L.; MOTTA, M. J.; COVERT, J. & MURPHY, C. J. PDGF-BB Does Not Accelerate Healing in Diabetic Mice with Splinted Skin Wounds. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, e104447, 2014.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M. K. & POSER, G. L. Terpenóides com atividade sobre o sistema nervoso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 19, p. 140-149, 2009.

PERDUE, G.P., BLOMSTER, R.N., BLAKE, D.A. & FARNSWORTH, N.R. South American plants II: taspine isolation and anti-inflammatory activity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, p. 124-125, 1979.

PERES, M. T. L. P.; MONACHE, F. D.; CRUZ, A. B.; PIZZOLATTI, M. G. & YUNES, R. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, n. 3, p. 223-226, 1997.

PIACENTE, S.; BELISARIO, M.A.; DEL CASTILLO, H.; PIZZA, C.; DE FEO, V. *Croton ruizianus*: platelet proaggregating activity of two new pregnane glycoides. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 318–322, 1998.

PIETERS, L.; BRUYNE, T. DE.; CLAEYS, M.; VLIETINCK, A.; CALOMME, M.; VAN DEN BERGHE, D. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South American Dragon's blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 899–906, 1993.

PLOCHOCKI, J. H.; RUIZ, S.; RODRIGUEZ-SOSA, J. R. & HALL, M. I. Histological study of white rhinoceros integument. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, e0176327, 2017.

RAM, M.; SINGH, V.; KUMAWAT, S.; KUMAR, D.; LINGARAJU, M. C.; UTTAM, SINGH T. & KUMAR, D. Deferoxamine modulates cytokines and growth factors to accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats. **European Journal of Pharmacology. Elsevier**, v. 764, p. 9–21, 2015.

RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P. & XAVIER, H. S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 4, n. 2, p. 89–96, 2004.

RAO, V. S.; GURGEL, L. A.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; MARTINS, D. T. O.; CECHINELFILHO, V. & SANTOS, F.A. Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113: p. 357–360, 2007.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603–613, 2001.

RISCO, E.; VILA, R.; HENRIQUES, A. & CAÑIGUERAL, S. Bases químicas y farmacológicas de la utilización de la sangre de drago. **Revista de Fitoterapia**, v. 2, n. 5, p. 101–114. 2005.

ROBSON, M. J.; ZHU, C-B.; QUINLAN, M. A.; BOTSCHNER, D. A.; BAGANZ, N. L.; LINDLER, K. M. Generation and Characterization of Mice Expressing a Conditional Allele of the Interleukin-1 Receptor Type 1. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, e0150068, 2016.

ROCHA, C. DE LOURDES J. V. histophysiology and classification of burn: consequences of local systems and tissue loss in patients burnt. **Revista interdisciplinar de estudos experimentais**, v. 1, n. 3, p. 140 – 147, 2009.

RODRÍGUEZ, F. J.; PALOMAR, G. M. & TORRES G. J. Plasma rico en plaquetas: Fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. **Revista Espanola de Cirugia Oral Y Maxilofacial**, v. 34, n. 1, p. 8–17, 2012.

ROUPÉ, K. M.; VEERLA, S.; OLSON, J.; STONE, E. L.; SØRENSEN, O. E., HEDRICK, S. M. & NIZET, V. Transcription Factor Binding Site Analysis Identifies FOXO Transcription Factors as Regulators of the Cutaneous Wound Healing Process. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, e89274, 2014

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. & NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11–33, 2007.

SAMPAIO, P. A. S.; RIVITTI, A. E. **Dermatologia** 3ª Ed. São Paulo: Artes Médicas, 2008.

SILVA JUNIOR, I. E.; CECHINEL FILHO, V.; ZACCHINO, S. A.; LIMA, J. C. D. S. & MARTINS, D. T. D. O. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 242-248, 2009.

SILVA, M. S.; ANTONIOLLI, A. R.; BATISTA, J. S. & MOTA, C. N. Plantas medicinais nos distúrbios do trato gastrointestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. **Acta Botânica Brasil**, v. 4, p. 815-829, 2006.

SIMIONATTO, E.; BONANI, V. F. L.; MOREL, A. F.; POPPI, N. R.; RAPOSO JÚNIOR, J. L.; STUKER, C. Z.; PERUZZO, G. M.; PERES, M. T. L. P. & HESS, S. C. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 879-885, 2007.

SLYEPCHENKO, A.; MAES, M.; KDDOTOHLER, C. A.; ANDERSON, G.; QUEVEDO, JOAO.; ALVES, G. S.; BERK, M.; FERNANDES, B. S. & CARVALHO, A. F. T. Helper 17 cells may drive neuroprogression in major depressive disorder: Proposal of an integrative model. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 64, p. 83-100, 2016.

SOUZA, Sandro Cilindro de. **Lições de anatomia: manual de esplancnologia**. Salvador: editora da universidade federal da bahia EDUFBA, p. 500, 2010.

STOJADINOVI, O. K. A.; GOLINKO, M.; TOMIC-CANIC, M. & BREM, H. A. Novel nonangiogenic mechanism of VEGF: stimulation of keratinocyte and fibroblast migration. **Wound Repair Regen**. A30, 2007.

TAKEHANA, Y.; YAMADA, A.; TAMORI, M. & MOTOKAWA, T. S. A Novel Protein That Softens the Connective Tissue of Sea Cucumbers through Inhibiting Interaction between Collagen Fibrils. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, e85644, 2014.

TANG, J.; LIU, H.; GAO, C.; MU, L.; YANG, S.; RONG, M. & LAI, R. A small peptide with potential ability to promote wound healing. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, e92082, 2014.

UBILLAS, R.; JOLAD, S.; BRUENING, R.; KERNAN, M.; KING, S.; SESIN, D.; BARRETT, M.; STODDART, C.; FLASTER, T.; KUO, J.; AYALA, F.; MEZA, E.; CASTAÑEL, M.; MCMEEKIN, D.; ROZHON, E.; TEMPESTA, M.; BARNARD, D.; HUFFMAN, J.; SMEE, D.; SIDWELL, R.; SOIKE, K.; BRAZIER, A.; SAFRIN, S.; ORLANDO, R.; KENNY, P.; BEROVA, N. & NAKANISHI, K. SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago). **Phytomedicine**, v. 1, n. 2, p. 77-106, 1994.

UMAIR, M.; ALTAF, M. & ABBASI, A. M. An ethnobotanical survey of indigenous medicinal plants in Hafizabad district, Punjab-Pakistan. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, e0177912, 2017.

VALERO, C.; JAVIERRE, E.; GARCÍA-AZNAR, J. M. & GÓMEZ-BENITO, M. J. A Cell-Regulatory Mechanism Involving Feedback between Contraction and Tissue Formation Guides Wound Healing Progression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, e92774, 2014.

VELNAR, T.; BAILEY, T. & SMRKOLJ, V. The wound healing Process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. **The journal of internacional mdical research**, v. 37, p. 1528-1542, 2009.

VIEIRA, G. T.; OLIVEIRA, T. T. DE.; MONTEIRO, L. P. M.; KANASHIRO, M. M.; COSTA, M. R. DA.; & PEREIRA, W. L. Cytotoxic activity of *Croton urucurana* Baill extract against human leukemic cell lines U937 and THP1. **Ciência e Natura**, v. 39 n. 3, p. 512 – 519, 2017.

WANG, L.; LI, D.; WANG, C.; ZHANG, Y. & XU, J. Recent progress in the development of natural ent-kaurane diterpenoids with anti-tumor activity. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 910-919, 2011.

WEBSTER, G. L. Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 3-32, 1994.

WEBSTER, G. L. Euphorbiaceae. In: **The families and genera of vascular plants**. Springer, 2014.

XING, W.; GUO, W.; ZOU, C.-H.; FU, T.-T.; LI, X.-Y.; ZHU, M. & XU, X. Acemannan accelerates cell proliferation and skin wound healing through AKT/mTOR signaling pathway. **Journal of Dermatological Science**, v. 79, n. 2, p. 101–109, 2015.

**CAPITULO II**  
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE POMADA A BASE DE**  
**EXTRATO DA CASCA DE *Croton urucurana* BAILL. EM**  
**CAMUDONGOS *KNOCKOUT* IL-10**

## RESUMO

A planta *C. urucurana* coletado no entorno do parque Estadual da Serra do Brigadeiro MG, onde predomina a Mata Atlântica, é utilizado por raízes como tópicos cicatrizantes. Objetivos: analisar o perfil fitoquímico e atividade cicatrizante do extrato etanólico das cascas de *C. urucurana* (ECU) em camundongos *Knockout* IL-10. Material e Método: Análises por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> foram realizadas para esclarecer a composição química de ECU. O extrato foi empregado na preparação das pomadas nas concentrações de 5% e 10%. Para avaliação da atividade cicatrizante foram utilizados camundongos *Knockout* IL-10 (n=60) e camundongos selvagens C57 (n=12) divididos em 6 grupos. Camundongos *knouckout* IL10: SAL (salina 0,9%), BAS (polietilenoglicol), SS (sulfadiazina de prata 1%), CR1 (pomada de ECU 5%), CR2 (pomada de ECU 10%); e camundongos selvagens C57: SALC57 (Salina 0,9%). Uma ferida circular de 10 mm de diâmetro foi gerada no dorso dos animais. Fragmentos das feridas foram retirados nos dias 0<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> do tratamento para análises histopatológicas e de citocinas nos perfis de resposta Th1, Th2 e Th17A. Resultados: A pomada de ECU num efeito dose-resposta apresentaram maior taxa de fechamento da ferida, maior quantidade de células (fibroblastos), mastócitos, vasos sanguíneos e deposição de colágeno tipo III e I. Além de isso, demonstraram um aumento de citocinas no perfil de resposta Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4) no dia 7<sup>o</sup> do tratamento. Conclusão: Compostos polifenólicos, como as proantocianidinas identificadas no extrato etanólico das cascas de *C. urucurana*, podem ser responsáveis pela atividade cicatrizante. Esta classe de metabólitos secundários pode ser usada como marcador ativo de extratos dessa planta. Atividade cicatrizante de *C. urucurana* torna a espécie com potencial para o desenvolvimento de medicamento fitoterápico.

## 2 INTRODUÇÃO

Apesar de todo conhecimento que se têm a respeito do processo cicatricial, o processo de cura através de diferentes fármacos ainda representa um desafio de saúde pública, pois os fármacos sintéticos são extremamente caros nos países em desenvolvimento (VELNAR et al., 2009; UMAIR et al., 2017). Porém, podemos ver que os gastos com drogas sintéticas em países desenvolvidos também são altos, como exemplo dos Estados Unidos que segundo dados de 2009 revelaram 6.5 milhões de pessoas foram tratadas por lesões cutâneas, proporcionando a este país um custo anual de aproximadamente US \$ 25 bilhões (LANIA et al., 2017). Neste contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem estimulado a pesquisa e o uso das terapias tradicionais no cuidado primário à saúde, incluindo as plantas medicinais para serem usadas como prática integrativa no sistema oficial de saúde (WHO, 2013; DAWID-PÁC, 2013). Para muitas comunidades e grupos étnicos, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico (GINDRI et al., 2013).

A cicatrização de feridas é um processo biológico que envolve diferentes tipos de células, principalmente queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e células imunitárias, bem como componentes da matriz extracelular (AMORIM et al., 2017), podendo ser dividido em quatro fases sobrepostas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação tecidual (GUO e DIPIETRO, 2010; FRONZA et al., 2014). Durante a cicatrização, células inflamatórias são recrutadas para o local da ferida podendo destacar a ação de citocinas pró (Th1 e Th17) e anti-inflamatórias (Th2), que estão intimamente envolvidos neste processo (TANG et al., 2014; SHAPIRA et al., 2015). A exemplo disso, evidencia-se a ação da interleucina-10 (IL-10) uma citocina anti-inflamatória que inibe as citocinas pró-inflamatórias, produzidas por macrófagos e monócitos ativados estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias (OLIVEIRA et al., 2011). Posteriormente na fase proliferativa, mediadores bioquímicos recrutados durante a fase inflamatória controlam a migração, proliferação de fibroblastos e células endoteliais, levando à reepitelização e formação do tecido de granulação (VALERO et al., 2014; TANG et al., 2014). A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares que são parte importante da fase

proliferativa Juntamente com os fibroblastos responsáveis da produção do colágeno (CAMPOS et al., 2007). Relacionado a isto, a fase de remodelação acontece com a substituição do colágeno tipo III por colágeno tipo I mais forte e resistente à tração levando assim, à formação de cicatrizes que se assemelham a uma pele saudável (VALERO et al., 2014).

Devido à grande utilização de plantas pela população, pesquisas e desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos tornam-se de grande interesse para a saúde pública e para as indústrias farmacêuticas (SIMÕES et al., 2010). Na medicina tradicional brasileira, dentre as espécies empregadas pode-se citar a *Croton urucurana* Baillon, da família das Euphorbiaceae, conhecida como “sangue de dragão”, “sangra-d'água”, “urucurana” e “lucurana” (GUPTA et al., 2008), popularmente usada para o tratamento de feridas cutâneas (ESMERALDINO et al., 2005). As partes utilizadas da planta são na maioria das vezes o látex (seiva) e a casca (SCALON et al., 2008). Resultados científicos com extrato alcoólico das cascas de *C. urucurana* demonstraram *in vivo* atividades analgésicas e anti-inflamatórias (CORDEIRO et al., 2016). Também, observou-se atividade cicatrizante no tratamento de feridas cutâneas causadas pela picada de insetos (MACHADO et al., 2015). No entanto, até o momento não foram identificados estudos científicos avaliando a eficácia do extrato das cascas de *C. urucurana*, quando aplicado localmente em feridas cutâneas de segunda intenção em modelo animal camundongo *Knockout*. Assim, no presente estudo, utilizando camundongos *Knockout* para IL-10 como modelo *in vivo* foi avaliado a pomada a base de extrato etanólico da casca de *C. urucurana* e seu efeito na aplicação tópica durante o processo de reparo tecidual. Determinou-se o perfil cromatográfico do extrato etanólico a fim de se evidenciar as propriedades farmacológicas desta espécie.

