

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DANIELLE CRISTINE GOMES FRANCO

**EFEITO CICATRIZANTE, ANTI-INFLAMATÓRIO E ANALGÉSICO
DE *Platonia insignis* (Mart.)**

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra

São Luís,
2018

DANIELLE CRISTINE GOMES FRANCO

**EFEITO CICATRIZANTE, ANTI-INFLAMATÓRIO E ANALGÉSICO
DE *Platonia insignis* (Mart.)**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

São Luís,
2018

Cristine Gomes Franco, Danielle

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO, CICATRIZANTE E ANALGÉSICO DE PLATONIA INSIGNIS MART.
Danielle Cristine Gomes Franco. - 2018 .

66 f.

Orientador (a): Rosane Nassar Meireles Guerra.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas.
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018 .

1. Cicatrização. 2. Inflamação. 3. Analgesia
4. Platonia insignis. I Guerra, Rosane N.M. II.
Título.

DANIELLE CRISTINE GOMES FRANCO

**EFEITO CICATRIZANTE, ANTI-INFLAMATÓRIO E ANALGÉSICO
DE *Platonia insignis* (Mart.)**

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr^a Rosane Nassar Meireles Guerra (Orientadora)

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Ms. Jefferson Mesquita Brito (Examinador)

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Anderson França da Silva (Examinador)

Universidade Federal do Maranhão

*À Deus pelo dom da vida.
Aos meus pais, Daniel Franco e Rosilene Gomes, por não medirem esforços para
tornar os meus sonhos realidade.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades que me proporciona, pela força para superar os desafios e por me guardar e cuidar sempre.

À minha família amada, pelo berço caloroso de apoio e amor.

Aos meus pais, Daniel e Rosilene, pelo amor, compreensão e apoio incondicional. Aos meus irmãos, Ana e Lucas, pelo carinho e nossos inquebráveis laços sanguíneos.

A Jefferson Orlam, por todo amor, companheirismo e pelas palavras de encorajamento.

À minhas amigas, Edna Léger e Rafaella Ferraz, pela preciosa amizade e por estarem sempre disponíveis nos bons e maus momentos.

À Prof^a. Dr^a. Rosane Nassar Meireles Guerra, a grande responsável por este trabalho, pela generosa orientação, pela acolhida, pelos conhecimentos compartilhados, apoio e por ser um exemplo de pessoa e profissional.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Vitor Augusto e Alex Brall, pela dedicação, persistência e momentos de dificuldades e descontração.

A todos os componentes do Laboratório de Imunofisiologia, Aluízio, Anderson, Arthur, Andréia, André, Douglas, Jhonny, Luana, Carlene, Regis, Elizangela, Liana, Mirtes e Sulayne pela parceria nos experimentos e transmissão de conhecimento.

À Dona Ju, pelo carinho e café no LIF.

À FAPEMA, pelo apoio financeiro

À minha igreja Assembleia de Deus Nova Esperança, pelos momentos de comunhão e orações.

A todos os animais utilizados nessa pesquisa.

Enfim, obrigada a todos!

A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.

Galileu Galilei

RESUMO

Platonia insignis (Mart), família Clusiaceae, popularmente conhecida como bacuri, é espécie nativa do Brasil. O óleo extraído das sementes é utilizado pela população como cicatrizante e anti-inflamatório e na produção de sabão. Este trabalho avaliou o efeito cicatrizante, anti-inflamatório e analgésico do extrato hidroetanólico das folhas de *P. insignis* Mart (EHPI). Nos ensaios de cicatrização foram utilizados 10 camundongos Swiss fêmeas (n=5/grupo) com 2-3 meses, e peso médio de 25 ± 2 g, animais tratados com EHPI (5mg/Kg), via oral, durante 14 dias, foram comparados ao grupo controle que recebeu água. A ação anti-nociceptiva foi avaliada por *Tail flick* em 15 camundongos Swiss fêmeas, distribuídos em três grupos: Controle: recebeu PBS via oral; Bacuri: recebeu EHPI (5mg/Kg) via oral, e Morfina: recebeu a droga via intraperitoneal. (10mg/Kg). O efeito anti-inflamatório foi avaliado pela indução de edema de pata por BCG e desafio com PPD. O EHPI não afetou o processo de cicatrização, mas apresentou atividade anti-nociceptiva semelhante a morfina nos intervalos de 60 e 120 minutos, sugerindo uma ação analgésica central. O Tratamento com EHPI também estimulou o recrutamento celular no sangue, baço e peritônio. Na inflamação induzida por BCG, o EHPI inibiu a resposta inflamatória de fase crônica, após o desafio com o PPD, e adicionalmente houve aumento no recrutamento celular no linfonodo poplíteo e no peritônio, estimulou a ativação de neutrófilos sanguíneos e a migração de linfócitos T CD4+ e CD8+ no peritônio. Em conjunto os resultados mostram que o extrato hidroetanólico das folhas de *P. insignis* possui importante ação analgésica e o efeito anti-inflamatório observado na fase crônica, sugere ação imunomoduladora, apesar da baixa atividade cicatrizante.

Palavras chave: Bacuri, inflamação, nocicepção, BCG, imunomodulação

ABSTRACT

Platonia insignis Mart. (Clusiaceae), commonly known as bacuri, is Brazilian native species. The oil extracted from the seeds is popularly used as healing and anti-inflammatory. We aimed to investigate the healing, anti-inflammatory, and analgesic effect of hydroalcoholic extract of the leaves of *P. insignis* (EHPI). To evaluate healing 10 Swiss female mice (n = 5/group) with 2-3 months, and an average weight of 25 ± 2 g, were treated with EHPI (5 mg/Kg), orally, during 14 days, and compared to a control group that received water. The anti-nociceptive effect was evaluated by Tail flick in 15 female Swiss mice, distributed in three group: control: received PBS; Bacuri: received EHPI (5 mg/Kg) oral, and morphine: received the drug via ip. (10 mg/Kg). The anti-inflammatory effect was assessed by induction of paw edema by BCG followed by PPD challenge. The EHPI didn't affect the healing process, but presented an anti-nociceptive activity similar to morphine, mainly after 60 and 120 minutes. Treatment with EHPI also stimulated cell recruitment in the blood, spleen, and peritoneum. In BCG-induced inflammation, the EHPI inhibited the inflammatory response at the chronic phase, after the challenge with the PPD, and simultaneously increased the cell recruitment in popliteal lymph node and peritoneum, stimulated the blood neutrophil activation and the migration of TCD4 + and TCD8 + lymphocytes to the peritoneum. Together the results show that the hydroalcoholic extract of the leaves of *p. insignis* has significant analgesic and anti-inflammatory effect in the chronic phase possibly due to an immunomodulatory effect, despite the low healing activity.

Keywords: Bacuri, anti-inflammatory, anti-nociceptive, BCG, immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da espécie vegetal <i>Platonia insignis</i> (Mart.). Localizada na Chapada das Mesas, Carolina (Maranhão).....	25
Figura 2. Ilustração das Folhas e Flores (A), Caule (B), Fruto e semente (C) da espécie <i>Platonia insignis</i> (Mart).....	27
Figura 3. Desenho esquemático demonstrando o local da lesão na região dorsal do toráx do camundongo.....	31
Figura 4. Organograma de divisão de grupos experimentais na cicatrização.....	32
Figura 5. Efeitos da administração oral do extrato hidroetanólico de <i>Platonia insignis</i> Mart. sobre ferida induzida por excisão de pele.....	37
Figura 6: Contagem total de células no sangue (A), no baço (B) e no peritônio (C).	38
Figura 7: Efeitos da administração oral do extrato hidroetanólico de <i>Platonia insignis</i> , sobre o edema de pata ocasionado por BCG.....	39
Figura 8. Contagem total e diferencial das células do sangue no experimento induzido por BCG.....	40
Figura 9. Número total das células do linfonodo poplíteo (A) e do baço (B).....	41
Figura 10: Efeito do EHPI nas populações de linfócitos (A) e macrófagos (B) no linfonodo poplíteo.....	42
Figura 11: Efeito do tratamento com EHPI na população de linfócitos T (A) e macrófagos no peritônio (B).....	43
Figura 12: Efeito do tratamento com EHPI sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	44
Figura 13: Efeito do extrato hidroetanólico de <i>P. insignis</i> na percepção dolorosa..	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constituintes isolados e identificados na espécie <i>P. insignis</i> (MART).....	29
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APED	Associação Portuguesa para Estudos da Dor
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CBA	Cytometric Bead Array
DHR	Dihidro-rodamina
DL50	Dose necessária para matar 50% de uma população em teste
EHPI	Extrato hidroetanólico de <i>P. insignis</i>
ERO	Espécie reativa de Oxigênio
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
IGF	Fator de Crescimento Insulin-like
IL	Interleucina
KGF	Fator de Crescimento de Queratinócitos
LPS	Lipopolissacarídeos
MAF	Fator de Ativação de Macrófagos
MIF	Fator de Ativação de Migração
MIP	Proteína inflamatória para Macrófago
MPE	Efeito Máximo Possível
NMDA	N- metil- D- aspartato
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com Fosfato
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PKC	Proteína quinase C
PMA	Miristato de forbol acetato – <i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PPD	Derivado Proteico Purificado
TG1	-1,3-diestearil-2-oleil-glicerol
TGF- α	Fator de crescimento transformador Alfa
TGF- β	Fator de crescimento transformador Beta
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
μL	microlitros
Aδ	A delta
cm	centímetros
kg	quilogramas
mg	miligramas
mL	mililitros
πR^2	área da circunferência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de cicatrização.....	16
1.1.1 Fase inflamatória.....	16
1.1.2 Fase Proliferativa.....	18
1.1.3 Fase de remodelamento do tecido.....	20
1.2 Inflamação induzida por BCG.....	20
1.3 Dor como fator de interferência na cicatrização.....	22
1.4 Uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica.....	23
1.5 Potencial terapêutico da espécie <i>Platonia insignis</i> Mart.....	24
1.5.1 Taxonomia e características botânico geográficas.....	24
1.5.2 Composição química e potencial biológico da espécie <i>Platonia insignis</i> Mart.....	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Animais.....	31
3.2 Material vegetal.....	31
3.3 Preparação do extrato hidroetanólico das folhas <i>Platonia insignis</i> Mart. (EHPI).....	32
3.4 Avaliação do efeito na cicatrização	32
3.5 Indução da lesão e avaliação do modelo de cicatrização.....	33
3.6 Obtenção de suspensões celulares.....	34
3.6.1 Peritônio.....	34
3.6.2 Baço.....	34
3.6.3 Sangue.....	34
3.7 Contagem diferencial de células do Sangue, Baço e Peritônio.....	35
3.8 Modelo de inflamação induzida por BCG/PPD.....	35
3.9 Quantificação da produção de peróxido de hidrogênio.....	35