## **2.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL**

O material vegetal foi coletado no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), localizada no município de Rosário da Limeira, MG, nas coordenadas 20°33' - 21°00'S e 42°40' - 40°20'W onde predomina a Mata Atlântica.

Uma exsicata do material vegetal foi depositada no herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa (exsicata nº47.928).

### 2.1.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL

O extrato vegetal foi preparado a partir das cascas da planta cortadas em pedaços (1.5 kg) e, submetidas à maceração sequencial a frio com etanol P. A 95% (v/v) na razão de 1:2 (500 g de casca : 1L de etanol). Posteriormente, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório a temperatura inferior à 60 °C até completa remoção do solvente; obtendo assim, o extrato seco (ECU). Os extratos obtidos (96.58g) foram armazenados sob refrigeração, em frasco âmbar de vidro.

### 2.1.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR FIA-ESI-IT-MS/MS<sup>N</sup>

O perfil cromatográfico do extrato de *C. urucurana* (ECU) foi obtido empregando análise de infusão por fluxo direto (FIA), usando uma bomba-seringa com velocidade de fluxo de 10 µL/min, em espectrômetro de massa com fonte de ionização por electrospray (ESI), nos modos positivo e negativo (Thermo, San Jose, EUA) equipado com analisador *ion trap* (IT) linear (Thermo Scientific LTQ XL) e *software* Xcalibur. A tensão capilar foi -35 V, a tensão de pulverização de 5 kV e lente de tubo de -100 v. A temperatura do capilar foi de 280 °C. Nitrogênio foi usado como gás carreador do fluxo e como nebulizante. A análise completa de varredura foi registrada na faixa m/z 100-2.000. As fragmentações em vários estágios (ESI-MS<sup>n</sup>) foram realizadas usando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra o gás hélio para ativação dos íons. Dois eventos foram realizados durante a análise no espectrômetro de massas, sendo primeiramente obtido o espectro de massa de varredura completa (*full-scan*) a fim de adquirir os dados dos compostos ionizados dentro da faixa estabelecida. No segundo evento foi realizado experimento MS/MS com energia de colisão de 30% e tempo de ativação de 30 ms., empregando dados de varredura dependente do *full scan*. A energia de colisão para MS/MS foi ajustada em 30 a 40 eV. Aos íons produtos obtidos sucessivas fragmentações foram obtidas.

#### 2.1.4 CLEAN UP EM SPE

A preparação do extrato consistiu em uma etapa de *clean up* por extração em fase sólida empregando cartuchos de RP18. Os cartuchos foram previamente ativados com MeOH (4 mL) e equilibrados com MeOH/H<sub>2</sub>O (85:15, v/v) (4 mL). Os extratos (10 mg) a serem aplicados no suporte de SPE foram previamente solubilizados em 1,5 mL da solução MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, v/v), eluídos com a mesma proporção de fase móvel e posteriormente, secos em ar comprimido. Após a secagem, 2 mg de cada extrato foram ressuspensos em MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, v/v) em 2 mL fornecendo uma solução com uma concentração de 1mg.mL<sup>-1</sup>. Ao fim, as soluções foram filtradas em filtro PTFE Millex® com tamanho de poro 0,22 µm.

#### 2.1.5 ANÁLISE POR FIA-ESI-IT-MS<sup>N</sup>

A injeção das amostras foi realizada por fluxo direto empregando analisador *ion trap* Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por eletropray (ESI), nos modos positivo e negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Foi utilizado um tubo capilar de sílica fundida a 280 ° C, tensão de pulverização de 5,00 kV, tensão capilar de -35 V, lente de tubo de -100 V e um fluxo de 5,0 µL de min<sup>-1</sup>. A análise completa de varredura foi registrada na faixa m / z de 100-1500. As fragmentações de vários estágios (ESI-MS<sup>n</sup>) foram realizadas usando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra o hélio para a ativação de íons. O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa para adquirir dados sobre íons naquela faixa m/z. O segundo evento de varredura foi um experimento MS/MS realizado usando uma análise dependente de dados nas moléculas dessolvadas dos compostos de interesse em uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30 ms. Os íons dos produtos foram então submetidos a fragmentações sucessivas nas mesmas condições (TALA et al., 2013).

#### 2.1.6 COMPOSIÇÃO DA POMADA A BASE DE EXTRATO DE *C. urucurana*

Uma parte do extrato seco foi empregada para a preparação das pomadas a base das cascas de *C. urucurana*. Foram preparadas duas formulações de concentrações distintas 5% e 10% de ECU, empregando para ambas uma base para

pomada (hidrofílica) composta de polietilenoglicol – 400 (PEG-400 (Macrogol 400 (Polietilenoglicol 400), Macrogol 4000 (Polietilenoglicol 4000), Propilenoglicol).

### 2.1.7 ANIMAIS

Camundongos *knockout* para IL-10 (n=60) e camundongos selvagem C57 (n=12) fêmeas, com peso médio de  $15 \pm 20$  g, com 8 semanas de vida, provenientes do Laboratório de Bioquímica Nutricional, foram alocados no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Nutrição e Saúde, da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos em ciclos de 12 horas de claridade e 12 horas de escuridão, com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C, umidade: 60-70%). Água *ad libitum* e ração comercial peletizada foram fornecidas aos animais. Foram mantidos em gaiolas individuais e limpos diariamente. Todos os procedimentos foram aprovados pelo CUA (Comitê de Ética no uso de Animais) da Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 41/2017).

### 2.1.8 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram separados aleatoriamente em 6 grupos (n=12), divididos da seguinte forma:

**SALC57:** feridas tratadas com solução salina 0,9 % (controle negativo) em camundongos selvagem C57;

**SAL:** feridas tratadas com solução salina 0,9% (controle negativo) em camundongos *knockout* IL-10;

**BAS:** feridas tratadas com aplicação tópica de base para pomada polietilenoglicol-400 (Macrogol 400 (Polietilenoglicol 400), Macrogol 4000 (Polietilenoglicol 4000), Propilenoglicol), em camundongos *knockout* IL-10;

**SS:** feridas tratadas com pomada de sulfadiazina de prata 1% (controle positivo) em camundongos *knockout* IL-10;

**CR1:** feridas tratadas com aplicação tópica de pomada a base de extrato da casca de *C. urucurana* 5% em camundongos *knockout* IL-10;

**CR2:** feridas tratadas com aplicação tópica de pomada a base de extrato da casca de *C. urucurana* 10% em camundongos *knockout* IL-10.

Após o procedimento cirúrgico as feridas foram limpas com solução salina a 0,9%, em seguida, deu-se a aplicação tópica da pomada de ECU nos respectivos grupos CR1 e CR2. Todos os tratamentos foram iniciados 12 horas após a realização das feridas durante 14 dias de experimento.

#### 2.1.9 INDUÇÃO DE FERIDAS

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) depilados na região dorsolateral e desengordurada a área com éter (Merck®, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, houve a aplicação de etanol (70%) e iodopovidona (10%) para a anti-sepsia (Johnson Diversey®, Rio de Janeiro, Brasil). Uma ferida circular, de 10 mm de diâmetro, foi feita por incisão cirúrgica na pele e tecido subcutâneo com um bisturi, até a exposição da fáscia muscular dorsal. No dia 0 foi retirado o tecido ileso e iniciado o tratamento. Ao final de 7 dias de tratamento, metade dos animais de cada grupo (n=6) foram eutanasiados por deslocamento cervical depois da coleta do tecido cicatricial. No dia 14 de tratamento, este processo se repetiu com os animais restantes (n=6). O tecido retirado foi separado para análises histomorfológicas e de expressão de citocinas.

#### 2.1.10 CÁLCULO DA ÁREA DA FERIDA E A TAXA DE CONTRAÇÃO TECIDUAL

A área e a taxa de contração da ferida foram avaliadas após o sétimo e décimo quarto dia, utilizando imagens digitalizadas com as dimensões de 320 × 240 pixels (24 bits / pixel) obtidas usando uma câmera digital (W320 Sony, Tóquio, Japão). A área das feridas foi calculada por planimetria computadorizada usando o programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). A Taxa de Contração da Ferida (TCF) foi calculado utilizando a seguinte equação:  $\frac{\text{área inicial da ferida (A}_0\text{)} - \text{área medida em um determinado dia (A}_i\text{)}}{\text{área inicial da ferida (A}_0\text{)}} \times 100$  (GONÇALVES et al., 2016).

#### 2.1.11 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os fragmentos das feridas foram fixados em solução de *Karnovsky* por 24 hs, desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Em seguida,

cortes histológicos de 4 µm de espessura, obtidos em micrótomo rotativo foram montados sobre lâminas histológicas. As seções foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análises de fibroblastos e vasos sanguíneos (GONÇALVES et al., 2010), pela técnica de Sírius Red para análise das fibras colágenas sob microscopia de polarização (Sigma, St. Louis, Mo, EUA). As fibras de colágeno espessas (tipo I) aparecem em tons brilhantes que variam de vermelho a amarelo, enquanto as fibras reticulares finas (colágeno tipo III) aparecem de cor verde brilhante (GONÇALVES et al., 2014)

A visualização das lâminas e a captação das imagens foram realizadas por meio do microscópio de luz BX-60® (Olympus, Tóquio, Japão) conectado a uma câmera digital (QColor 3®, Olympus). Foi examinada uma área de tecido total de  $1.53 \times 10^6$  µm<sup>2</sup> submetidas à análise estereológica. Dez campos histológicos foram amostrados aleatoriamente em cada seção de pele usando uma lente com objetiva de 20x. Uma grade de 300 pontos foi projetada sobre cada imagem. Os parâmetros estereológicos da densidade volumétrica (Vv) foram calculados contando os pontos sobre fibroblastos, vasos sanguíneos e colágeno tipo I e tipo III, utilizando a razão:  $Vv = (PP / PT) \times 100$ , em que PP é o número de pontos que ocorrem sobre a estrutura de interesse e PT é o número total de pontos no sistema de teste (NOVAES et al., 2015).

#### 2.1.12 ANÁLISE DE MASTÓCITOS

Secções de tecido cicatricial coradas com azul de toluidina foram utilizadas para identificação de mastócitos (LECLERE et al., 2006). Usando uma lente objetiva de 40x, 10 campos histológicos por lâmina, foram aleatoriamente analisados para obter uma área total de  $6.21 \times 10^6$  µm<sup>2</sup>. O número de mastócitos por unidade de área histológica foi calculado de acordo com a relação  $QA = \Sigma \text{ mastócitos} / AT$  em que  $\Sigma$  é a somatoria de mastositos dentro de uma área e AT a área total (LECLERE et al., 2006).

#### 2.1.13 ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS

Fragmentos de tecido da pele previamente armazenados a -80°C foram homogeneizados em PBS e centrifugados a 3.500g durante 10 min a 5°C. O

sobrenadante foi coletado para o teste de citocinas. Foi utilizado o kit BD *Cytometric Bead Array (CBA)/ Mouse Th1/Th2/Th17A* do segmento de notas de citometria BD (CBA) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Os dados foram coletados usando FACSCalibur e analisados com o *software* FCAP 3.0. (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Deste Kit, foi realizado dosagens das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A por citometria de fluxo, seguindo o protocolo do fabricante.

#### 2.1.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram relatados como média e desvio padrão (média  $\pm$  DP). Comparações entre grupos com a distribuição paramétrica (Newman-Keuls) foi realizada utilizando Anova unidirecional. Para dados distribuídos não paramétricos, um kruskal-wallis. A significância estatística foi definida em  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas usando GraphPad Prism 5.0® (GraphPad *Software Inc.*, SanDiego, Califórnia, EUA).

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.2.1 PERFIL FITOQUÍMICO

Foi possível identificar por FIA-ESI-IT-MSn no modo negativo compostos derivados de proantocianidinas. Proantocianidinas compreende um extenso grupo de compostos polifenólicos, também conhecidos como taninos condensados, sendo formado por oligômeros ou polímeros de unidades flavan-3-ol (catequina) (LEITE, 2009). As proantocianidinas podem ser divididas em diferentes classes, como por exemplo, pelo seu padrão de hidroxilação no anel B do oligômero constituinte (Figura 4), representado pela (epi)afzelequina, (epi)catequina e (epi)galocatequina. Proantocianidinas também podem ser classificadas de acordo com a forma de ligação entre as unidades monoméricas. As unidades de flavan-3-ol são interligadas usualmente pelas posições C<sub>4</sub> de uma unidade com C<sub>8</sub> ou C<sub>6</sub> de outra unidade (Figura 5).