3.10	Imunofenotipagem de linfócitos e macrófagos.....	36
3.11	Teste da latência para o reflexo de retirada da cauda (“tail-flick”)..	36
3.12	Análise estatística.....	37
4.	RESULTADO.....	38
4.1	Avaliação macroscópica das feridas.....	38
4.2	Efeito do EHPI nas populações celulares do peritônio, baço e sangue	40
4.3	Avaliação do efeito da reação inflamatória induzida por BCG.....	41
4.4	O EHPI afeta a migração de neutrófilos e linfócitos sanguíneos.....	42
4.5	O EHPI aumentou a celularidade do poplíteo, mas não teve efeito no baço.....	43
4.6	Efeito do EHPI no poplíteo não está associado a população de linfócitos ou macrófagos.....	44
4.7	EHPI aumentou o número de linfócitos no peritônio.....	45
4.8	Avaliação da produção de peróxido no peritônio.....	46
4.9	Efeito anti-nociceptivo do EHPI, segundo Teste <i>Tail-Flick</i>	46
5.	DISCUSSÃO.....	48
6.	CONCLUSÃO	52
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
8.	REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de cicatrização

O processo de Cicatrização pode ser observado em lesões teciduais traumáticas ou necróticas, onde ocorre a substituição por um tecido conjuntivo vascularizado. Esse processo tem como finalidade a homeostasia do tecido lesionado. (PANOBIANCO et al., 2012; CAVALCANTE et al., 2012).

De acordo com Diccini (2009), 30% da população adulta apresentará lesão cutânea aguda e precisará utilizar algum tratamento para reduzir ou sanar com a área lesionada. Conhecer este mecanismo facilita a produção de fármacos para intervir em fatores que possam interferir na cicatrização, sendo possível a promoção da homeostase e bem-estar do indivíduo que apresenta lesões.

A sequência de eventos que ocorrerão depende da profundidade da lesão, em feridas superficiais, onde a área lesada foi somente a epiderme, a cicatrização ocorrerá apenas com a reepitelização. Em feridas parciais e feridas de espessura total, onde áreas como a derme ou toda a camada cutânea são prejudicadas, necessitam de um processo mais complexo para restaurar a área lesionada (IRION, 2005).

Para melhor compreensão os mecanismos envolvidos no processo de cicatrização foram tradicionalmente dividido em três fases, denominadas de inflamação, proliferação e remodelamento (BROUGHTON et al., 2006). Essas fases não ocorrem isoladamente, trata-se de uma sequência de eventos celulares, teciduais e bioquímicos organizados para reestabelecer o tecido após a injúria.

1.1.1 Fase Inflamatória

A atividade plaquetária e a cascata de coagulação são responsáveis em promover uma vasoconstrição imediata na área da lesão, pois as plaquetas, hemácias e a fibrina, presentes na circulação formam os coágulos, constituirão o primeiro tampão, pois funcionam como uma barreira impermeabilizante

(BLANES, 2004). Essa fase é caracterizada pelos sinais clássicos da inflamação como dor, calor, rubor e edema, e, em geral, ocorre entre 24 e 72 horas.

O aumento na produção de mediadores químicos, resultantes da intensa atividade plaquetária e da migração de mastócitos resulta em vasodilatação e na quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos, células que atuarão na remoção de células mortas e na produção de mediadores responsáveis pela remodelação dos tecidos (BRANDÃO; SANTOS, 2006; GEOVANINI; OLIVEIRA JUNIOR; PALERMO, 2007; SILVA; FIGUEIREDO; MEIRELES, 2007).

As plaquetas presentes no local produzem o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), com potente ação quimiotática sobre macrófagos, neutrófilos e fibroblastos. Além disso, o aumento na produção de TGF- β pelas plaquetas, também terá efeito quimiotático para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, além de atuar na angiogênese, durante a fase de remodelamento. (WERNER, GROSE, 2003).

Os neutrófilos chegam ao local da lesão/inflamação devido ao aumento na liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que também exercerá atividade quimiotática sobre macrófagos, neutrófilos e fibroblastos. Os neutrófilos, por serem produtores de proteases e espécies reativas de oxigênio (EROs), estão envolvidos na formação dos novos tecidos, e ainda, por produzirem fatores de crescimento e citocinas, vão auxiliar na recuperação da área lesionada (MOLLÍNEDO et al., 1999).

As proteínas inflamatórias de macrófagos (MIPs) são quimiocinas que atuam no reparo tecidual durante os sete primeiros dias, recrutando macrófagos, (GILLITZER et al., 2001). Em estudos com camundongos realizados por Di Pietro et al., (1998) observou-se que a perda de MIP-1, reduz a angiogênese, devido a redução na migração de macrófagos a área afetada.

Outras citocinas inflamatórias são produzidas por macrófagos e monócitos ativados após o trauma tais como: interleucina 1(IL-1), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Essas citocinas estão associadas aos principais sintomas decorrentes das lesões e/ou traumas. Na resposta aguda o aumento de TNF- α ativa células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, aumentando assim o recrutamento de leucócitos na área da lesão. (SOMMER C; WHITE F, 2010).

Aproximadamente, entre seis a sete dias após a lesão, a quantidade de linfócitos que aparece na ferida é reduzida e embora o papel dos linfócitos na cicatrização não esteja bem definido, são as citocinas produzidas por estas células que vão ativar macrófagos e contribuir para remodelação tissular e subsequente fechamento da lesão. Adicionalmente, como estimulam macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, podem afetar os estágios iniciais da cicatrização (NETO, 2003; OLIVEIRA et al., 2015).

1.1.2 Fase Proliferativa

A fase proliferativa é caracterizada pela reparação do tecido conjuntivo, onde ocorre a formação do tecido de granulação, com proliferação endotelial e de fibroblastos. O tecido de granulação é composto por um leito capilar, fibroblasto, macrófagos, arranjo frouxo de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico. Essa fase tem início no 3º dia após a lesão, perdurando por duas a três semanas. Divide-se em três eventos importantes posteriores a fase inflamatória: angiogênese, fibroplasia e epitelização (SARANDY, 2007).

Na angiogênese ocorre a formação de novos vasos sanguíneos devido ao aumento no suprimento sanguíneo de fibroblastos, células responsáveis pela síntese de colágeno. Mediadores químicos (TNF- α , TGF- β , VEGF, FGF, PDGF) derivados de plaquetas, macrófagos e células endoteliais danificadas, regulam os eventos da angiogênese. O aumento na produção de bradicinina e de prostaglandinas produzidas por macrófagos ativados, estimula a migração e a mitose de células endoteliais (SCHUGART et al., 2008; RAJA et al., 2007).

A angiogênese é responsável pela nutrição dos tecidos e aumento do aporte de células como macrófagos e fibroblastos. Assim, ambiente metabólico da lesão pode influenciar a formação dos vasos, pois em estado isquêmico, quando ocorre aumento de lactato, com diminuição do pH e do oxigênio, ocorre também inibição da angiogênese. (WERNER; GROSE, 2003).

A angiogênese e a fibroplasia, vão compor o tecido de granulação responsável por cobrir a área lesionada (ROBSON et al., 2001).

A atração de fibroblastos provem de produtos derivados de plaquetas: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento insulín-like (IGF-1) e fator de crescimento epitelial. Macrófagos e fibroblastos liberam inúmeros fatores de crescimento e citocinas que contribuem para a migração de fibroblastos: fator de crescimento fibroblástico (FGF), IGF-1, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), IL-1, IL-2, IL-8, PDGF, fator de crescimento transformador- α e β (TGF- α , TGF- β) e TNF- α . Dentre todas essas substâncias, considera-se que PDGF possui maior potência como fator quimiotático e mitogênico para fibroblastos (WERNER; GROSE, 2003; EMING et al., 2007; SCHUGART et al., 2008).

Alguns fibroblastos residentes na ferida, adquirem características funcionais, estruturais e químicas diferenciadas, passando a se chamarem miofibroblastos. Os miofibroblastos são ricos em actina e miosina, proteínas responsáveis pela contração muscular, reduzindo a área de sangramento e facilitando o processo de epitelização (BALBINO et al., 2005; CAVENAGHI, 2004).

A epitelização se inicia já nas primeiras 24 e 36 horas, pois a produção de fatores de crescimento epidérmico, estimula a proliferação de células epiteliais. Essa restauração inicia precocemente no processo de cicatrização, porém não é perceptível até vários dias após a lesão. A epitelização é a etapa que levará o fechamento da lesão a partir do reestabelecimento da barreira externa, para minimizar as perdas de líquidos e as infecções (CARVALHO, 2002).

Durante a epitelização ocorre o espessamento da epiderme ao longo das bordas das feridas, acompanhado de uma maior migração de células, sobre a área de reparação do tecido. (ABLA; ISHIZUKA, 1995; VIEIRA et al., 2002).

O processo de epitelização é influenciado por sinalizações intercelulares, fatores de crescimento e condições metabólicas intrínsecas. A mitogênese é estimulada a partir da baixa tensão de oxigênio, e a produção TGF- β , responsável pela diferenciação e migração das células epiteliais. O TGF- β e o KGF (fator de crescimento de queratinócitos) estimulam diretamente a replicação celular, para completar os eventos da reepitelização (HUNT, 2006;

RAJA et al., 2007; WERNER; GROSE, 2003). Quando a reepitelização é estabelecida é formada uma nova membrana basal fechando a nova epiderme sobre a matriz e restabelecendo a barreira cutânea (MENDONÇA; COUTINHO, 2009).

1.2.3 Fase de Remodelação do tecido

A última e mais longa fase do processo de cicatrização. Representa a evolução da cicatriz já formada podendo durar anos. Nesta etapa ocorre a reorganização do colágeno, aumentando a resistência do tecido. O remodelamento envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno, diminuição da atividade celular e do núcleo de vasos sanguíneos, além da perda do núcleo dos fibroblastos, levando a maturação da cicatriz (NETO, 2003; VIEIRA et al., 2002). Apesar de haver um declínio nas células, ocorre um aumento na produção de colágeno tipo I. As fibras de colágeno se organizam paralelamente às linhas de tensão, formando feixes intercruzados, enquanto que as fibras dispostas de forma aleatória, são degradadas pela colagenase. (NETO, 2003; BALBINO et al., 2005; OLIVEIRA, 2008).