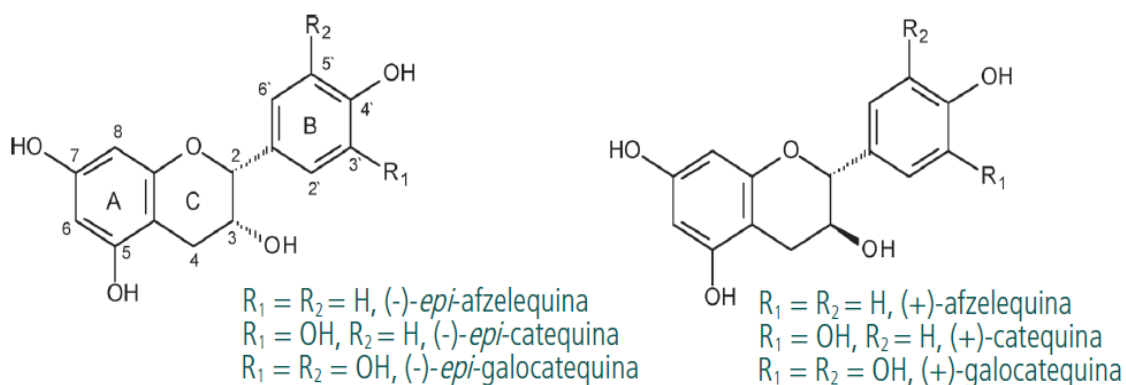


Figura 4. Variações estruturais dos monômeros de proantocianidinas. Adaptada de Leite, (2009).

Proantocianidinas podem ser formadas pela condensação de unidades (epi)catequinas quando são chamadas de procianidinas (mais comuns em plantas), ou por por unidades de (epi)afzelequina e (epi)galocatequina, designadas propelargonidinas e prodelfinidinas, respectivamente (LV et al., 2015).

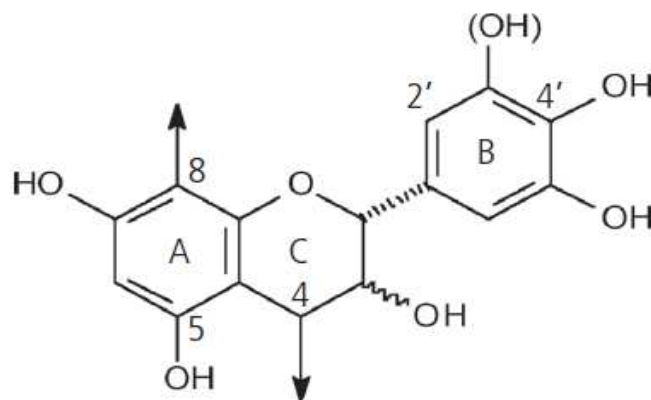


Figura 5. Tipos de ligações formadas pelos oligômeros de proantocianidinas a partir de sua estrutura básica. Adaptada de Leite, (2009).

Para a análise de proantocianidinas presentes em ECU a ionização em modo negativo se mostrou mais sensível e seletivo que no modo positivo, provavelmente devido ao caráter ácido dos grupos fenólicos. A Figura 6 mostra o espectro de massa em *full scan* indicando os íons  $[M-H]^-$  dos metabólitos secundários presentes em ECU.

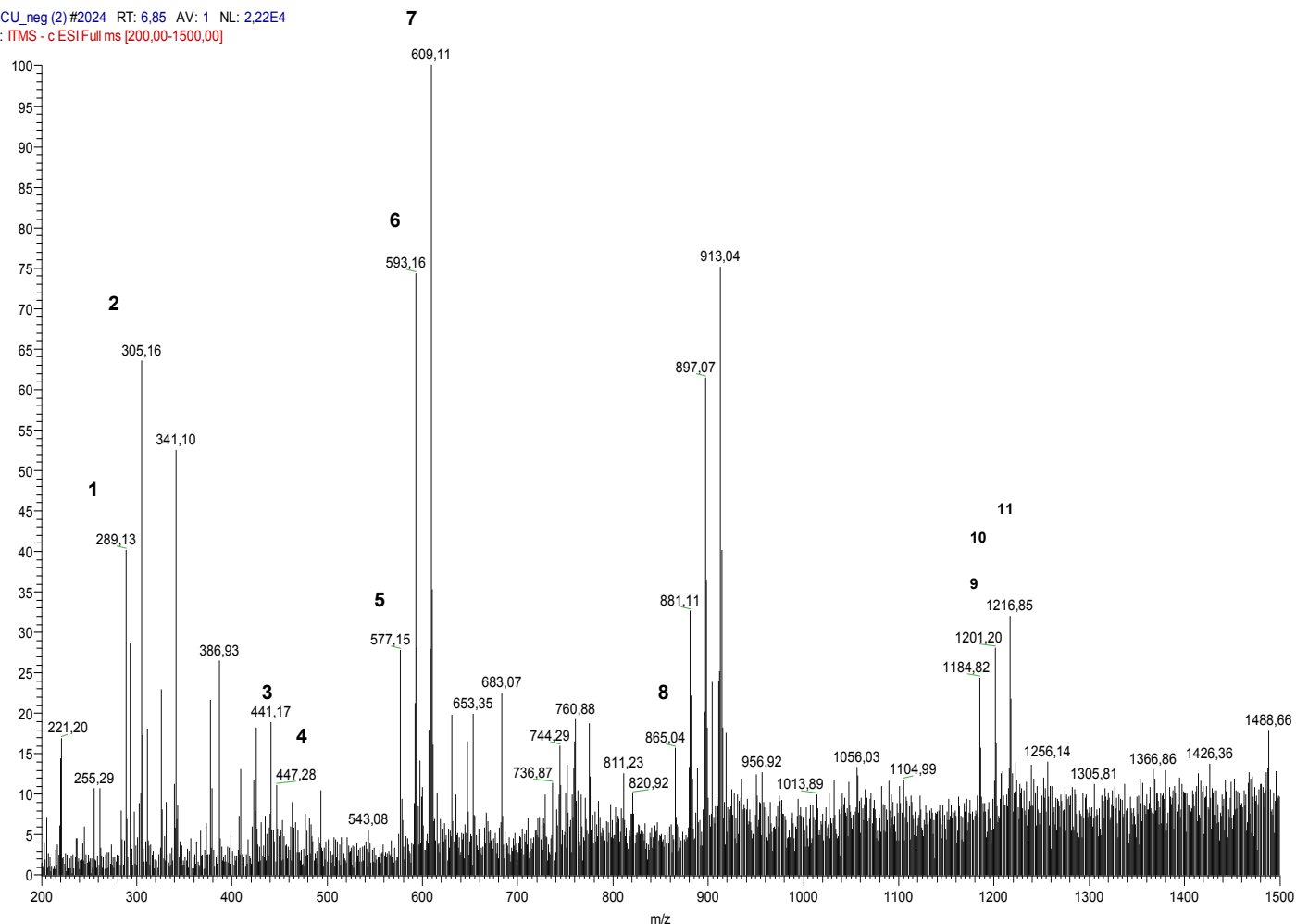


Figura 6. Espectro de massa em “full scan” indicando os íons [M-H]<sup>-</sup> dos metabólitos secundários presentes em ECU.

A fragmentação de segunda-ordem (MS/MS) para os íons relacionados a proantocianidinas levou à identificação de diferentes arranjos oligoméricos, sendo que a estereoquímica dos carbonos C2 e C3 de catequinas e galocatequinas monoméricas e oligoméricas não puderam ser diferenciadas pelos experimentos de MS realizados. Assim, passaremos a denominar fragmentos de m/z 289 como sendo referente à (epi)catequina e os fragmentos de m/z 305 de (epi)galocatequina

As informações obtidas no modo negativo dos íons moleculares e suas fragmentações (Tabela 2) mostraram que ECU consiste principalmente de uma mistura de proantocianidinas quando comparados com dados da literatura para estes compostos (JAISWAL et al., 2012). A (epi)catequina e a (epi)galocatequina e seus derivados foram identificados nos extratos pelos padrões de fragmentação obtidos pelos espectros de MS.

Tabela 2. Dados dos Íons precursores e suas respectivas fragmentações obtidas por FIA-ESI-IT-MSn de ECU (modo negativo).

<b>N</b>	<b>[M-H]<sup>-</sup></b>	<b>MS<sup>n</sup></b>	<b>Composto</b>
<b>1</b>	289	271, 245, 203, 175	( <i>epi</i> )catechin
<b>2</b>	305	287, 261, 221, 203, 179	( <i>epi</i> )gallocatechin
<b>3</b>	447	429, 301, 179	quercetin-O-rhamnoside
<b>4</b>	493	461, 443, 331, 169	methoxiquercetin-O-glucoside
<b>5</b>	577	559, 451, 425, 407, 289	( <i>epi</i> )catechin-( <i>epi</i> )catechin
<b>6</b>	593	575, 425, 423, 407, 289	( <i>epi</i> )gallocatechin-( <i>epi</i> )catechin or ( <i>epi</i> )catechin-( <i>epi</i> )gallocatechin
<b>7</b>	609	441, 423, 305	( <i>epi</i> )gallocatechin-( <i>epi</i> )gallocatechin
<b>8</b>	865	713	( <i>epi</i> )catechin-( <i>epi</i> )catechin- ( <i>epi</i> )catechin
<b>9</b>	1185	1059, 999, 813	( <i>epi</i> )catequina-( <i>epi</i> )catequina- ( <i>epi</i> )gallocatequina-( <i>epi</i> )gallocatequina
<b>10</b>	1201	1075, 1015	( <i>epi</i> )catequina-( <i>epi</i> )gallocatequina- ( <i>epi</i> )gallocatequina( <i>epi</i> )gallocatequina ( <i>epi</i> )gallocatequina-
<b>11</b>	1217	1091, 1031	( <i>epi</i> )gallocatequina- ( <i>epi</i> )gallocatequina( <i>epi</i> )gallocatequina

O composto 1 (Tabela 2) foi atribuído aos diastereoisômeros de catequina e epicatequina pela confirmação do íon molecular desprotonado  $[M-H]^-$  de  $m/z$  289. MS/MS deste íon levou a formação dos íons produto de  $m/z$  271, referente à perda de uma molécula de água  $[M-18-H]^-$ , e do íon produto de  $m/z$  245, derivado da perda de 42 Da ( $HC\equiv C-OH$ ). O íon  $[M-H]^-$  de  $m/z$  305, cuja fragmentação em segunda-ordem do íon precursor levou à formação íon produto de  $m/z$  191  $[M - 162 - H]^-$  sugeriu a presença de outro monômero, que de acordo com dados da literatura está em concordância com isômeros de galocatequina (JAISWAL et al., 2012). Fragmentação do íon precursor  $m/z$  441 produziu íon de  $m/z$  289  $[M-H-152]^-$  correspondente a perda de uma unidade de galato, sugerindo a presença de galato(epi)catequina.

As proantocianidinas que consistem exclusivamente em (epi)catequina são chamadas de procianidinas e os íons de  $m/z$  577 e  $m/z$  865 visualizados no *full scan* do MS de ECU são indicativos de procianidinas dímera do tipo B e trímera, respectivamente. No entanto, como em outras técnicas de MS, não é possível diferenciar entre os possíveis estereoisômeros, impossibilitando a afirmação inequívoca quanto à posição e estereoquímica da ligação inter-flavanoídes (4→6 ou 4→8). Dados da literatura indicam que as procianidinas com ligações 4 → 8 são preferidas estereoquimicamente (SAID et al., 2017). O íon quasi-molecular de  $m/z$  577 sugere que seja um dímero constituído de duas unidades de (epi)catequina, que produziu após  $MS^3$  os íons precursores de  $m/z$  425 e  $m/z$  407, decorrentes de uma fragmentação do tipo *retro-Diels-Alder* (RDA), fornecendo informações sobre a hidroxilação do anel B (confirmando tratar-se de unidade catequina) e o tipo de ligação entre as duas unidades monoméricas. O íon de  $m/z$  407 é devido a subsequente perda de uma molécula de água do anel C (Figura 7).

A fragmentação do íon quase-molecular de  $m/z$  865, ao comparar os seus dados de fragmentações com os da literatura levou à identificação da procianidina trimérica. Para tal afirmação, foi verificada a formação do íon produto  $m/z$  713  $[M-H^+ -152]$  decorrente de uma fragmentação RDA, provavelmente ocorrido no anel C de uma das unidades de (epi)catequina (SAID et al., 2017). Os íons quasi-moleculares de  $m/z$  593 e 609 também foram atribuídos aos dímeros de proantocianidinas tipo-B, sendo um desses formado pela condensação de uma unidade de catequina com outra de galocatequina ( $m/z$  593) e outro formado pela condensação de duas unidades de

galocatequina ( $m/z$  609). O pico detectado de  $m/z$  593 produziu um pico base de  $m/z$  407 formado pela perda de um fragmento RDA (168 Da) de um dos monômeros do dímero seguido da perda de uma molécula de água (18 Da). A presença de um fragmento de  $m/z$  289 confirmou a presença de uma unidade de (epi)catequina, enquanto que os fragmentos de  $m/z$  407 [ $M-H^+ -186$  Da] e 425 [ $M-H^+ -168$  Da] confirmaram a presença de uma unidade de (epi)galocatequina. Esse mesmo critério de análise foi utilizado para a identificação do íon quasi-molecular de  $m/z$  609. As fragmentações  $MS^n$  levaram a formação dos íons precursores de  $m/z$  441, 423 e 305.