1.2 Inflamação induzida por BCG

A vacina BCG é constituída por uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* conhecido como bacilo *Calmette-Guérin*, utilizada na prevenção e controle da tuberculose humana e animal. É a única vacina disponível para e também a mais utilizada no mundo, dados apontam para uma estimativa de 3 bilhões de doses administradas/ano (COLDITZ et al. 1995).

A vacina BCG induz imunidade do tipo celular e o procedimento vacinal consiste na deleção do locus RD-1 do *M. bovis*, estimula a ativação dos linfócitos TCD4+ e TCD8+, via macrófagos apresentadores de antígenos, estimulando a produção de interferon-gama (IFN- γ) que corresponde a uma das citocinas fundamentais na resposta imune contra o MTB. A partir desse processo ocorre

a formação de células de memória que induzem a proteção no indivíduo (HERZMANN et al., 2015; DAVENNE; MCSHANE 2016).

A tuberculina é um produto obtido de um filtrado de cultivo de sete cepas selecionadas do *M. tuberculosis* esterilizado e concentrado. O filtrado é um líquido injetável límpido, incolor ou levemente amarelado. No Brasil, a tuberculina usada é o PPD (PPD – Purified Protein Derivatite) de procedência dinamarquesa (Statens Serum institut de Copenhague/Dinamarca), também conhecido como teste tuberculínico ou reação de Mantoux (LUNA, 2003).

A prova tuberculínica (PT) é um teste diagnóstico de ILTB (infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*) que se baseia em uma reação de hipersensibilidade cutânea após a aplicação do PPD por via intradérmica, em que a leitura é realizada 48 a 72 horas após a aplicação, podendo ser estendido até 96 horas (BRASIL, 2011). A PT demonstra uma reação de hipersensibilidade do organismo diante das proteínas do bacilo da tuberculose, após contato com o *M. tuberculosis*. O teste sofre interferência da vacinação BCG e de micobactérias não tuberculosas (MNT), mas não sensibiliza não infectados, mesmo que repetido várias vezes (LUNA, 2003). A inoculação do antígeno desencadeia uma reação do tipo antígeno-anticorpo, seguida de uma resposta dependente da reatividade celular de linfócitos T sensibilizados, que, após a reexposição às estruturas antigênicas do bacilo, tornam-se ativados e, conseqüentemente, expressam-se no local de aplicação da PT. Portanto, ao inocular as proteínas do *M. tuberculosis* na pele do indivíduo infectado, observam-se no infiltrado algumas células-chaves tais como linfócitos e monócitos, e polimorfos nucleares e granulócitos com predomínio de células T CD4 (SOLÉ, 2002).

Posteriormente há predominância de um aumento da permeabilidade vascular, com exsudação de fluídos, gerando um edema local na derme, com pico entre 48 a 72 horas após a administração do PPD. A reação evidenciada é chamada de hipersensibilidade tardia. Esse acúmulo de células mononucleares representa o quadro histológico típico da reação tuberculínica manifestada macroscopicamente nessa reação (LUNA, 2003).

1.3 Dor como fator de interferência na cicatrização

Segundo Prazeres (2009), a dor é um fator importante no retardo do processo de cicatrização tecidual, pois a liberação de epinefrina, provoca vasoconstrição e com o fluxo sanguíneo reduzido no leito da ferida há uma menor produção de quimiocinas e produção de fatores responsáveis pela remodelação tissular.

A dor estimula estresse aos indivíduos, pois é uma experiência desagradável e desconfortável, na maioria dos casos. Assim, o estresse por ser um estado emocional, exerce influência na homeostasia do organismo, pois ele debilita o sistema imunológico, reduzindo a resposta inflamatória. A avaliação de portadores de úlceras de perna, que estão frequentemente expostos a situações de estresse, devido à necessidade de permanecerem em repouso, mostrou que nos pacientes com maior ansiedade ocorreu um retardo no processo de cicatrização (DEALEY, 2008).

A nocicepção é resultado da ativação de subpopulações de neurônios sensoriais primários específicos, os nociceptores, responsáveis em transmitir a informação noceptiva para o cordão espinhal, de onde é transmitida até o córtex. (RIEDEL; NEECK, 2001; VERRI et al., 2006).

Quando a pele é exposta a estímulos potencialmente nocivos, sensações desagradáveis são sentidas pelo indivíduo, esse mecanismo informa sobre possível perigo a integridade física. Tal informação é processada e pode ser classificada como dor patológica, visceral ou fisiológica (FANTONI, MASTROCINQUE, 2002; ALMEIDA et al., 2006).

A dor patológica está geralmente associada a processos inflamatórios crônicos, como ocorre na artrite ou câncer. Apresenta efeito protetor pouco claro e precisa ser tratada. Já a dor visceral e a dor somática profunda possuem respostas adaptativas específicas, geralmente são causadas por estímulos inevitáveis, são subagudas, podendo ser acompanhadas por respostas autonômicas comportamentais específicas

A dor fisiológica decorre de respostas protetoras do organismo, na tentativa de interromper a exposição a algum estímulo nocivo, como ocorre por exemplo, em relação ao reflexo de retirada da cauda, observado em animais expostos a uma fonte de calor. Assim, o teste de retirada da cauda (*tail-flick*) é

sensível para identificar a atividade de compostos presentes em extratos vegetais ou drogas, cujos mecanismos sejam semelhantes aos promovidos pelos analgésicos opioides.

Este ensaio experimental consiste na aplicação de uma fonte radiante de calor na cauda do animal, como estímulo nociceptivo térmico, provocando seu movimento de retirada. Um aumento no tempo de reação é geralmente considerado como um parâmetro importante para avaliar a atividade antinociceptiva central, caracterizando-se por uma nocicepção aguda não-inflamatória. Sendo assim, substâncias que atuam em nível central, como a morfina, são capazes de suprimir respostas de neurônios espinhais ao estímulo térmico nocivo na cauda, aumentando o tempo de latência. (FANTONI, MASTROCINQUE, 2002; HELLEBREKERS, 2002; LAPA et al., 2003).

Animais de laboratório, geralmente são utilizados em pesquisas experimentais, podendo expressar respostas fisiológicas, comportamentais e motoras semelhantes ao que é observado em seres humanos quando passam por um processo doloroso. É possível identificar nesses animais, modificações da resposta álgica, a partir de informações que são analisadas e comparadas na presença de substância potencialmente analgésica se interferem no mecanismo fisiológico da dor (HOCHMAN, et al., 2005; DAMATTA, 2010).

1.4 Uso de Plantas medicinais como alternativa terapêutica

A análise da biodiversidade caracteriza-se pelo seu papel evolutivo, ecológico ou como recurso biológico. A partir dos recursos extraídos da biodiversidade, é possível obter uma utilização direta, indireta ou potencial para a humanidade (LÉVÊQUE, 1999).

Entre os elementos constituintes dessa biodiversidade encontram-se as plantas medicinais que se caracterizam pela ação terapêutica quando administrada tanto ao homem quanto aos animais, independente da via ou forma (LOPES et al., 2005).

A utilização de plantas para fins medicinais, nasceu com a humanidade. Achados históricos nas civilizações mais antigas demonstram indícios do uso de plantas medicinais e tóxicas, no tratamento e prevenção de doenças, (ANDRADE; CARDOSO; BASTOS, 2007). ou seja, a utilização de plantas na

prevenção e/ou na cura de doenças é um hábito que sempre existiu na história da humanidade (MORAES; SANTANA, 2001).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) o uso de plantas medicinais é tido como a principal opção terapêutica é de aproximadamente 80% da população mundial. (TOMAZZONI et al., 2006).

No Brasil, a história da utilização de plantas, no tratamento de doenças, apresenta influências da cultura indígena, africana e europeia. Os índios e os escravos africanos contribuíram com a tradição do uso de plantas que apresentavam propriedades de cura, e que também eram empregadas amplamente em rituais religiosos, e esse uso de ervas foi transmitido e aprimorado de geração em geração (LORENZI; MATOS, 2006).

No Maranhão, é comum o uso de espécies vegetais com propriedades ativas, principalmente em comunidades que carecem de atendimento médico (RÊGO, 1985). Sendo uma prática comum, presente no cotidiano, como maneira de complementar o tratamento de diversas patologias. (MADALENO, 2011; GOMES et al., 2014; CUNHA et al., 2015). Estudos etnobotânicos vem sendo realizados em áreas quilombolas, indígenas, urbanas incluindo os mercados e feiras livres do Estado, estando estes direcionados, principalmente no município de São Luís e regiões metropolitanas (COUTINHO et al., 2002., NASCIMENTO ; CONCEIÇÃO, 2011; LINHARES et al., 2014; ARAÚJO et al., 2015; CUNHA et al., 2015).

1.5 Potencial Terapêutico da espécie *Platonia insignis*

1.5.1 Taxonomia e características botânico- geográficas

Platonia insignis Mart. Conhecida popularmente como bacurizeiro, até o presente momento é considerada como a única espécie presente do seu gênero. (CAVALCANTE, 1996; CLEMENT; VENTURIERI, 1990).

Segundo Mourão (1992), o bacurizeiro apresenta a seguinte classificação taxonômica:

Família Clusiaceae

Subfamília: Clusioideae

Gênero: *Platonia*

Espécie: *Platonia insignis* Mart.

A família Clusiaceae, também conhecida como Gutiferae, é composta por plantas tropicais. Apresenta cerca de 55 gêneros e 1200 espécies dispersas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Em nove desses gêneros, cerca de 90 espécies são de plantas cujos frutos são comestíveis (YAMAGUCHI et al., 2014).

Com extrema importância econômica devido aos frutos comestíveis a família abrange árvores, arbustos, ervas e lianas, além de madeiras nobres e derivados químicos de interesse industrial e farmacêutico. No Brasil, a família Clusiaceae se distribui em 18 gêneros e 150 espécies, com destaques para espécies como, *Kielmeyera* sp. (pau-santo), *Caraipa* sp (Camaçari), *P. insignis* (bacuri), *Calophyllum brasiliensis* (guanandi) (FERREIRA et al., 2012).

O gênero *Platonia* recebeu essa denominação em homenagem ao filósofo grego Platão, e o nome da espécie, “insignis” significa notável, importante, grande, em referência ao porte do fruto, pois dentre as diferentes espécies da família Clusiaceae, presentes na Amazônia, o bacuri é considerado um dos maiores (YAMAGUCHI et al., 2014).

A legitimidade do nome *P. insignis* Mart. foi questionada em 2002, considerando que a mesma foi descrita como *Moronobea esculenta* por Manuel Arruda Câmara em 1810. Mais tarde Von Martius, concluiu que a inclusão do bacurizeiro no gênero *Moronobea* estava inapropriado, criando então o gênero *Platonia*, e denominando a espécie *P. insignis* (CARVALHO, 2007).

P. insignis tem sido considerada como uma espécie monotípica, perenifólia, heliófila e seletiva higrófila, característica da vegetação aberta de transição nas áreas descampadas em áreas de vegetação secundária, sendo rara nas florestas primárias densas. Pode ser encontrada em todos os estados da Região Norte, no Maranhão, Piauí e no Mato Grosso, sendo que o principal produtor e consumidor dos frutos e da polpa é o estado do Pará (CARVALHO, 2007).

No estado do Maranhão, a espécie apresenta grande dispersão, sendo geralmente encontrada nas regiões da Pré-Amazônia, Baixada Maranhense e nos cerrados do extremo sul e do Baixo Parnaíba (SOUZA et al., 2000).

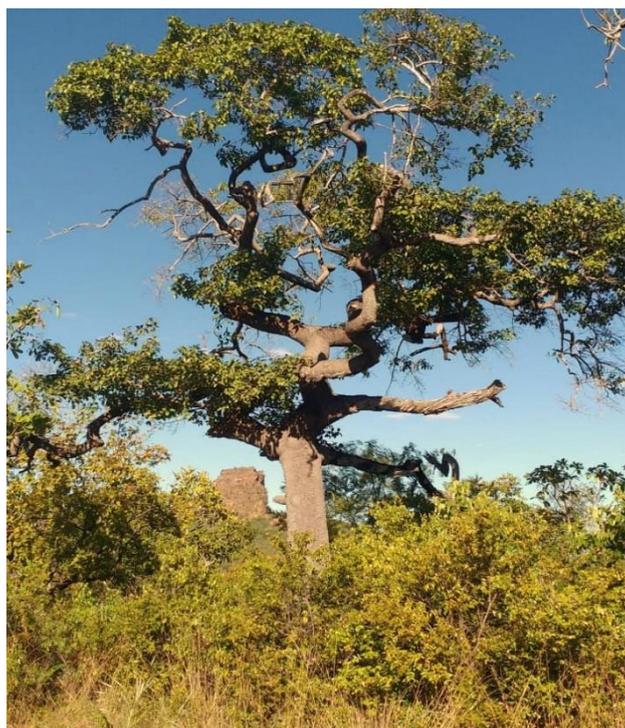


Figura 1. Fotografia da espécie vegetal *Platonia insignis* (Mart.). Localizada na Chapada das Mesas, Carolina (Maranhão). *Fonte:* BEZERRA, 2017.

O bacurizeiro é considerado uma espécie alta como demonstrado na figura 1, alguns exemplares podem atingir de 30 a 35 metros, com uma média de 25 metros de altura. Apresentam um tronco reto com até 2 metros de diâmetro. Possuindo uma casca espessa, em alguns casos escurecida nos indivíduos adultos. Quando a casca é cortada, tende eliminar um látex amarelado com presença de resinas (SOUZA et al., 2000; MATOS et al., 2009).

A madeira do bacurizeiro é explorada, para ser utilizada em obras hidráulicas, nas construções naval, civil e em carpintarias para a fabricação de móveis, ripas, esteios, tacos e algumas embalagens pesadas. Essas utilidades são possíveis devido à alta qualidade na resistência, compactação e propriedades físico-mecânicas que estão presentes na madeira. A coloração pode ser vista em tons de bege-rosado e o alburno pigmentado com bege-claro. (LOUREIRO et al., 1979; BERG, 1982; PAULA; ALVES, 1997).

É considerada uma planta rústica, que passou a receber atenção da agricultura devido ao crescimento e demanda do mercado por frutos, sendo

comum o manejo em roçados velhos, quintais rurais e em locais periurbanos (MENEZES, et al., 2010).

Os estudos relacionados a anatomia foliar do bacurizeiro ainda são escassos na literatura especializada. O trabalho mais completo foi realizado por Mourão; Beltrati (1995a). Na qual relatam que as folhas são simples, opostas e pecioladas de textura subcoriácea a coriácea, abovadas, de formato elípticoabovadas, ovadas ou elípticas, lâmina foliar simétrica, margens inteiras e bordos ondulados, medindo de 15 a 20cm de comprimento e de 6 a 9cm de largura. São glabras (sem a presença de tricomas) e verde-brilhosas na face superior. Apresentam ápice e base agudos, nervuras laterais densas, delicadas e numerosas, paralelinérveas, aproximadas entre si e salientes nas duas faces. Apresentam pecíolo curto e achatado ventralmente, possuindo duas pequenas alas. A venação dessa espécie é pinada, camptódroma e fortemente broquidódroma. A veia primária é robusta, de curso reto e não ramificada. As veias secundárias possuem ângulo de divergência moderadamente agudo e uniforme do ápice até a base da lâmina. A espessura é fina e o curso reto, sendo ramificadas. As veias terciárias têm um padrão reticulado, com ângulo de origem agudo-obtuso.

As flores do bacurizeiro são hermafroditas e andróginas, actinomorfas, polistêmones, grandes, com 7cm de comprimento e 3cm de diâmetro, solitárias e terminais, com uma coloração variada que vai de branco-róseo, róseo e róseo avermelhada. O cálice dessas flores é imbricado, com sépalas livres, e a corola é pentâmera e de coloração variando de róseo claro a róseo escuro. O androceu possui o formato de um disco pateliforme e lobos projetados em cinco feixes multiestaminados e opostos às pétalas, que ficam em um plano superior aos estames. As anteras são lineares e rimosas, e os grãos de pólen ficam envoltos em um óleo, formando um aglomerado viscoso que impede a sua dispersão pelo vento. O gineceu é do tipo sincárpico, ou seja, apresenta ovário súpero, pluricarpilar, pentalocular e pauciovulado ou uniovulado, com vários óvulos por lóculo, de placentação axial, dispostos em duas fileiras; estiletos conatos, alongados e pentáfidos no ápice, e estigmas poriformes. A epiderme externa do ovário é unisseriada, recoberta por espessura cutícula, cujas paredes tangenciais externas e internas tornam-se espessas. A epiderme interna também é unisseriada, com células mais ou menos quadradas, em seção transversal, e

revestidas por uma delgada cutícula (LOUREIRO et al. 1979; CLEMENT; VENTURIERI, 1990; MOURÃO; BELTRATI, 1995a, 1995b; CAVALCANTE, 1996; MAUÉS; VENTURIERI, 1996).

O fruto assemelha-se a uma baga, uniloculado, com formato arredondado, ovalado, piriforme ou achatado, nesse último caso com cinco sulcos visíveis na parte externa. O epicarpo é delgado, com maior frequência de cor amarela e mais raramente com coloração verde-amarelada, marrom-avermelhada ou mais raramente verde. O mesocarpo é espesso apresentando uma consistência coriácea, repleto de vasos lactíferos, com liberação de uma substância resinosa de cor amarela, quando cortado ou ferido. O conjunto formado pelo epicarpo e mesocarpo, popularmente denominado de casca, representa em média 70% do peso do fruto e apresenta espessura que varia entre 0,7 e 1,6 cm. A parte comestível é correspondente ao endocarpo, e representa em média 13% do peso do fruto. É de cor branca, com aroma forte e sabor adocicado sendo desprovido de vasos lactíferos. As sementes são volumosas, de coloração amarronzada e representam, aproximadamente, 17% do peso fruto. Tipos raros apresentam frutos desprovidos de sementes ou com número de sementes igual ou superior a seis. (SOUZA et al., 2000), a figura 2, demonstra as principais características da espécie.



Figura 2: Fotografia das Folhas e Flores (A), Caule (B), Fruto e semente (C) da espécie *Platonia insignis* (Mart). Fonte: KANOUTÉ, 2018.

1.5.2 Composição Química e Potencial biológico da espécie vegetal *Platonia insignis* (MART).

A tabela 1 sumariza os principais resultados quanto a composição química e a atividade biológica das várias partes de *P. insignis*.

A gordura extraída das sementes de *P. insignis*, tem sido utilizada pela população para tratar diarreia, problemas de pele, dores de ouvido, picadas de aranhas e cobras, reumatismos, artrites e como cicatrizante. (COSTA JÚNIOR et al., 2013^a; COSTA JÚNIOR et al., 2013^b; MORAES e GUTJAHR, 2009).

O uso do óleo das sementes originou um pedido de patente relacionado a atividade leishmanicida (CITÓ et al., 2011), pois apresenta ação contra as formas promastigotas de *Leishmania*. Essa mesma atividade foi também descrita em relação aos extratos hexânico da semente, diclorometano e acetato de etila e na substância isolada da semente, garcinielliptona. (COSTA JÚNIOR et al., 2013^a; COSTA JÚNIOR et al., 2013^b).

Os frutos apresentam atividade antioxidante (COSTA JÚNIOR et al., 2013^a; RUFINO et al., 2010; VIEIRA et al., 2011) e as sementes apresentam atividade antimicrobiana, frente à cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (SANTOS JÚNIOR et al., 2010); citotoxicidade em ensaios com *Artemia salina*; efeito genotóxico, em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) (COSTA JÚNIOR et al., 2013^b); efeito anticonvulsivante induzido por pilocarpina (COSTA JÚNIOR et al., 2010); cicatrizante (SANTOS JÚNIOR et al., 2010) e atividade anti-inflamatória (COSTA JÚNIOR et al., 2011).

Tabela 1. Constituintes isolados e identificados na espécie *P. insignis* (MART).

Partes da espécie vegetal	Atividade biológica	Constituintes químicos	Referências
Polpa	Antioxidante	Vitaminas C,E, flavonoides, antocianinas e polifenóis, glutamina, ácido glutâmico, sacarídeos (glicose, frutose e sacarose) e metais (Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn e Cu).	RUFINO et al., 2010; ROGEZ et al., 2004
Sementes	Antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante, antileishmania, citotóxica	Ácidos graxos (palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico e linoleico). Alcoóis graxos como eicosanol, octadecanol; hidrocarbonetos C15, C25 e C28. Diterpenos de esqueletos caurano e labdano: caura-16-eno e ácido E-labda8(20),13-dieno-15,19-diólico.	BENTES et al., 1986; PESCE 1941; ROGEZ et al., 2004; LEANDRO et al., 2012; COSTA JÚNIOR et al., 2013 ^b ; NASCIMENTO et al., 2014
Casca do tronco	Gastroprotetora, Tratamento de eczemas, dermatites vírus da herpes.	Pectina, linalol, terpineol, bisaboleno citrato de trimetila, eugenol.	YAMAGUCHI et al., 2014; RUFINO et al., 2010; VIANA et al., 2013 SHANLEY;MEDINA, 2005.
Folhas	Antimicrobiana	Ácido Quínico; Ácido oleico; Ácido linoleico ; Miricetina; Orientina, Quercetina-3-Arabinosídeo, Quercetin, Ononin, Fukugentin.	Ho et al, 2017; ROCHA, 2017;

Fonte: Adaptado de YAMAGUCHI, 2014.