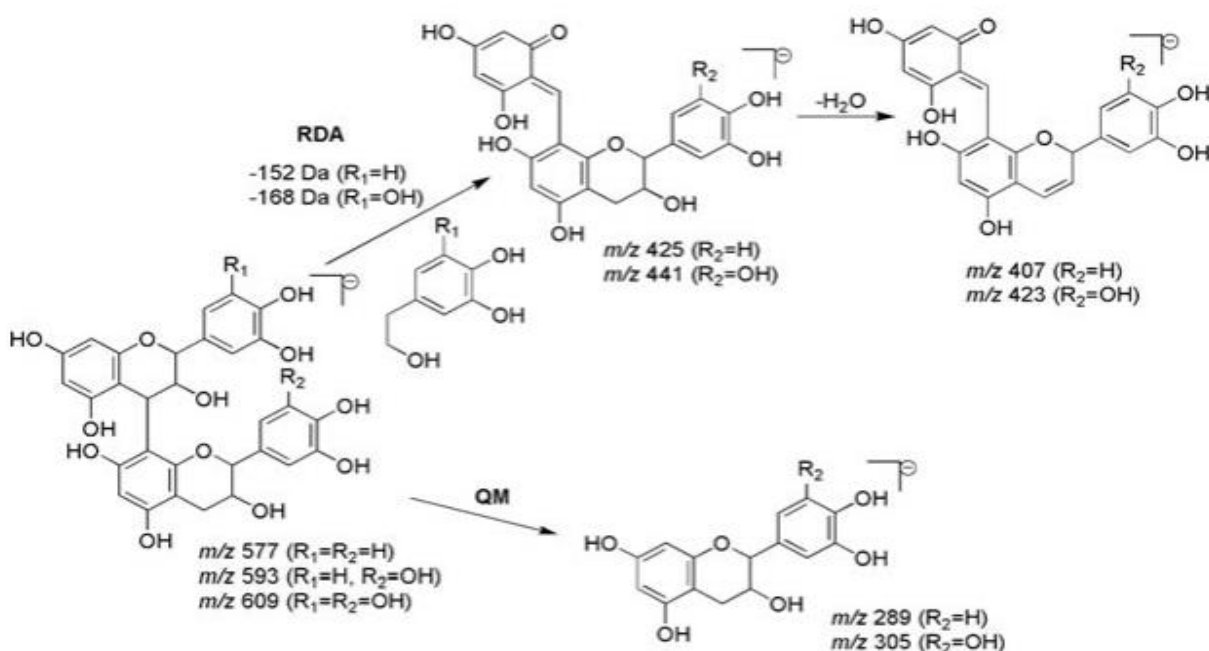


Figura 6. Proposta de fragmentação de proantocianidinas diméricas tipo B presentes em *Croton urucurana* RDA: fragmentação *retro-Diels-Alder*; QM: fragmentação quinona metídeo. Adaptado de Jaidwall et al. (2012)

A adição de um radical galoil à estrutura da proantocianidinas também tem sido frequentemente relatada na literatura, com a hidroxila do C-3 sendo o sítio mais comum para esta galoilação (JAISWALL et al., 2012). A presença de proantocianidinas esterificadas com unidade de galoil foi atribuída para alguns dos compostos identificados em ECU. Assim, para o íon precursor de  $m/z$  441 foi atribuída como galato da unidade monomérica de (epi)catequina. O pico base de  $m/z$  289 [ $M-H^+ -152$  Da] foi atribuída à perda de um resíduo de galoil. A perda de uma unidade de galoil também foi observada para o íon precursor de  $m/z$  761, correspondente ao

galato do dímero prodelfinidina. Este produziu o pico base MS<sup>2</sup> de m/z 609, oriundo da perda de um resíduo de galoil, e também de m/z 305 proveniente de um fragmento quinona metídeo, confirmando a presença de (epi)galocatequina. Os íons quase-moleculares de m/z 881, 897 e 913 representam outra série de proantocianidinas correspondentes a dímeros formados por unidades de (epi)catequinas e/ou (epi)galocatequinas, com resíduos de galoil. Fragmentações MS<sup>n</sup> do íon precursor de m/z 881 produziu o íon de m/z 729 [M-H-152]<sup>-</sup> correspondente a perda de uma unidade de galato e o íon de m/z 577 [M-H-304]<sup>-</sup> que pode corresponder a perda de duas unidades de galato e/ou a um resíduo de galocatequina (TALA et al., 2013).

Fragmentações MS<sup>n</sup> do íon precursor m/z 897 apresentou fragmentos de íons de m/z 745 [M-H<sup>+</sup> -152], atribuído a perda de unidade galoil e m/z de 727 [M-H<sup>+</sup> -170] oriundo da perda de ácido gálico. A presença dos íons produtos m/z 287 e 305 Da, provenientes da fissão quinonametídeo sugeriu a presença das unidades de (epi)catequina e (epi)galocatequina. O mesmo padrão de fragmentação foi observado para o íon precursor m/z 913, aparecendo os íons precursores m/z 761 [M-H<sup>+</sup> -152] e m/z 743 [M-H<sup>+</sup> -170] decorrente da perda de ácido gálico, sendo então atribuído ao galato do dímero constituído de unidades de (epi)galocatequina. Os três íons quasi-moleculares de m/z 1.185, 1.201 e 1.217 foram relacionados a tetrâmeros formados por unidade de (epi)catequinas e (epi)galocatequinas. Suas identificações foram realizadas com base do íon molecular e suas fragmentações obtidas por MS<sup>n</sup> (TALA et al., 2013).

No modo positivo, os espectros de MS indicaram a presença de dois alcaloides, anteriormente já relatados para *C. urucurana* (CORDEIRO et al., 2016). As análises dos íons protonados e as respectivas fragmentações observadas pelo FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> de m/z 342 [M]<sup>+</sup> e m/z 344 [M]<sup>+</sup> (Tabela 3) foram consistentes com os dados da literatura descritos para os compostos magnoflorina e tembetarina (Figura 8) (YAN et al., 2013).

Tabela 3. Dados dos íons precursores e suas respectivas fragmentações obtidas por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> de ECU (modo positivo).

<b>N</b>	<b>[M-H]<sup>+</sup></b>	<b>MS<sup>n</sup></b>	<b>Composto</b>
<b>15</b>	342	297, 282, 265, 237	magnoflorina
<b>16</b>	344	299, 253	tembetarina

A presença desses dois alcaloides foi relatada na casca de *C. urucurana* por Cordeiro et al. (2016). Provavelmente, a tembearina seja precursor biossintético da magnoflorina.

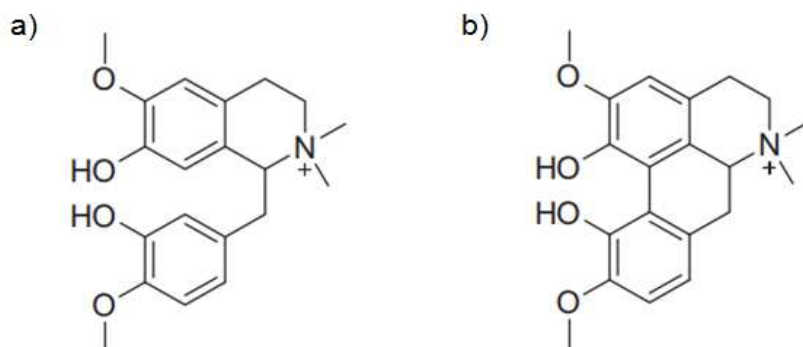


Figura 7. Tembetarina (a), Magnoflorina (b), alcaloides identificados no extrato de *Croton urucurana*, determinados por FIA-ESI-IT-MSn no modo positivo.

Para ambos os alcaloides, o padrão de fragmentação favoreceu a formação do pico base com a perda de uma unidade de C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>N, bem característico. A perda inicial do grupo amina e as sucessivas perdas dos grupos substituintes são bem estabelecidas para fragmentações por ESI de alcaloides aporfínicos (Figuras 9, 10, 11) (SILVA et al., 2012).

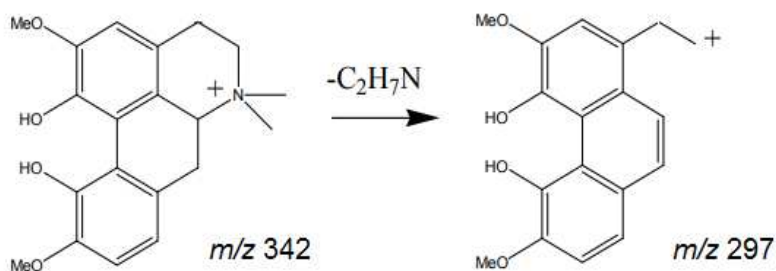


Figura 8. Proposta de mecanismo de fragmentação do alcaloide magnoflorina. Adaptado de Yan et al. (2013).

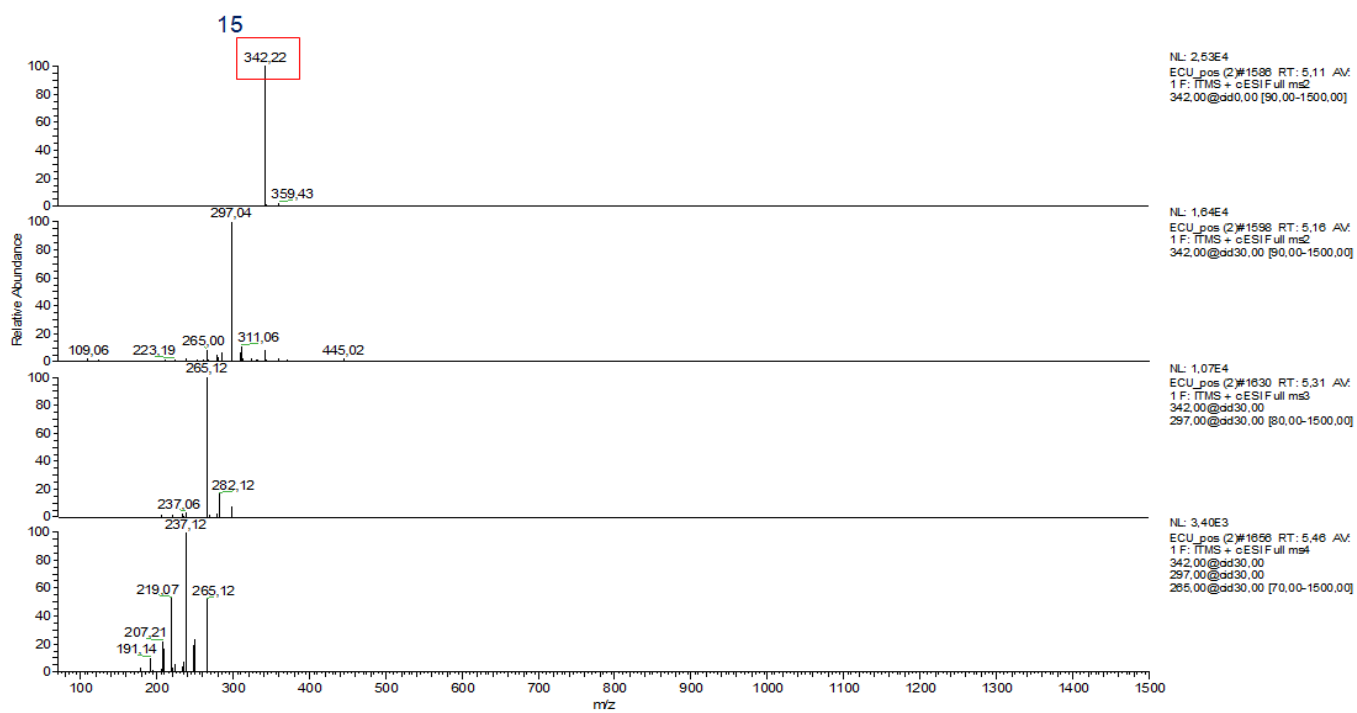


Figura 9. Espectro de FIA-ESI-IT-MSn de ECU do íon protonado de m/z 342, no modo positivo.

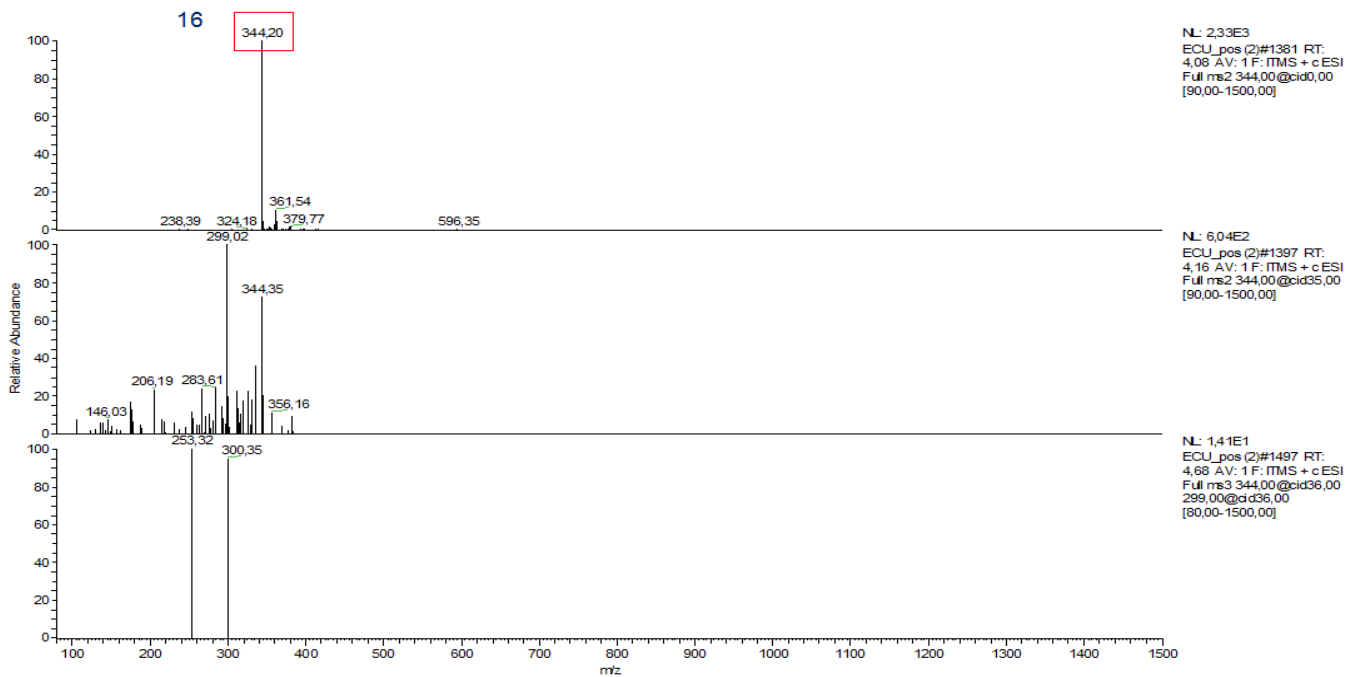


Figura 10. Espectro de FIA-ESI-IT-MSn de ECU do íon protonado de m/z 344, no modo positivo.