Devido à importância regional e as atividades já descritas, foi investigado o efeito anti-nociceptivo, anti-inflamatório e cicatrizante de *P. insignis*, na perspectiva de contribuir com dados biológicos que possam facilitar a inclusão dessa espécie como alvo na bioprospecção de novos produtos bioativos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade cicatrizante, anti-inflamatória e analgésica do extrato das folhas de *Platonia Insignis* Mart., em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeito do extrato das folhas *Platonia Insignis* Mart. Sobre a cicatrização de feridas cutâneas induzidas na pele de camundongos.
- Analisar os efeitos do extrato na inflamação por BCG e após o desafio com PPD.
- Avaliar os efeitos de *Platonia Insignis* Mart. na atividade analgésica em modelos de camundongos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 35 camundongos Swiss fêmeas (n=5/grupo), com 2-3 meses e pesando em média 25g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os animais foram mantidos a temperatura média de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 44-56%, sob ciclos normais de claro e noite de 12 horas, com livre acesso a ração esterilizada e água acidificada. Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Maranhão Processo nº 23115.009717/2015-10.

3.2 Material vegetal

As folhas de *P. insignis* Mart. foram coletadas entre os meses de maio e junho de 2017, no município de São Luís, Maranhão, Brasil e os exemplares

foram identificados e catalogados no Herbário do Maranhão, da Universidade Federal do Maranhão, conforme a exsicata número 9722.

3.3 Preparação do extrato hidroetanólico das folhas *P. insignis* (EHPI)

O extrato foi obtido a partir de folhas secas em temperatura ambiente ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$), sendo posteriormente triturado em moinho elétrico e pesadas. Em seguida, o material triturado e pesado foi adicionado a 336 mL da mistura hidroetanólica (70% de etanol 1:4 m/v) deixando macerar em frasco rosqueado, ao abrigo de luz a temperatura ambiente por três dias com renovação do solvente a cada 24 horas e agitação ocasional segundo a metodologia proposta por Matos (2009).

Posteriormente a solução extrativa foi filtrada a vácuo usando funil de Buchner, o filtrado foi evaporado em um evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura controlada a 40°C . O material concentrado foi levado ao freezer, adequadamente vedado e mantido até ser liofilizado para posterior realização dos ensaios.

Para realização dos testes o extrato foi utilizado na concentração de 5mg/Kg, diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS), segundo concentração previamente estabelecida no laboratório, a partir da curva dose resposta.

3.4 Avaliação do efeito na cicatrização

Os animais foram anestesiados com a solução de cloridrato de xilazina (20mg/Kg) e cloridrato de ketamina (25mg/Kg), via intraperitoneal em 0,5 mL. Após a anestesia, foi feita uma desinfecção do dorso com álcool 70% e em seguida a região foi depilada. Para indução da lesão foi utilizado um molde circular, com 1cm de diâmetro, para fazer a marcação do local e área da lesão, como demonstrado na figura 3. A pele foi retirada com auxílio de pinça e tesoura estéreis e para estancar o sangramento o local foi pressionado com gaze estéril, embebida em solução salina, durante 1 a 2 minutos. Os animais foram mantidos aquecidos e hidratados até o fim do efeito da anestesia.

Figura 3. Desenho indicando o local da lesão na região dorsal do camundongo.



Fonte: Carvalho,2002.

3.5 Indução da lesão e avaliação do modelo de cicatrização

Para o modelo experimental de cicatrização foram utilizados 10 animais, distribuídos em 2 grupos, tratados conforme descrito na Figura 4: - GRUPO BACURI, recebeu EHPI (5mg/Kg), via oral, diariamente, durante 14 dias e foi comparado ao GRUPO CONTROLE: que recebeu salina, via oral, nos mesmos intervalos.

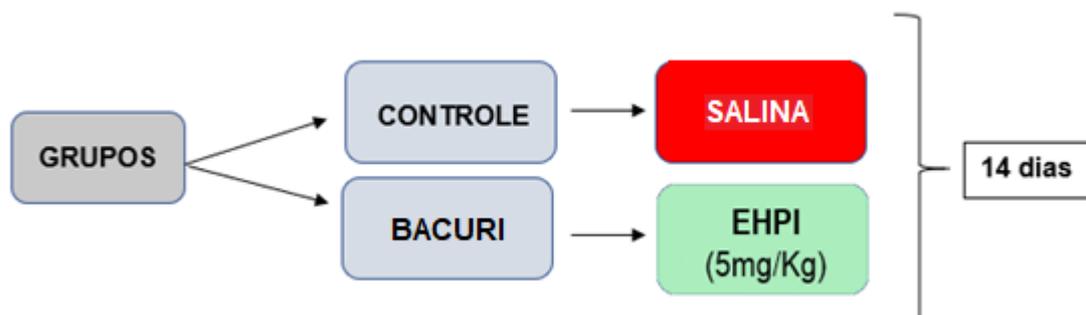


Figura 4. Organograma de divisão de grupos experimentais na cicatrização.

As medidas das lesões foram aferidas a cada dois dias (2; 4; 6; 8; 10; 12 e 14 dias), com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, Japão). As lesões foram fotografadas utilizando-se câmera fotográfica digital acoplada a um tripé com distância padronizada de 15 cm. Em cada dia foram tomadas duas medidas da lesão, uma céfalo-caudal, e a outra correspondente a largura, para cálculo da área total utilizou-se a seguinte fórmula: $AF = \pi r^2$ onde AF: Área da ferida. ($\pi = 3,14\dots$; $r =$ raio da ferida).

3.6 Obtenção das suspensões celulares

As células do sangue, baço e peritônio foram obtidas conforme descrito a seguir, sendo posteriormente coradas com solução de cristal violeta (0,05% em ácido acético 30%), na proporção 1:9. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico de luz comum.

3.6.1 Peritônio

A cavidade peritoneal foi lavada com 5mL de solução tamponada com fosfato (PBS) estéril. As suspensões celulares foram colhidas com auxílio de seringa, transferidas para tubos cônicos de polipropileno, centrifugadas e ressuspensas em PBS. Para a contagem as células do peritônio, foram coradas com cristal violeta (0,05% diluído em 30% de ácido acético) na proporção de 9:1. As células foram contadas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico de luz comum.

3.6.2 Baço

O baço foi removido assepticamente triturado em tamiz e as células obtidas foram ressuspensas em PBS, centrifugadas à 1500 rpm, durante 10 minutos, e ajustadas de acordo com o ensaio. Para determinar a contagem as células foram adicionadas de solução de Turk e as contagens foram realizadas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico de luz comum.

3.6.3 Sangue

As amostras individuais de sangue foram obtidas, por sangria retroorbital. Para a determinação do número total de leucócitos, as amostras de sangue foram homogeneizadas e adicionadas de solução de Turk para a contagem das células ao microscópio óptico em câmara de Neubauer.

3.7 Contagem diferencial de células do Sangue, Baço e Peritônio

A contagem diferencial foi avaliada em esfregaços de sangue e amostras do baço e peritônio por Cytospin. As células foram coradas com May-Grünwald-Giemsa, para diferenciação do padrão celular leucocitário em neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. A análise foi feita com o auxílio do microscópio de luz comum (objetiva de 1000x), a partir da contagem de 100 células. Os dados referentes a cada uma das diferentes populações foram expressos em porcentagem.

3.8 Modelo de inflamação induzida por BCG/PPD

Para o modelo experimental de inflamação foram utilizados 10 animais, distribuídos em 2 grupos: **Controle**: recebeu salina e **EHPI**: foi tratado com extrato (5mg/Kg), via oral, durante 34 dias. A vacina BCG (*Bacilo Calmette – Guérin*), 100mg/mL, com 10^8 Bacilos/mL (Instituto Butatã, São Paulo, Brasil) foi inoculada no espaço subcutâneo do coxim plantar, da pata posterior esquerda, na quantidade de 10 μ L (10^6 bacilos). No 21^o dia os animais foram desafiados com 20 μ L de PPD (Derivado Protéico Purificado). As avaliações do tamanho das patas foram realizadas a cada 24 horas, até o 3^o dia e depois de 3 em 3 dias, até o final do experimento, com auxílio de um paquímetro digital de alta precisão (Mitutoyo, Japão).

3.9 Quantificação da produção de peróxido de hidrogênio

A avaliação da produção de peróxido de hidrogênio foi realizada pelo uso de dihidrorodamina 123 {DHR} (Sigma Aldrich), em sobrenadantes de células peritoneais.

Para o ensaio o sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços e adicionado 100 μ L de PBS 1X estéril para em seguida distinguimos os seguintes grupos: NM (células não marcadas com DRH (375 mg/ml) e LPS + DHR (células estimuladas com LPS 100mg/ml por 2 h antes da marcação com DHR). Após a adição do DHR as placas foram incubadas a 37^oC por 10 min. A leitura foi

realizada por citômetro de fluxo com auxílio do programa FlowJo (CHEN; JUNGER, 2012).

3.10 Imunofenotipagem de linfócitos e macrófagos

As células do linfonodo poplíteo e peritônio 10^6 células/mL foram ressuspensas e transferidas para uma placa de 96 poços com fundo em formato U e foram marcadas com os anticorpos específicos, e levada para incubação a 4°C durante 15 minutos.

Foram montados 3 painéis de marcação do peritônio, e 2 painéis para marcação do linfonodo, com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos. Para a cavidade peritoneal, foram utilizados: anti-CD3 (FITC); anti-CD28 (PE) e anti-CD4 no painel 1, anti-CD3 (FITC, anti-CD8 (PerCP) e anti-CD28 (PE) no painel 2, anti-F480 (FITC), anti-IaIe (PE) e anti-CD86 (APC). Para o linfonodo foram utilizados os dois primeiros painéis para linfócitos que foram utilizados para marcar na cavidade peritoneal.

As células foram analisadas por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e morfologicamente caracterizadas. As amostras foram lidas com o auxílio citômetro (Guava® easyCyte HT Sampling Flow Cytometer) e a análise e processamento de dados foi feita com auxílio do programa FlowJo Versão 10.0 (TreeStar).