## 2.2.2 AVALIAÇÃO DA ÁREA DA FERIDA E A TAXA DE CONTRAÇÃO TECIDUAL

Após a realização da ferida produzida por intenção secundária, foi avaliado a partir do dia 0º a redução da área (mm<sup>2</sup>) e o aumento na taxa de contração (TCF) da ferida. Os grupos CR1 e CR2 apresentaram diferenças significativas em comparação com os grupos controle SALC57, SAL e BAS ( $p < 0.05$ ) no dia 7º do tratamento (Tabela 4). Na avaliação do dia 14, os grupos CR1 e CR2 não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle positivo (SS) e BAS, pois os valores da área não diferem estatisticamente. Segundo Pieters et al. (1993), o processo de cicatrização de feridas pode ser influenciado pelo diâmetro das feridas os quais podem interferir na avaliação da área e por conseguinte na taxa de contração da ferida. No entanto, nosso tratamento com a pomada das cascas de *C. urucurana* foi eficiente dado que estimulou a formação de uma crosta evidenciando a reepitelização que acelerou o fechamento da ferida completamente (Figura 12).

Tabela 4. Área (mm<sup>2</sup>) e taxa de contração da ferida (TCF) (%) em camundongos C57 selvagens e camundongos *knockout* IL-10 tratados com ECU.

Dia	Área/						
	Contração	SALC57	SAL	BAS	SS	CR1	CR2
0	Área (mm <sup>2</sup> )	86.87±11.44	88.01 ±15.18	90.04±7.96	85.09±8.51	87.61±12.26	80.00±4.97
	TCF (%)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
7	Área (mm <sup>2</sup> )	57.03±9.23 <sup>a</sup>	58.25±7.31 <sup>a</sup>	58.17±5.60 <sup>a</sup>	47.18±2.89	23.95±4.72 <sup>b</sup>	24.21±6.68 <sup>b</sup>
	TCF (%)	31.26±17.31 <sup>a</sup>	34.66±15.90 <sup>a</sup>	34.03±4.59 <sup>a</sup>	44.84±9.32	73.83±1.96 <sup>b</sup>	72.71±6.78 <sup>b</sup>
14	Área (mm <sup>2</sup> )	3.17±0.70 <sup>a</sup>	3.58±0.76 <sup>a</sup>	3.18±1.06	2.81±0.97	0.96±0.28 <sup>b</sup>	0.89±0.24 <sup>b</sup>
	TCF (%)	96.70±0.46 <sup>a</sup>	96.54±0.44 <sup>a</sup>	97.38±0.46	97.42±0.46	98.84±0.34 <sup>b</sup>	98.86±0.31 <sup>b</sup>

Área (mm<sup>2</sup>) e taxa de contração da ferida (TCF) nos dias 0°, 7°, e 14° de camundongos C57 selvagens e camundongos *knockout* IL-10. Grupo SALC57: C57 selvagem solução salina 0,9 %. Grupos *knockout* IL-10: SAL, solução salina 0,9%; BAS, pomada de polietilenoglicol; SS, sulfadiazina de prata 1%; CR1, pomada de *C. urucurana* 5%; CR2, pomada de *C. urucurana* 10%. Os dados são representados como média ± DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas p <0,05 (teste Kruskal-Wallis).

Num estudo semelhante Lopes et al. (2013), tratou feridas cutâneas em ratos wistar com pomada a base de sangue de dragão de *C. lechleri* nas concentrações de 0,1 µg/ml e 1 µg/ml, observou que a sangue de dragão estimulou a contração da ferida e a formação de uma crosta escura e espessa aos 7° dias de tratamento. Além disso, confirmou que o látex contém taninos condensados, e pela ação bactericida dos taninos se espera que diminua o risco de infecção da ferida, evitando o retardo da cicatrização (MELCHOR et al., 2001). Machado et al. (2015), utilizou extrato etanólico das cascas de *C. urucurana* aplicado topicamente em camundongos mostrou maior taxa de contração da ferida em 12 dias de tratamento além de acelerar a cicatrização. Autores sugeriram que a aceleração da ferida é devido à presença de proantocianidinas, compostos polifenólicos também conhecidos como taninos condensados presentes na planta (SALATINO et al., 2007; TALA et al., 2013).

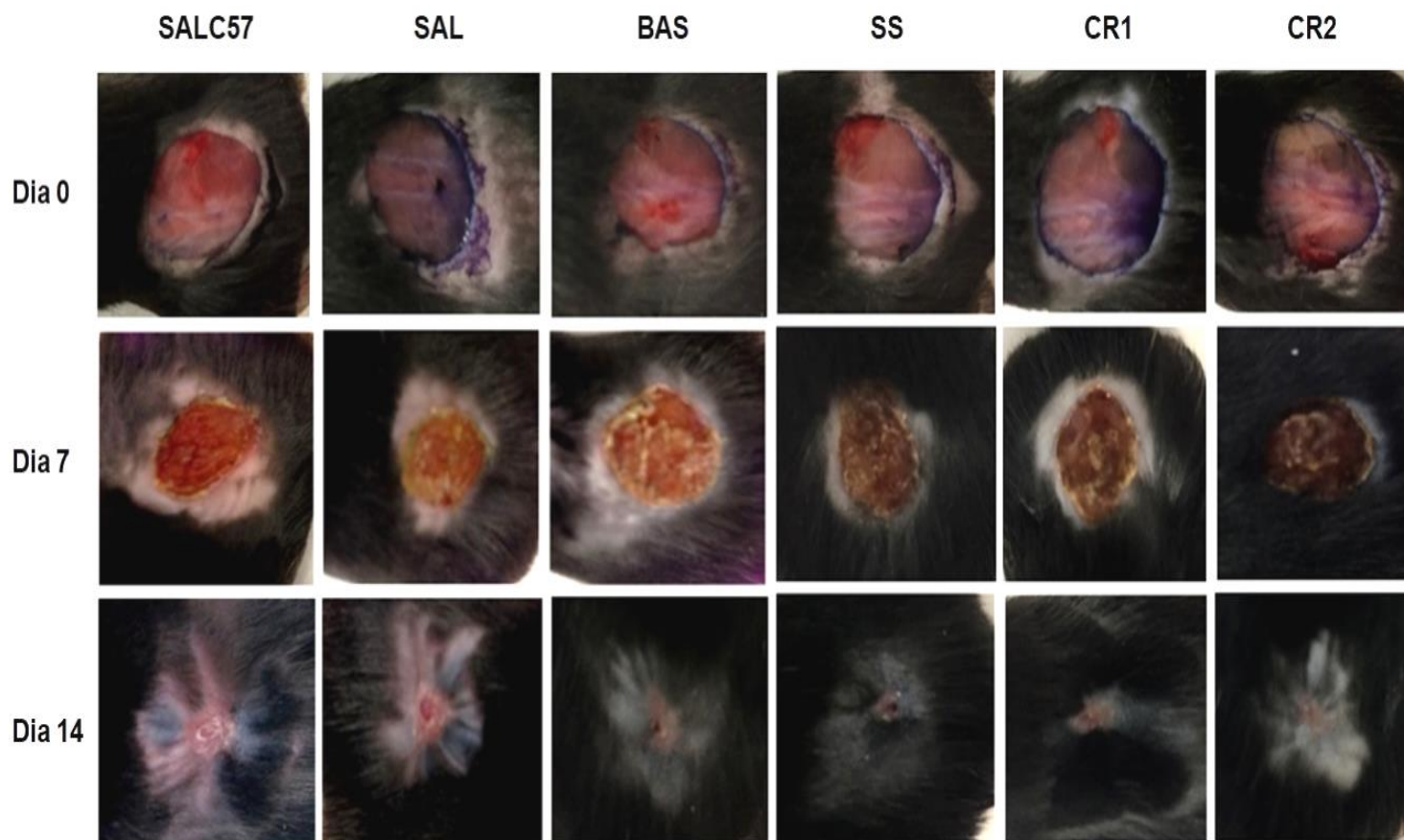


Figura 11. Fotografias representativas das feridas nos dias 0<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, e 14<sup>o</sup> de camundongos C57 selvagens e camundongos *knockout* IL-10. Grupo SALC57: C57 selvagem solução salina 0,9 %. Grupos *knockout* IL-10: SAL, solução salina 0,9%; BAS, pomada de polietilenoglicol; SS, sulfadiazina de prata 1%; CR1, pomada de *C. urucurana* 5%; CR2, pomada de *C. urucurana* 10%.

Foram relatadas como princípios ativos importantes de espécies contendo látex vermelho (LOPES et al., 2013). Compostos como catequina e galocatequina da casca de *C. urucurana*, desempenham um papel importante na atividade analgésica (PERES et al., 1998). Esses compostos pertencem à família dos flavonóides que são antioxidantes fortes além dos alcaloides e diterpenos, que foram detectados no extrato metanólico da casca de *C. urucurana* (CORDEIRO et al., 2016). Os flavonóides distribuídos em plantas, incluindo o gênero *Croton* spp., possui atividades antioxidantes, antifúngicas, anti-inflamatórias, antivirais, antialérgicas e antiparasitárias (ALVES et al., 2017). Porém, os flavonóides além das proantocianidinas podem estar contribuindo na atividade de ECU sobre a cicatrização de feridas, pois têm apresentado potencial promissor na produção de fármacos (M. GANESHKUMAR et al., 2012; UMAIR et al., 2017). Os resultados da pomada de ECU

neste estudo confirmam a atividade biológica de *C. urucurana* como cicatrizante, já aplicada na medicina popular de forma empírica (RAO et al., 2007).

### 2.2.3 ANALISE HISTOPATOLÓGICA

O efeito cicatrizante de *C. urucurana* já descrita na medicina popular pelas comunidades no Brasil, foi avaliada utilizando-se fragmentos da pele retirados dos camundongos *knockout* IL-10 e C57 selvagens nos dias 0º, 7º e 14º de tratamento. Foram observados diferentes tipos celulares que favorecem a cicatrização, os animais que tiveram pomada do extrato de *C. urucurana*, CR1 (5%) e CR2 (10%) especialmente CR1, apresentaram um número significativamente maior de células (fibroblastos) e vasos sanguíneos nos dias 7º e 14º (Figura 13) quando comparadas com os outros grupos ( $P < 0,05$ ).

Estudos *in vitro* realizados com o extrato de *C. urucurana*, observaram a sua capacidade de promover a proliferação celular (PIETERS et al., 1993; GUPTA et al., 2008).

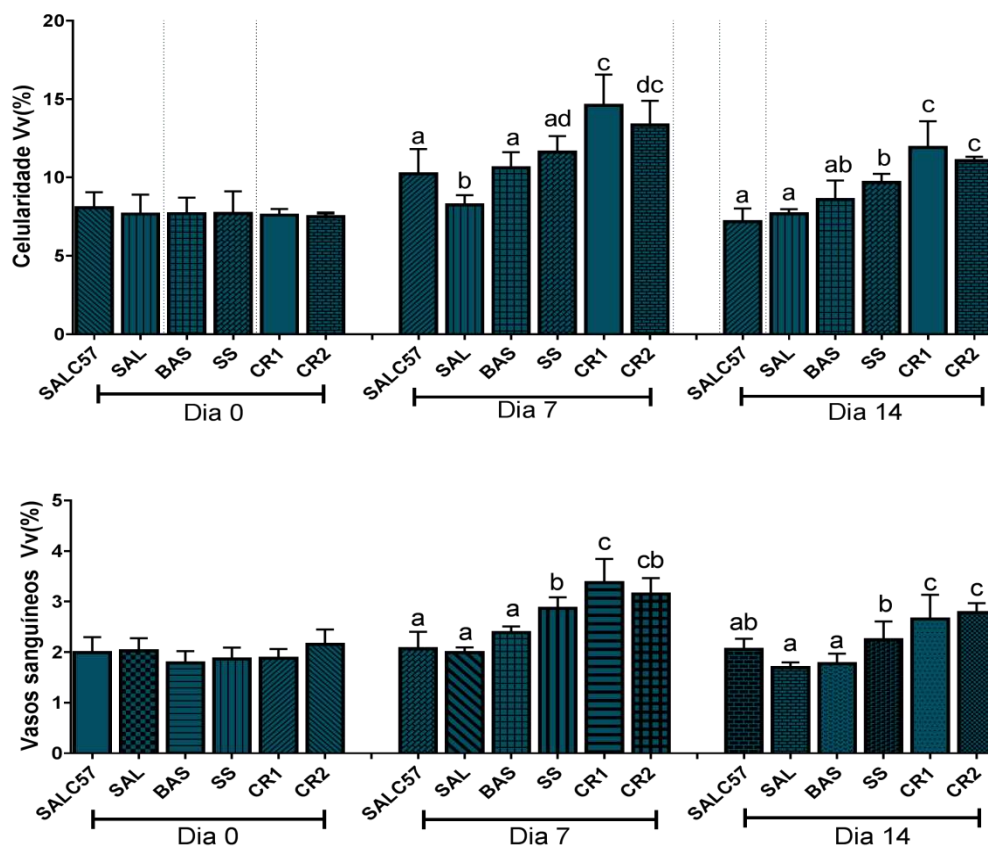


Figura 12. Número total de células e vasos sanguíneos do tecido cicatricial nos dias 0<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, e 14<sup>o</sup> de camundongos C57 selvagens e camundongos *knockout* IL-10. Grupo SALC57: C57 selvagem solução salina 0,9 %. Grupos *knockout* IL-10: SAL, solução salina 0,9%; BAS, pomada de polietilenoglicol; SS, sulfadiazina de prata 1%; CR1, pomada de *C. urucurana* 5%; CR2, pomada de *C. urucurana* 10%. Os dados são representados como média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas  $p < 0,05$  (teste Kruskal-Wallis).

Pode-se sugerir que os animais que receberam a pomada do extrato de *C. urucurana in vivo* tiveram maior celularidade e aumento na vascularização em comparação à sulfadiazina de prata (SS) que é empregado como agente cicatrizante e antimicrobiano já comercializado para a população (FISHER et al., 2003). Neste contexto, é importante avaliar parâmetros que favorecem a proliferação celular, como a angiogênese (vasos sanguíneos recém-formados), a qual é essencial para a nutrição e oxigenação do tecido lesado (LI et al., 2003; DEMINOVA-RICE et al., 2012). Esta etapa é iniciada por fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) (DEMINOVA-RICE et al., 2012). Esses

resultados sugerem que nosso tratamento de *C. urucurana* pode fornecer a nutrição e oxigenação do tecido em crescimento. Sarandy et al. (2017) mostrou atividade pró-angiogênese do extrato de *S. pseudoquina* que revelaram a presença de compostos fenólicos como taninos e fenóis simples. Os animais que receberam uma pomada de extrato de *S. pseudoquina* nas concentrações de 5% e 10% mostraram maior quantidade de células e aumento na vascularização no tecido lesado.

Células como os mastócitos também estão envolvidos na melhora da angiogênese, pois secretam fatores pró-angiogênicos, como VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8 (WHITTEMORE et al., 2016). Além disso, estudos sugeriram que os mastócitos geram e liberam moléculas como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, eles têm a capacidade de se envolver na regulação das funções de muitos órgãos e tecidos (CAETANO et al., 2014; WHITTEMORE et al., 2016). Tornou-se evidente que os mastócitos desempenham papel importante na cicatrização. Em nosso estudo, uma alta proporção de mastócitos no tecido foi formada no dia 0<sup>o</sup> (tecido normal), esse número diminuiu no dia 7<sup>o</sup> nos grupos tratados com solução salina 0,9% (SALC57 e SAL) além do grupo BAS e SS. Observa-se que nosso tratamento CR1 e CR2 estiveram iguais entre si no dia 7<sup>o</sup>, mais aumentou novamente no dia 14<sup>o</sup> (Figura 14). Verificou-se também que os animais que receberam pomada de ECU nas concentrações de 5% e 10% apresentaram diferença estatística em comparação com os outros grupos ( $p < 0,05$ ).

Ao longo da lesão tecidual, células como os mastócitos liberam uma variedade de mediadores inflamatórios, o que resulta num processo inflamatório (WHITTEMORE et al., 2016). A inflamação geralmente é um meio adequado para infecções porém, autores revelaram que as propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas de compostos como as proantocianidinas e polifenóis presentes na sangue de dragão, podem atribuir no processo da cicatrização (NAMJOYAN et al., 2016), pois camundongos *knockout* deficientes de células T, gama, ou delta na pele, mostraram um atraso no fechamento da ferida (GUO e DIPIETRO et al., 2010).

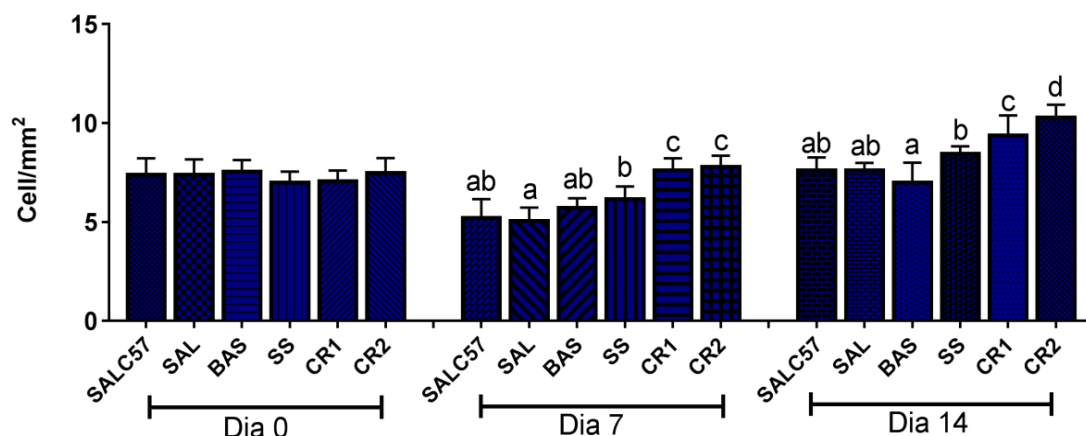


Figura 13. Proporção de mastócitos no tecido cicatricial nos dias 0º, 7º, e 14º de camundongos C57 selvagens e camundongos *knockout* IL-10. Grupo SALC57: C57 selvagem solução salina 0,9 %. Grupos *knockout* IL-10: SAL, solução salina 0,9%; BAS, pomada de polietilenoglicol; SS, sulfadiazina de prata 1%; CR1, pomada de *C. urucurana* 5%; CR2, pomada de *C. urucurana* 10%. Os dados são representados como média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas  $p < 0,05$  (teste Kruskal-Wallis).

Por outro lado, a degranulação mastocitária pode prolongar o processo inflamatório (MATHEW et al 2009; WHITTEMORE et al., 2016). Mathew et al. (2009), avaliou a partir de extrato etanólico de *S. indicus* seu efeito estabilizador em mastócitos, pois foi atribuído em grande medida à presença de flavonóides, já que muitos desses compostos apresentaram atividades anti-inflamatorias e imunoestimuladoras. Nossos resultados até agora, mostram que a pomada de ECU promoveu a proliferação de mastócitos, fibroblastos e vasos sanguíneos, contribuindo na inflamação e formação do tecido de granulação em resposta à lesão.

A fase final da cicatrização conhecida como remodelação, pode ser evidenciada pela presença de fibras colágenas, importantes componentes da MEC (matriz extracelular) (VELNAR et al., 2009), implicando principalmente na força de tensão do tecido (ARMSTROM e JUDE, 2002). Com a evolução do processo, a maioria das células desaparece e acentua-se a deposição de colágeno (PRISTO, 2013). Nosso tratamento com ECU nas concentrações de 5% e 10% mostrou a deposição de colágeno tipo III, nos dias 7º e 14º. Em relação ao colágeno tipo I, no dia 7º os grupos CR1 e CR2 apresentaram maior proporção de fibras, quando comparadas com os demais grupos ( $p < 0,05$ ).

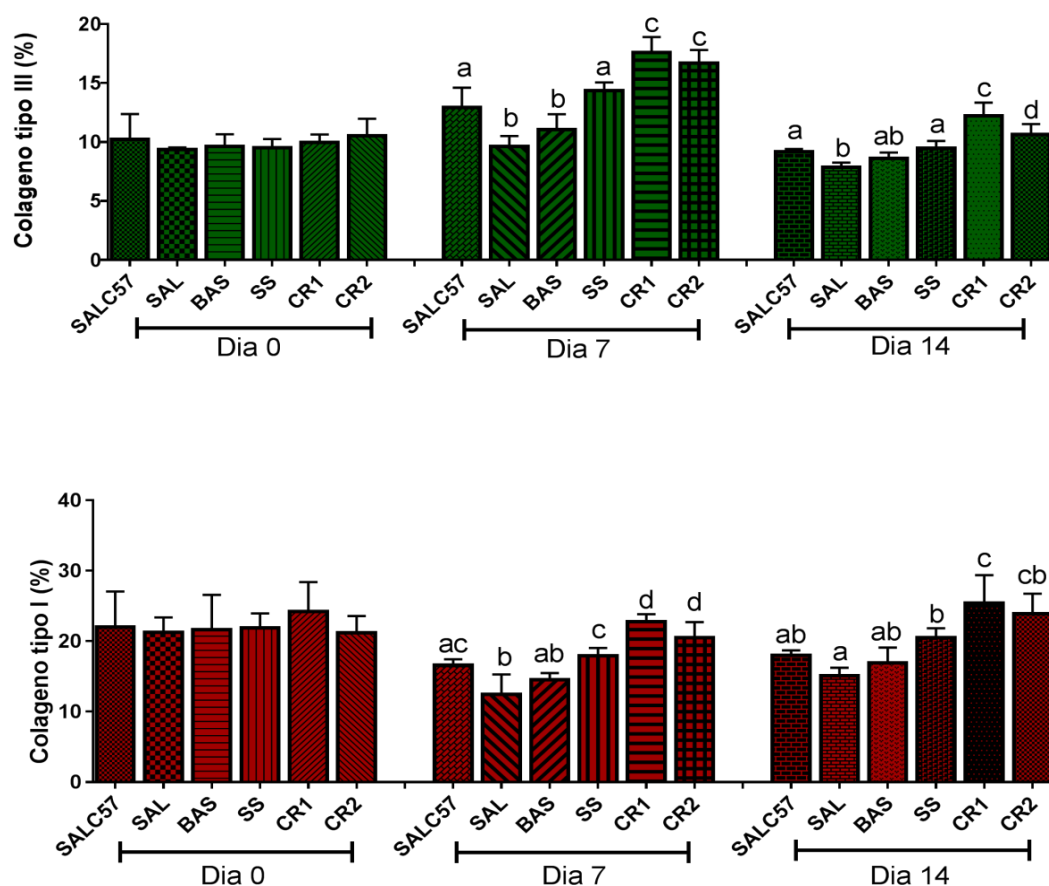


Figura 14. Deposição de fibras colágenas tipo III e fibras colágenas tipo I nos dias 0<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, e 14<sup>o</sup> de camundongos C57 selvagens e camundongos *knockout* IL-10. Grupo SALC57: C57 selvagem solução salina 0,9 %. Grupos *knockout* IL-10: SAL, solução salina 0,9; BAS, pomada de polietilenoglicol; SS, sulfadiazina de prata 1%; CR1, pomada de *C. urucurana* 5%; CR2, pomada de *C. urucurana* 10%. Os dados são representados como média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas  $p < 0,05$  (teste Kruskal-Wallis).

No dia 14<sup>o</sup> os grupos com tratamento de pomada de ECU (CR1 e CR2) apresentaram maior proporção de fibras, mas CR2 não definiu-se de SS ( $p < 0,05$ ). Observa-se uma diminuição no colágeno do tipo III e um aumento na produção de colágeno do tipo I, ao final do processo da cicatrização (Figura 15). Por tanto, os dados sugerem que o tratamento de lesões cutâneas com extrato de casca de *C. urucurana* num efeito dose resposta, acelerou a formação do colágeno tipo I (AMORIM et al., 2017). Ganeshkumar et al. (2012) observou um incremento de fibras colágeno no processo de feridas tratadas com extrato de *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). O extrato revelou a presença de compostos polifenólicos, flavonóides e taninos. Compostos como taninos presentes na planta, promovem a formação de ligações cruzadas com proteínas (RODRIGUES et al., 2013), provavelmente devido a que os

taninos sejam capazes de aumentar o número de ligações entre as fibras colágenas (SCHOFIELD, 2001). O colágeno aumentado em feridas estabiliza a nova formação de tecido de granulação e conseqüentemente acelera o fechamento da ferida (GREAVES et al., 2013; FRONZA et al., 2014).

#### 2.2.4 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATORIAS E ANTI-INFLAMATORIAS NO TECIDO CICATRICIAL

A produção de citocinas de perfis Th1, Th2 e Th17A foram analisados dos sobrenadantes da pele de camundongos C57 selvagens e camundongos *knockout* para IL-10. Neste estudo, as células Th1 (pró-inflamatórias) segregaram altos níveis de IL-2 e IFN- $\gamma$ , o pico de liberação dessas citocinas foi maior no dia 7º mas ocorreu um decremento no dia 14º (Figura 16). Os animais tratados com pomada a base de ECU nas concentrações de 5% e 10%, apresentaram um crescimento significativo em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). No dia 14º, a sulfadiazina de prata (SS) teve um aumento significativo nas citocinas IL-17A (Th17A) e IFN- $\gamma$  quando comparado aos demais grupos ( $P < 0,05$ ). Observa-se, que a TNF não apresentou diferenças significativas (Figura 16). O modelo animal (camundongo) *knockout* IL-10, utilizado para o tratamento da pomada de ECU, foi relacionado a estudos de atividade inflamatória, pois produzem relativamente mais células T aumentando a resposta imunológica (BETELLI et al., 1998; LENZEN et al., 2012). Neste estudo, os animais *knockout* IL-10 mostraram sinais claros de inflamação aumentado especialmente no dia 7º mas voltaram à normalidade no dia 14º. Estudos realizados em camundongos *knockout* IL-10 observaram uma resposta inflamatória crônica, por bactérias associadas ao intestino (OPAL et al., 2000; LENZEN et al., 2012). Sabe-se que a inflamação crônica tem um efeito tardio de 1 até 3 meses (JÄRBRINK et al., 2016). O sucesso no reparo da ferida requer de uma expressão coordenada da inflamação, uma resposta inflamatória excessiva ou prolongada resulta em lesão tecidual prejudicial (EMING et al., 2007). Sugere-se então que a pomada de ECU 5% e 10% pode ter influenciado de forma positiva a resposta inflamatória. Os compostos polifenólicos como as proantocianidinas presentes em *C.urucurana* criam uma camada protetora na superfície da ferida, essa barreira física previne a doença e a contaminação microbiana durante a fase inflamatória (NAMJOYAN et al., 2016). Por

outro lado os flavonóides poderiam regular atividades celulares *in vivo* relacionadas à inflamação: mastócitos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos (KIM et al., 2004).