3.11 Teste da latência para o reflexo de retirada da cauda (“tail-flick”)

Para o modelo de atividade analgésica foram utilizados 15 camundongos Swiss fêmeas, divididos da seguinte forma: *Controle negativo*: recebeu PBS (5mg/kg), via oral. *Controle positivo*: recebeu morfina (10 mg/Kg), via intraperitoneal. *Grupo EHPI*: recebeu extrato hidroetânico de *P. insignis* (5mg/Kg), via oral.

A atividade anti-nociceptiva do EHPI foi avaliada pelo teste de calor radial (D'AMOUR; SMITH, 1941) com modificações (D'AMOUR; SMITH, 2013). Os camundongos foram submetidos ao estresse térmico na cauda e a mudança de sensibilidade destes animais foi analisada num Analgesiômetro (Techno Type: Mark-IB, SL.No; 720,121) mantendo a intensidade da corrente passando

pelo fio nicromo nu a 5 A. A distância entre a fonte de calor e a pele da cauda foi de 1,5 cm. com a finalidade de prevenir danos e o tempo de corte foi ajustado em 10 s.

O tempo gasto pelos camundongos para retirar (agitar) a cauda foi considerada como o tempo de reação. Assim, as observações foram feitas na leitura inicial antes do tratamento e nos intervalos de 30, 60, e 120 min após a administração da droga. A antinocepção foi quantificada como o efeito máximo possível (MPE) usando a fórmula posposta por Torres et al., (2001).

$$\text{MPE\%} = \frac{\text{latência pós tratamento} - \text{latência pré-tratamento}}{\text{tempo de cut off (10)} \times \text{Latencia pré-tratamento}} \times 100$$

3.12 Análise estatística

Os dados foram expressos com a média \pm desvio padrão da média (SD) de 5 animais por grupo. A análise estatística é feita por análise de variância, seguido do teste Tukey-Kramer, para avaliações múltiplas. Avaliações do tipo controle/tratado, foram feitas pelo teste t de Student, sempre considerando o nível de significância $p \leq 0,05$. O teste de normalidade utilizado foi o Shapiro-Wilk com o auxílio do software estatístico Graphpad Prism 7.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação macroscópica das feridas

A análise macroscópica foi realizada para observação do processo de reparo tecidual. As fotografias da figura 5A mostram a evolução cicatricial do grupo controle e do grupo EHPI.

Após a incisão da pele dos camundongos, os dois grupos apresentavam lesões do mesmo tamanho, com o local avermelhado durante os dois primeiros dias, devido a quantidade de sangue existente, característico do tecido que sofreu uma interrupção na homeostasia.

No quarto dia, nota-se a presença de um tecido vitalizado, com pouca quantidade de fluido e uma retração maior no grupo não tratado, enquanto o grupo EHPI apresentava ainda bordas irregulares

Do sexto ao oitavo dia os dois grupos apresentaram uma grande retração da área lesionada, com ausência de secreções, e formação inicial de uma pequena crosta nas bordas, porém, com menor retração no grupo EHPI.

No décimo dia, já havia a formação de crosta com coloração marrom em toda a área da lesão no grupo controle, já o tratado com EHPI se manteve com coloração vermelho claro com um certo retardo no reparo tecidual em relação ao outro grupo.

No décimo segundo e décimo quarto dia, ocorreu formação total da crosta em ambos os grupos, e diminuição progressiva da área lesionada, com reepitelização na maior parte da ferida

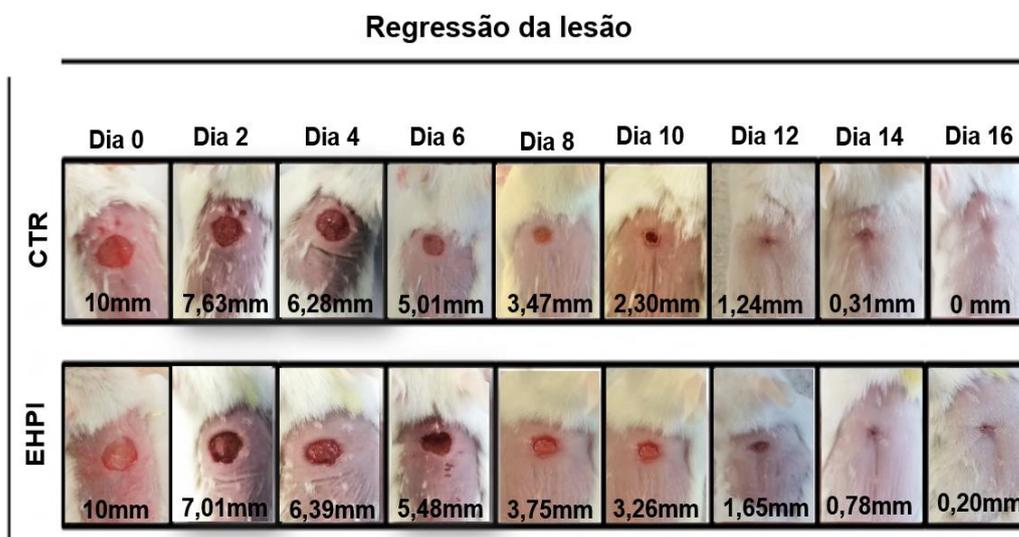
No décimo sexto dia, o grupo controle apresentou cicatrização total do tecido, enquanto o tratado com EHPI ainda havia uma pequena área aberta. Finalizando assim as análises macroscópicas

A figura 5B refere-se aos efeitos do EHPI na evolução da área da lesão.

No segundo dia após a indução da lesão os grupos apresentavam diferenças pouco significante na redução da ferida. A divergência ficou evidenciada a partir do quarto dia onde ocorreu maior retração no controle (20 mm²) do que no grupo EHPI (40 mm²). É possível notar que os valores médios do grupo EHPI foram sempre maiores do que o controle, mas não interferiram

no desfecho do processo de cicatrização, pelo menos na avaliação macroscópica.

A



5

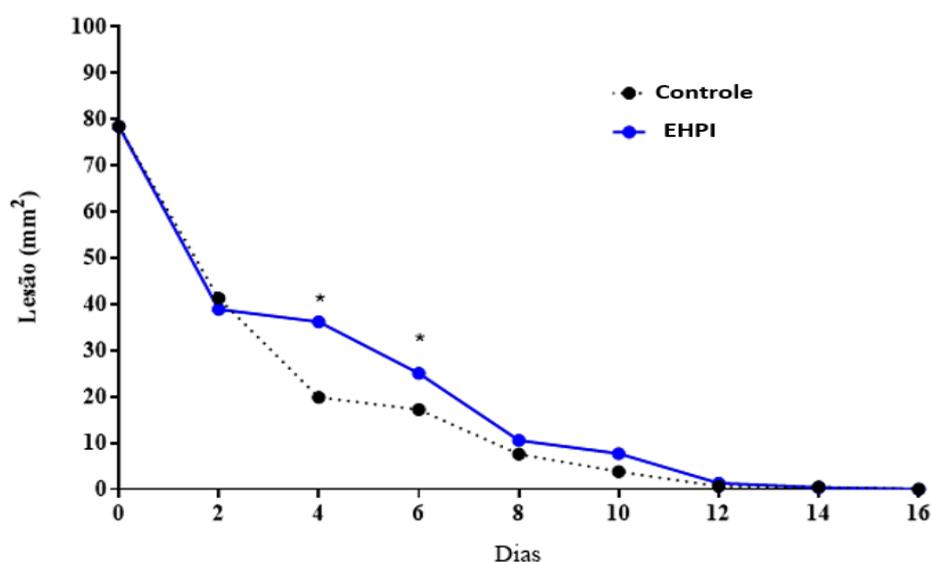


Figura 5: Efeito do extrato hidroetânico de *Platonia insignis* (EHPI), na evolução da cicatrização de ferida cutânea. Fotografia (A) evolução da lesão e (B) medidas da lesão em camundongos Swiss tratados com 5mg/Kg de EHPI, via oral, diariamente, durante 14 dias (Grupo Platonia), foram comparados ao grupo controle: recebeu, nos mesmos intervalos, somente água. Os resultados

se referem a média das medidas de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle

4.2 Efeito do EHPI nas populações celulares do peritônio, baço e sangue

O tratamento com EHPI aumentou o número total de leucócitos sanguíneos (Figura 6A), de células do baço (Figura 6B) e de células peritoneais (Figura 6C).

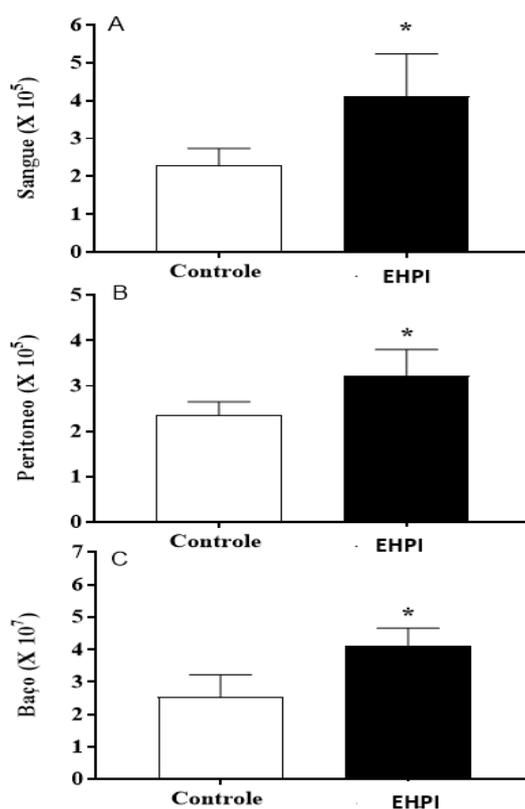


Figura 6: Contagem total de células no sangue (A), no baço (B) e no peritônio (C). Camundongos Swiss, fêmeas, nos quais foi induzida uma lesão no dorso para avaliar a cicatrização. Os animais foram divididos nos grupos: - P. insignis: tratado com extrato das folhas de *Platonia insignis* (EHPI – 5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 14 dias; - Controle: recebeu, nos mesmos intervalos, somente salina. Os resultados se referem a média das medidas de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle.

4.3 Avaliação do efeito da reação inflamatória induzida por BCG

A Figura 7 mostra que o extrato só inibiu a resposta inflamatória após o desafio com PPD, que ocorreu no 21º dia, pois os resultados obtidos antes disso foram similares ao observado no controle.