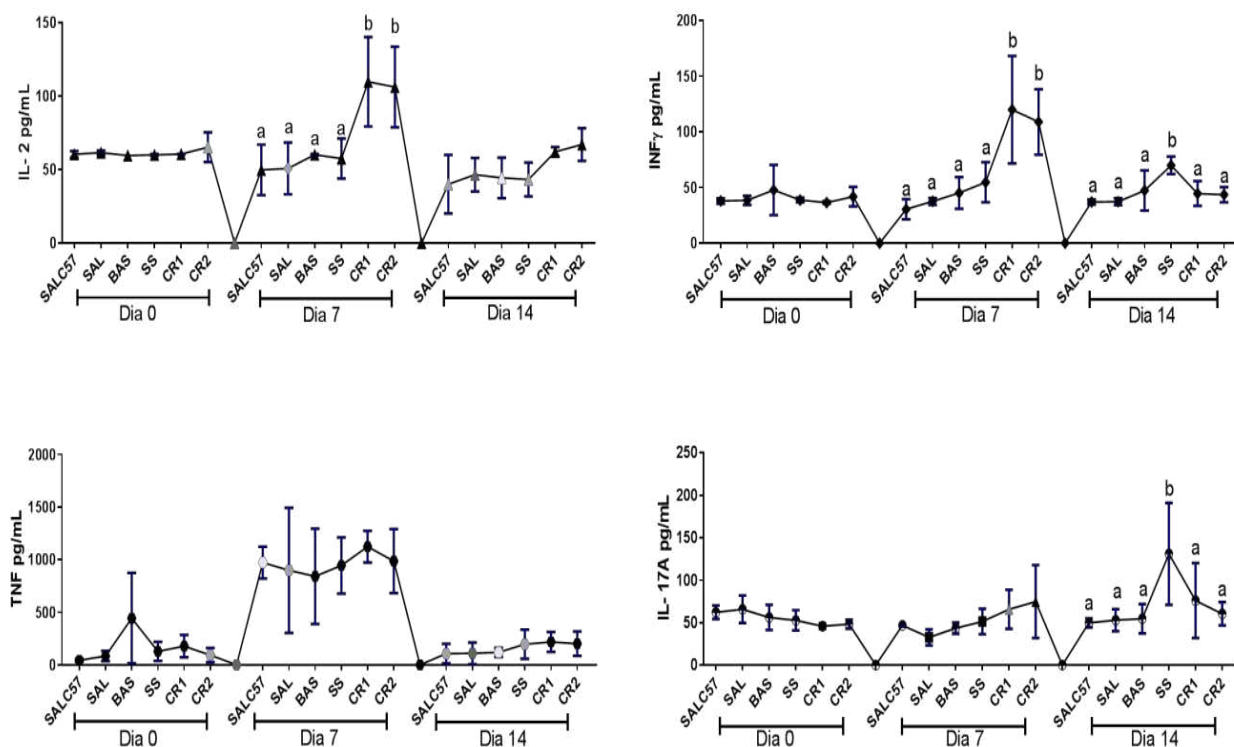


Figura 15. Citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-17A relacionadas ao perfil de resposta Th1 e Th17A (Pró-Inflamatórias) nos dias 0<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, e 14<sup>o</sup> de camundongos C57 selvagens e camundongos *knockout* IL-10 (a). Grupo SALC57: C57 selvagem solução salina 0,9 %. Grupos *knockout* IL-10: SAL, solução salina 0,9%; BAS, pomada de polietilenoglicol; SS, sulfadiazina de prata 1%; CR1, pomada de *C. urucurana* 5%; CR2, pomada de *C. urucurana* 10%. Os dados são representados como média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas  $p < 0,05$  (teste Kruskal-Wallis).

Num estudo confirmou-se que possuem ação imunomoduladora, ou seja, por apresentar a capacidade de inibir as células Th1 como a expressão de IFN- $\gamma$  e IL-2 que também foram avaliadas neste estudo (ORSATTI et al., 2010; MARQUES et al., 2015) Considera-se também que a produção da IFN- $\gamma$  e IL-2 no dia 7<sup>o</sup> de nosso tratamento foi devido à ausência da IL-10, pois o efeito principal da IL-10 é inibir a síntese de outras citocinas Th1, como o IFN- $\gamma$  e IL-2 facilitando o desenvolvimento de respostas Th2 (VARELA et al., 2001).

No entanto, as propriedades de *C. urucurana* evidenciam a ação positiva do tratamento com a pomada a base de extrato das cascas de *C. urucurana* 5% e 10% em camundongos *knockout* IL-10. Observa-se que os animais tratados com o controle positivo (SS) mostraram no dia 14<sup>o</sup> um incremento no padrão de resposta Th2 (IFN- $\gamma$ )

e Th17A. A IL-17A foi descrita na resposta imune da fase aguda da inflamação além de induzir citocinas pró-inflamatórias (MAI et al. 2010; SLYEPCHENKO et al., 2016). O tratamento com a sulfadiazina de prata ainda apresentava valores superiores no final do tratamento. Em general, a IL-17A e IFN- $\gamma$  prolongou-se no grupo SS (sulfadiazina de prata) durante a fase inflamatória. Evidências sugerem que células Th17A desempenham um papel importante na patogênese da doença inflamatória na pele de camundongos (MAI et al., 2010).

Citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-6 e IL-10 também foram avaliadas, estão relacionadas ao perfil de resposta Th2 favorecendo a produção de anticorpos (SLYEPCHENKO et al., 2016). Os animais com tratamento CR1 e CR2 demonstraram níveis altos de IL-4 no dia 7<sup>o</sup>, em comparação aos demais grupos ( $P < 0,05$ ). No dia 14, a liberação de IL-10 foi significativamente maior no grupo SALC57 em comparação com os outros grupos (Figura 17). O aumento da IL-6 não apresentou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

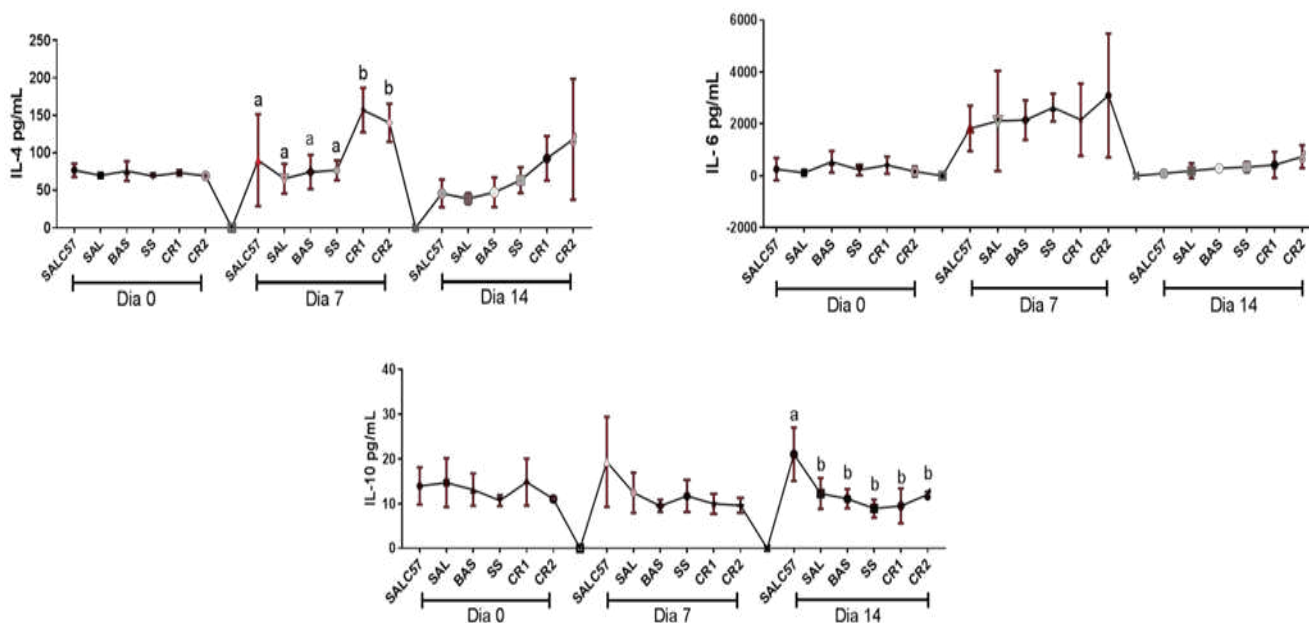


Figura 16. Citocinas IL-4, IL-6 e IL-10 relacionadas ao perfil de resposta Th2 (Anti- Inflamatórias) nos dias 0<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, e 14<sup>o</sup> de camundongos C57 selvagens e camundongos *knockout* IL-10 (a). Grupo SALC57: C57 selvagem solução salina 0,9 %. Grupos *knockout* IL-10: SAL, solução salina 0,9%; BAS, pomada de polietilenoglicol; SS, sulfadiazina de prata 1%; CR1, pomada de *C. urucurana* 5%; CR2, pomada de *C. urucurana* 10%. Os dados são representados como média  $\pm$  DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas  $p < 0,05$  (teste Kruskal-Wallis).

O recrutamento destas células para a ferida desempenha um papel importante.

A IL-4, por exemplo, intervém na ativação de mastócitos, promove retroalimentação

positiva para a via Th2, além de suprimir a via Th1 (OPAL et al., 2000; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Estudos com modelo animal *knockout* IL-10 na inflamação intestinal crônica, apresentaram diminuição da produção de IL-4. (DIELEMAN et al., 1998).

Autores sugerem que compostos presentes em plantas exercem atividades imunoestimulante envolvidos no fortalecimento do sistema imunológico atribuída à presença de flavonoides, taninos e alcalóides (MARQUES et al., 2015). Tal fato sugere, que *C.urucurana* também poderia apresentar atividades imunomoduladoras, pois esta atividade tem sido relatada em plantas medicinais (MARQUES et al., 2015). Cordeiro et al. (2016), mostraram que o extrato metanólico das cascas de *Croton urucurana* testada em diferentes doses, pode envolver a redução do efeito nociceptivo (dor) causado pelas citocinas. Produtos naturais podem desempenhar um papel importante neste sentido, na estimulação da proliferação celular, indução da síntese de colágeno e melhora da resposta imune inata da ferida (BUENO et al., 2014).

## 2.3 CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível confirmar a atividade cicatrizante das formulações 5% e 10% a base de extrato da casca de *Croton urucurana* num efeito dose-resposta em modelo animal *knockout* IL-10. Compostos polifenólicos principalmente proantocianidinas atuaram no processo da cicatrização, pois foram relacionadas a seu potencial farmacológico como anti-inflamatório e antibacteriano. Além disso, dados mostraram que *C. urucurana* poderia estimular atividades imunoreguladoras devido à presença de flavonóides, mas se precisam estudos que confirmam esta atividade.

Nossas descobertas fornecem o uso e conhecimento de plantas medicinais utilizadas nas comunidades tradicionais VS o conhecimento científico. Portanto, Atividades biológicas *in vivo* de *C.urucurana* na forma de fitoterápico pode-se desenvolver na indústria farmacêutica.

## 2.4 REFERÊNCIAS

- ALVES, I. A. B. D.; dos SANTOS, S. M.; MENDES, R. F. V.; DA SILVA, J. W.; RODRIGUES, M. F.; RAMOS, B. A.; DA SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. D.; TENÓRIO, F. D. A. M.; JORGE, R. J. B.; MARTINS, R. D.; ALBUQUERQUE, J. F. C.; RANDAU, K. P. & Ximenes, R. M. Chemical composition, antioxidant and topical antiinflammatory activities of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11, n. 2, pp. 22-33, 2017.
- AMORIM, J. L.; FIGUEIREDO, J. D. B.; AMARAL, A. C. F.; BARROS, E. G. D. O.; PALMERO, C.; MPALANTINOS, M. A.; RAMOS, A. D. S.; FERREIRA, J. L. P.; SILVA, J. R. D. A.; BENJAMIM, C. F.; BASSO, S. L.; NASCIUTTI, L. E. AND FERNANDES, P. D. Wound healing properties of *Copaifera paupera* in diabetic mice. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, e0187380, 2017.
- ARMSTRONG, D. G. & JUDE, E. B. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 92, p. 12-18, 2002.
- BETTELLI, E.; DAS, M. P.; HOWARD, E. D.; WEINER, H. L.; SOBEL, R. A., & KUCHROO, V. K. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10-and IL-4-deficient and transgenic mice. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 7, p. 3299-3306, 1998.
- BUENO, F. G.; PANIZZON, G. P.; DE LEITE MELLO, E. V. S.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; DE MELLO, J. C. P., & HENSEL, A. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. **Fitoterapia**, v. 99, p. 252-260, 2014.
- CAETANO, C. P.; RAMALHO, L. S, FERRAZ, M. L. F.; CAVELLANI, C. L.; TEIXEIRA, V. P. A. & OLIVEIRA, L. F. Quantification of mast cells in the skin of elderly autopsied. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 32, n. 2, p. 130-133, 2014
- CAMPOS, A. C. L.; ALESSANDRA, B. B.; ANNE, K. G. Wound healing. **Arquivos Brasileiros de cirurgia digestiva**. Artigo de revisão, v. 20, n. 1, p. 51-8, 2007.
- CORDEIRO, K. W.; FELIPE, J. L.; MALANGE, K. F.; DO PRADO, P. R.; FIGUEIREDO, P. O.; GARCEZ F. R.; FREITAS, K. C.; GARCEZ, W. S. & TOFFOLI-KADRI, M. C. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. **Journal Ethnopharmacol**, v. 183, p. 128 – 135, 2016.
- DAWID-PAC, R. Medicinal plants used in treatment of inflammatory skin diseases. **Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii I Alergologii**, v. 30, n. 3, p. 170, 2013.
- DEMIDOVA-RICE, T. N.; HAMBLIN, M. R. & HERMAN, I. M. Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 25, n. 7, p. 304–314, 2012.
- DIELEMAN, L. A.; PALMEN, M. J. H. J.; AKOL, H.; BLOEMENA, E.; PEÑA, A. S. MEUWISSEN, S. G. M. & VAN REES, E. P. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 114, n. 3, p. 385–391, 1998.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 514-525, 2007.

ESMERALDINO, L. E.; SOUZA, A. M. & SAMPAIO, S. V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**, v. 8, p. 570-576, 2005.

FISHER, N. M.; ELIZABETH, M. AND ROSSITZA, L. "Scar-localized argyria secondary to silver sulfadiazine cream. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, n. 4, p. 730-732, 2003.

FRONZA, M.; CAETANO, G. F.; LEITE, M. N.; BITENCOURT, C. S.; PAULA-SILVA, F. W. G.; ANDRADE, T. A. M.; FRADE, M. A. C.; MERFORT, I. AND FACCIOLI, L. H. Hyaluronidase Modulates Inflammatory Response and Accelerates the Cutaneous Wound Healing. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, e112297, 2014.

GANESHKUMAR, M.; PONRASU, T.; KRITHIKA, R.; IYAPPAN, K.; GAYATHRI, V. S. & SUGUNA, L. Topical application of *Acalypha indica* accelerates rat cutaneous wound healing by up-regulating the expression of Type I and III collagen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 14-2226, 2012.

GINDRI, A, L.; SOUZA, L. B. & ATHAYDE, M. L. caracterização botânica da urtiga-brava: estudos farmacológicos e químicos. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, v. 14, n. 1, p. 125-136, 2013.

GONÇALVES, R. V., MEZÊNCIO, J. M. S., BENEVIDES, G. P., MATTA, S. L. P., NEVES, C. A., SARANDY, M. M., & VILELA, E. F. Effect of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser and healing ointment on cutaneous wound healing in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n.4, p. 350-355, 2010.

GONÇALVES, R. V.; NOVAES, R. D.; CUPERTINO, M. C.; ARAÚJO, B. M.; VILELA, E. F.; MACHADO, A. T.; LEITE, J. P.V. & MATTA, S. L. P. *Bathysa cuspidata* Extract Modulates the Morphological Reorganization of the Scar Tissue and Accelerates Skin Wound Healing in Rats: A Time-Dependent Study. **Cells Tissues Organs**, v. 199, p. 266–277, 2014.

GONÇALVES, R. V.; NOVAES, R. D.; SARANDY, M. M.; DAMASCENO, E. M.; DA MATTA, S. L. P.; DE GOUVEIA, N. M. & ESPINDOLA, F. S. 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone enhances wound healing in diabetic rats. **Life Sciences**, v. 152, p. 67–75, 2016.

GREAVES, N. S.; ASHCROFT, K. J.; BAGUNEID, M. & BAYAT, A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, n. 3, p. 206-217, 2013.

GUO, S. & DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, v. 89, n. 3, p. 219–229, 2010.

GUPTA, D.; BLEALEY, B. & GUPTA, R. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, p.338-361, 2008.

JAISWAL, R.; JAYASINGHE, L.; KUHNERT, N. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the Rhododendron genus (Ericaceae) by tandem LC-MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 4, p. 502-515, 2012.

JÄRBRINK, K.; NI, G.; SÖNNERGREN, H.; SCHMIDTCHEN, A.; PANG, C.; BAJPAI, R.; & CAR, J. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. **Systematic reviews**, v. 5, n. 1, p. 152, 2016.

LI, J.; YAN-PING Z. AND ROBERT S. KIRSNER. Angiogenesis in Wound Repair: Angiogenic Growth Factors and the Extracellular Matrix. **Microscopy research and technique**, v. 60, n. 1, p. 107-114, 2003.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W. & KANG, S. S. (Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of pharmacological sciences**, v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004.

LANIA, B. G.; MORARI, J.; SOUZA, A. L. D.; SILVA, M. N. D.; DE ALMEIDA, A. R.; VEIRA-DAMIANI, G.; ALEGRE, S. M.; CÉSAR, C. L.; VELLOSO, L. A.; CINTRA, M. L.; MAIA, N. B. & VELHO, P. E. N. F. Topical use and systemic action of green and roasted coffee oils and ground oils in a cutaneous incision model in rats (*Rattus norvegicus albinus*). **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, e0188779, 2017.

LECLERE, M.; DESNOYERS, M.; BEAUCHAMP, G. & LAVOIE, J. P. Comparison of Four Staining Methods for Detection of Mast Cells in Equine Bronchoalveolar Lavage Fluid. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 377-381, 2006.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. Atheneu: São Paulo. 328 p. 2009. LEITE, J. P. V. Desenvolvimento da fitoterapia. In: *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. Atheneu: São Paulo. p. 3-20, 2009.

LENZEN, H.; LÜNNEMANN, M.; BLEICH, A.; MANNS, M. P.; SEIDLER, U. & JÖRNS, A. Downregulation of the NHE3-Binding PDZ-Adaptor Protein PDZK1 Expression during Cytokine-Induced Inflammation in Interleukin-10-Deficient Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, e40657, 2012.

LOPES, T. V.; FÉLIX, S. R.; SCHONS, S. V. & NOBRE, M. O. Dragon's blood (*Croton lechleri* Mull., Arg.): an update on the chemical composition and medical applications of this natural plant extract. A review. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 7, n. 2, p.167-191, 2013.

LV, Q.; LUO, F.; ZHAO, X.; LIU, Y; HU, G.; SUN, C. XIAN, L. Identification of Proanthocyanidins from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Pulp by LC-ESI-Q-TOF-MS and Their Antioxidant Activity. **PLoS ONE**, v.10, n. 3, e0120480, 2015.

MACHADO, L. C. S.; PFRIMER, H. I. A. & MAGALHÃES, M. R. Cicatrização de feridas induzidas por peçonha de bothrops moojeni pelo extrato de *Croton urucurana*. **Estudos**, v. 42, n. 4, p. 597-611, 2015.

MAI, J.; WANG, H. & YANG, X. F. T helper 17 cells interplay with CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs in regulation of inflammations and autoimmune diseases. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, v. 15, p. 986, 2010.

MARQUES, G. S.; SILVA, C. C. D. A. R.; VILELA, W. T.; FIGUEIRÊDO, C. B. M.; SILVA, A. C. A. F.; SILVA, R. M. F. & NETO, P. J. R. Plantas medicinais como alternativa terapêutica

para aumento da resistência imunológica. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, 2015.

MATHEW, JESSY E.; SRINIVASAN, VACHALA K.K.; DINAKARAN, ALEX JOSEPH. Mast cell stabilizing effects of *Sphaeranthus indicus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, 394-396, 2009.

MELCHOR, G.; ARMENTEROS, M.; FERNANDEZ, O.; LINARES, E.; FRAGAS, I. Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* Bark. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 689-691, 2001.

MESQUITA JÚNIOR, D., ARAÚJO, J. A. P., CATELAN, T. T. T., SOUZA, A. W. S. D., CRUVINEL, W. D. M., ANDRADE, L. E. C., & SILVA, N. P. D. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

NAMJOYAN, F.; KIASHI, F.; MOOSAVI, Z. B.; SAFFARI, F.; MAKHMALZADEH, B. S. Efficacy of Dragon's blood cream on wound healing: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 6, n. 1, p. 37-40, 2016.

NOVAES, R.; CUPERTINO, M.; SARANDY, M.; SOUZA, A.; SOARES, E.; GONÇALVES, R. Time-Dependent Resolution of Collagen Deposition During Skin Repair in Rats: A Correlative Morphological and Biochemical Study. **Microscopy and Microanalysis**, v. 21, p. 1482-1490, 2015.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, 2011.

OPAL, STEVEN M.; DEPALO, VERA A. Anti-inflammatory cytokines. **Journal Chest**, v. 117, n. 4, p. 1162-1172, 2000.

ORSATTI, C. L.; MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A. C. & SFORCIN, J. M. Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 314-318, 2010.

PERES, M. T. L. P., MONACHE, F. D., PIZZOLATTI, M. G., SANTOS, A. R., BEIRITH, A., CALIXTO, J. B., & YUNES, R. A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmacological criteria used in their isolation. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 3, p. 209-211, 1998.

PIETERS, L.; DE BRUYNE, T.; CLAEYS, M.; VLIETINCK, A.; CALOMME, M. & VANDEN B. D. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South American dragon's blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 899-906, 1993.

PRISTO, LL. V. DE M. O. & DIAS, R. V. C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2013.

RAO, V. S.; GURGEL, L. A., LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; MARTINS, D. T. O.; CECHINELFILHO, V. & SANTOS, F. A. Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 357-360, 2007.

RODRIGUES, D. F.; MENDES, F. F.; NORONHA FILHO, A. D. F.; SILVA, J. A. D. & SILVA, L. A. F. D. O extrato da casca de barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (martius) coville,

na cicatrização de feridas em animais. Enciclopédia biosfera, **Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v. 9, n.16, p.1583, 2013.

SAID, R. B.; HAMED, A. I.; MAHALEL, U. A.; AL-AYED, A.; SULAIMAN, M.; KOWALCZYK, J.; MOLDOCH, W.; OLESZEK and ANNA S. Tentative Characterization of Polyphenolic Compounds in the Male Flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and DFT. **Journal**. v. 18, n. 3, 2017.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. & NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SARANDY, M. M.; NOVAES, R. D.; XAVIER, A. A.; VITAL, C. E.; LEITE, J. P. V.; FABIANA, C. S. A. M. & GONÇALVES, R. V. Corresponding author 5Hydroethanolic Extract of *Strychnos pseudoquina* Accelerates Skin Wound Healing by Modulating the Oxidative Status and Microstructural Reorganization of Scar Tissue in Experimental Type I Diabetes. **Journal List BioMed Research International**, 2017.

SCALON, S. P. Q.; KODAMA, F. M.; SCALON FILHO, H. & MUSSURY, R. M. Crescimento inicial de mudas de sangra-d'água (*Croton urucurana* Baill.) sob sombreamento e aplicação de giberelina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, p. 61-66, 2008.

SCHOFIELD, P.; PELL, A.N.; MBUGUA, D.M. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p.21-40, 2001.

SHAPIRA, S.; BEN-AMOTZ, O.; SHER, O.; KAZANOV, D.; MASHIAH, J.; KRAUS, S.; GUR, E. & ARBER, N. Delayed Wound Healing in Heat Stable Antigen (HSA/CD24)-Deficient Mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, e0139787, 2015.

SILVA, F.M.A. D.; KOOLEN, H.H.F.; ALMEIDA, R.A.; DE SOUZA, A.D.L.; PINHEIRO, M.L.B.P.; COSTA, E.V. Dereplication of aporphine and oxoaporphine alkaloids from *Unonopsis guatterrioides* by ESI-IT-MS. **Química Nova**, v.35, n.5, p. 944-947, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; & PETROCICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis, v. 6, n. 1, p. 1102, 2010.

SLYEPCHENKO, A., MAES, M., KÖHLER, C. A., ANDERSON, G., QUEVEDO, J., ALVES, G. S. & CARVALHO, A. F. T helper 17 cells may drive neuroprogression in major depressive disorder: proposal of an integrative model. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 64, p. 83-100, 2016.

TALA, V. R. S.; VIVIANE, C. DA SILVA.; CLENILSON, M. R.; AUGUSTIN, E. N.; LOURDES, C. DOS SANTOS and WAGNE,R VILEGAS.Characterization of Proanthocyanidins from *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don. (Fabaceae) by Flow Injection Analysis — Electrospray Ionization Ion Trap Tandem Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2803-2820, 2013.

TANG, J.; LIU, H.; GAO, C.; MU, L.; YANG, S.; RONG, M.; LAI, R. A small peptide with potential ability to promote wound healing. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

UMAIR, M.; ALTAF, M. & ABBASI, A. M. An ethnobotanical survey of indigenous medicinal plants in Hafizabad district, Punjab-Pakistan. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, e0177912, 2017.

VALERO, C.; JAVIERRE, E.; GARCÍA-AZNAR, J. M. & GÓMEZ-BENITO, M. J. A Cell-Regulatory Mechanism Involving Feedback between Contraction and Tissue Formation Guides Wound Healing Progression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, e92774, 2014.

VARELLA, P. P., & FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.

VELNAR, T.; BAILEY, T. & SMRKOLJ, V. The wound healing Process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. **The journal of internacional medical research**, v. 37, p. 1528-1542, 2009.

KRYSTEL-WHITTEMORE, M.; KOTTARAPPAT N. D.; JOHN, G. W. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 620, 2016.

WHO. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023.<  
<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201en/s21201en.pdf>> Acessado em: 20 Dz. 2017.

YAN, R.; WANG, W.; GUO, J.; LIU, H.; ZHANG, J.; YANG, B. Studies on the Alkaloids of the Bark of *Magnolia officinalis*: Isolation and On-line Analysis by HPLC-ESI-MSn. **Molecules** v. 18, p. 7739-7750, 2013.