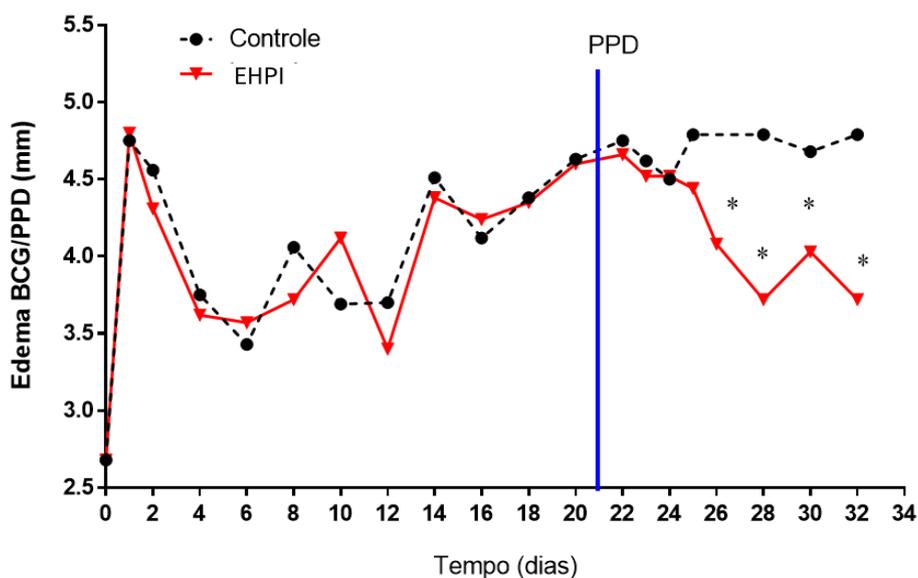


Figura 7. Efeitos da administração oral do extrato hidroetânico de *Platonia insignis*, sobre o edema de pata ocasionado por BCG. Camundongos Swiss, fêmeas, foram divididos em dois grupos: Grupo controle: recebeu somente água; grupo EHPI: foi tratado com extrato de *Platonia insignis* (5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 34 dias após o inóculo de BCG no coxim plantar. Todos os animais foram desafiados com PPD no 21º dia do experimento. Os resultados se referem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle.

4.4 O EHPI afeta a migração de neutrófilos e linfócitos sanguíneos

O tratamento com EHPI aumentou o número de neutrófilos e linfócitos, mas não afetou as populações monócitos no sangue (Figura 8).

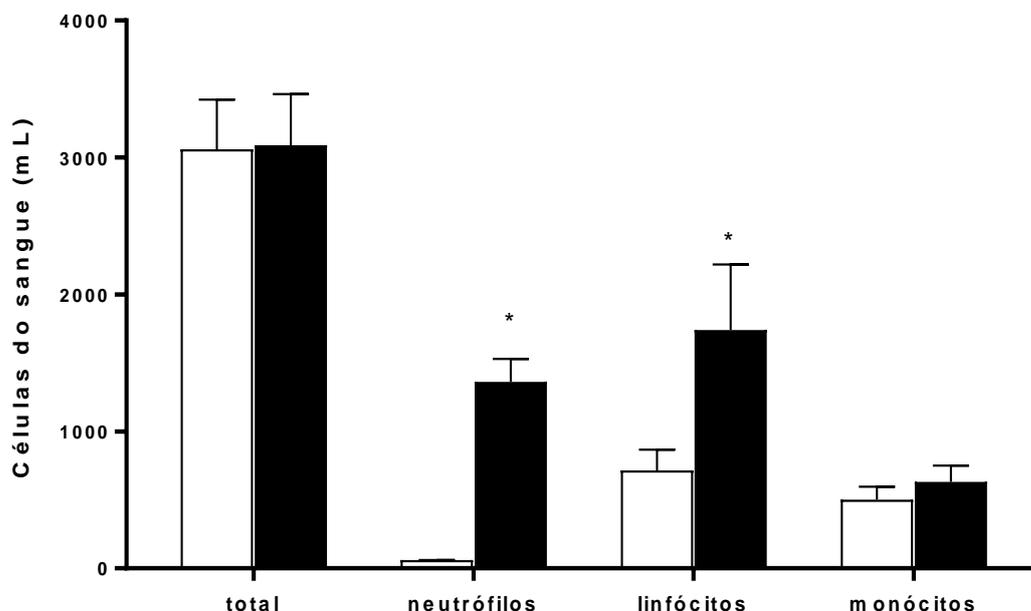


Figura 8. Contagem total e diferencial das células do sangue no experimento induzido por BCG. Camundongos Swiss, fêmeas, foram divididos em dois grupos: Grupo controle: recebeu somente salina; grupo EHPI: foi tratado com extrato de *P. insignis* (5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 34 dias após o inóculo de BCG no coxim plantar. Todos os animais foram desafiados com PPD no 21º dia do experimento. Os resultados se referem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle.

4.5 EHPI aumentou a celularidade do poplíteo, mas não teve efeito no baço

O tratamento com EHPI aumentou o número total de células do linfonodo poplíteo (Figura 9A), mas não alterou o número de células no baço (Figura 9B).

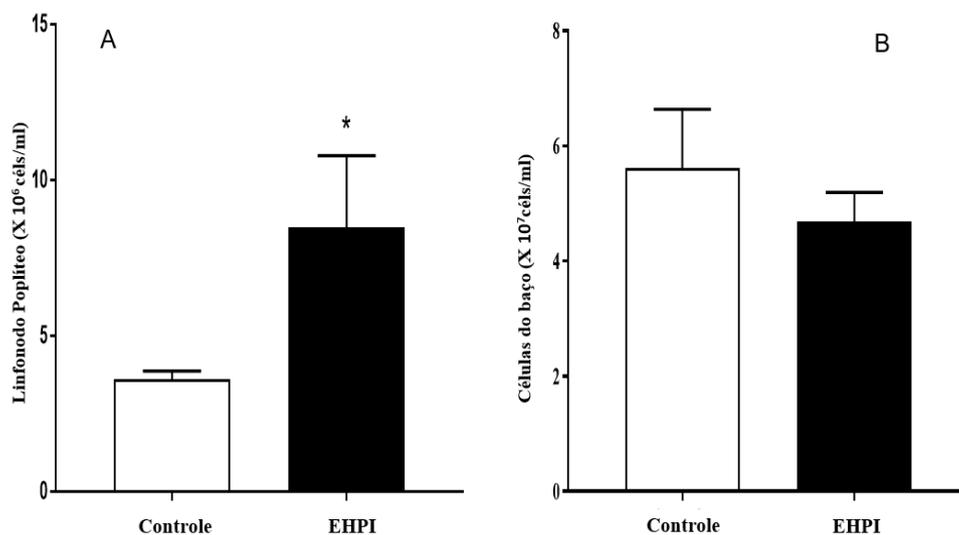


Figura 9. Número total das células do linfonodo poplíteo (A) e do baço (B). Camundongos Swiss, fêmeas, foram divididos em dois grupos: Grupo controle: recebeu somente água; grupo EHPI: foi tratado com extrato de *P. insignis* (5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 34 dias após o inóculo de BCG no coxim plantar. Todos os animais foram desafiados com PPD no 21^o dia do experimento. Os resultados se referem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle.

4.6 O efeito do EHPI no poplíteo não está associado a população de linfócitos ou macrófagos

Visando identificar quais as populações estariam impactando o aumento no número total de células no poplíteo, avaliamos as populações de linfócitos T auxiliares (CD4+) e T citotóxicos (CD8+ - Figura 10A), bem como a população de macrófagos (F4/80) ativados (CD86+ ou IaIe+) ou não (Figura 10B). O tratamento com EHPI não afetou nenhuma das subpopulações avaliadas nem de linfócitos, nem de macrófagos ativados ou residentes

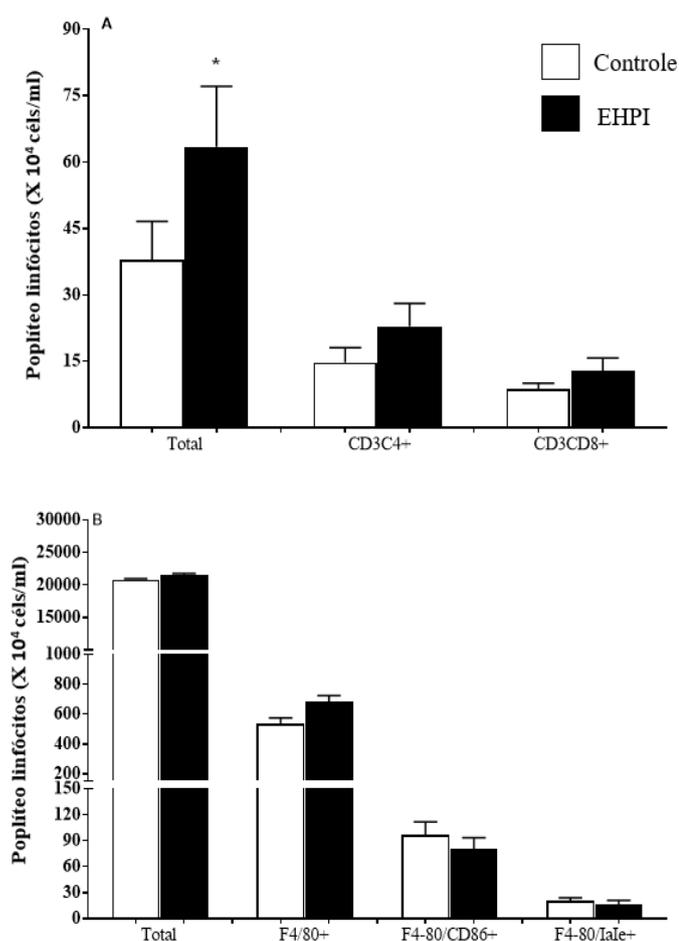


Figura 10: Efeito do EHPI nas populações de linfócitos (A) e macrófagos (B) no linfonodo poplíteo. Camundongos Swiss, fêmeas, foram divididos em dois grupos: Grupo controle: recebeu somente água; grupo EHPI: foi tratado com extrato de *Platonia insignis* (5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 34 dias após o inóculo de BCG no coxim plantar. Todos os animais foram desafiados com PPD no 21^o dia do experimento. Os resultados se referem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle.

4.7 EHPI aumentou o número de linfócitos no peritônio

A Figura 11 mostra que o tratamento com EPI aumentou o número de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ no peritônio (Figura 11A), mas não afetou a população de macrófagos ativadas (F4|80/CD86⁺ ou F480/laIe⁺) neste sítio (Figura 11B).

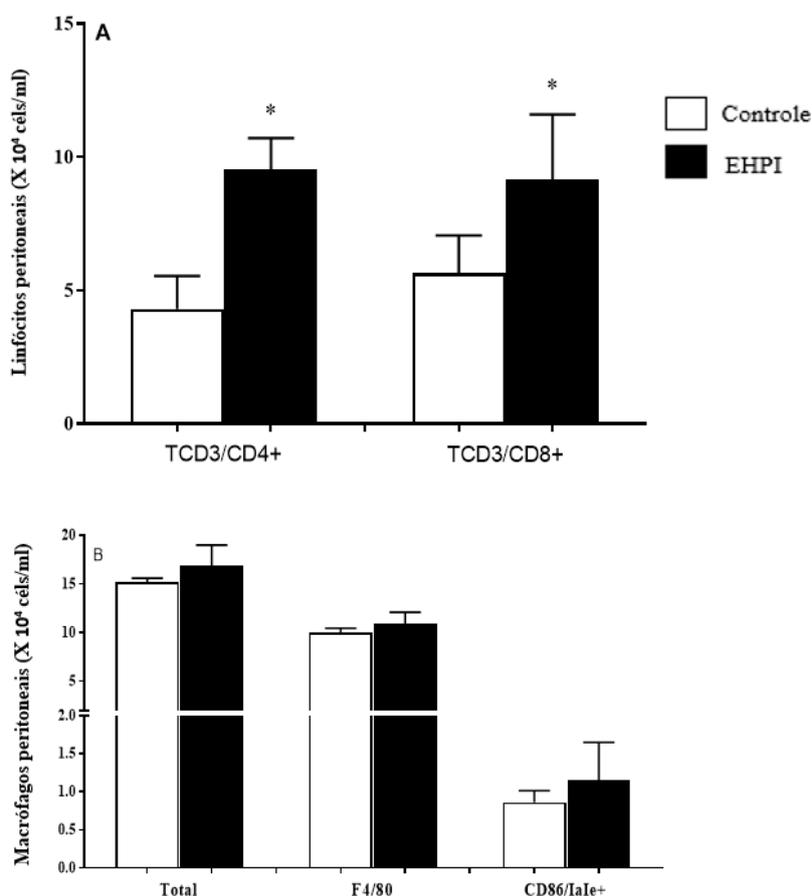


Figura 11: Efeito do tratamento com EHPI na população de linfócitos T (A) e macrófagos no peritônio (B). Camundongos Swiss, fêmeas, foram divididos em dois grupos: Grupo controle: recebeu somente salina; grupo EHPI: foi tratado com extrato de *Platonia insignis* (5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 34 dias após o inóculo de BCG no coxim plantar. Todos os animais foram desafiados com PPD no 21^o dia do experimento. Os resultados se referem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle.

4.8 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio no peritônio

Avaliando O “Burst” oxidativo pela marcação por DRH para peróxido de hidrogênio, os dados abaixo observamos que o tratamento com EHPI só aumentou a produção de peróxido de hidrogênio após o estímulo com PMA (Figura 12).

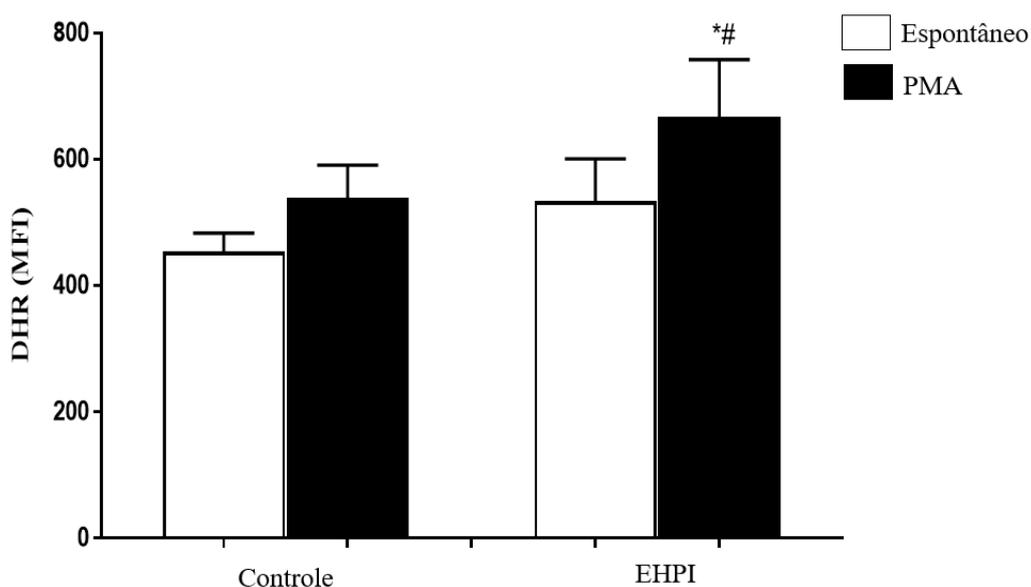


Figura 12: Efeito do tratamento com EHPI sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Camundongos Swiss, fêmeas, foram divididos em dois grupos: Grupo controle: recebeu somente salina; grupo EHPI: foi tratado com extrato de *P. insignis* (5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 34 dias após o inóculo de BCG no coxim plantar. Todos os animais foram desafiados com PPD no 21º dia do experimento. Os resultados se referem a média ± desvio padrão de 5 animais/grupo (*) p<0,05 na comparação com o controle, (#) na comparação com o controle PMA.

4.9 Efeito anti-nociceptivo do EHPI, segundo Teste *Tail-flick*

Após 30 minutos, o tratamento com morfina apresentou uma melhor atividade analgésica e proteção máxima, com potencial de latência de 49%, enquanto que o grupo tratado com EHPI apresentou 30%. No intervalo subsequente de 60 minutos, o tratamento de EHPI apresentaram atividade

similar, sendo que o percentual de latência do grupo bacuri foi de 98%, enquanto que o grupo morfina foi de 75%.

Na avaliação aos 120 minutos observamos que os grupos morfina e Bacuri apresentaram resultados próximos com percentual de latência em torno de 80% (Figura 13).

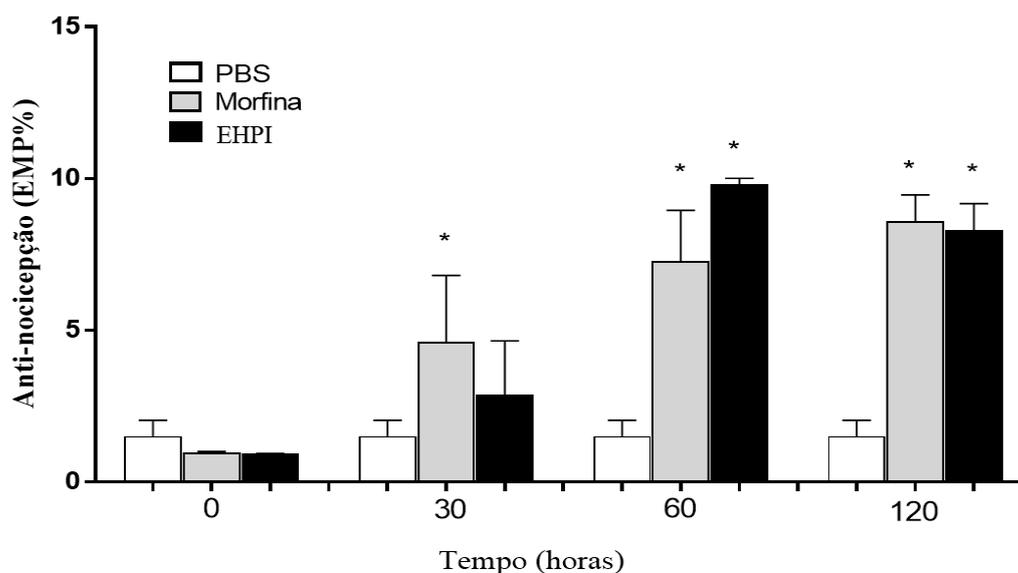


Figura 13: Efeito do extrato hidroetânico de *Platonia insignis* na percepção dolorosa. Camundongos Swiss, fêmeas, foram divididos em três grupos tratados no momento 0 conforme o grupo: - EHPI: recebeu extrato das folhas *Platonia insignis* (5mg/Kg), via oral; - PBS: recebeu somente água; Grupo Morfina: recebeu 10mg/Kg de morfina, via intraperitoneal. Os animais foram sacrificados no 15º dia, quando foram obtidas as células. Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle em comparação ao grupo *Platonia*.

5. DISCUSSÃO

Com a análise dos resultados e observações diárias dos animais tratados, foi possível afirmar que o EHPI, não apresentou toxicidade quando administrado por via oral, pois além dos animais permanecerem vivos e em boas condições, as contagens celulares do sangue, baço e peritônio foram maiores no grupo tratado com EHPI do que no controle.

Resultados semelhantes foram descritos anteriormente por Degen et al.,(2016) que, ao utilizar a infusão das folhas de *P. insignis* apresentou DL50 de 3.614 mg/mL, portanto muito acima dos valores máximos preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que só considera um produto como tóxico quando a DL50 é maior do que 1000 mg/mL.

O EHPI não foi efetivo em reduzir o tempo de cicatrização, ou alterar a cinética do processo de remodelamento tissular quando avaliamos sua ação no modelo de ferida aberta na região dorso-costal. Nas análises macroscópicas ficou evidente que o extrato não foi eficaz no processo de reparo da ferida, diferentemente dos estudos realizados anteriormente que utilizaram o óleo das sementes ou a banha obtida de *P. insignis* na cicatrização de feridas cutâneas em ratos por Santos Júnior et al., (2010). As diferenças podem estar relacionadas tanto a natureza do produto testado, como a parte da planta e a espécie animal. Há de se ressaltar também a via de tratamento, pode interferir na eficácia do produto, pois optamos pela via oral, ao invés da aplicação tópica, como relatado pelos autores. Em geral, a aplicação tópica tem se mostrado mais eficaz em modular o processo cicatricial (MENDES, 2013).

Neste trabalho o tratamento com EHPI após o inóculo com BCG, não apresentou efeito na inflamação aguda, porém na resposta secundária, após o desafio com o PPD, o extrato inibiu a inflamação crônica. O maior volume do edema ocorreu após 24 horas do inóculo, tanto na fase aguda, como na fase crônica (GUZZO, 2007).

Na avaliação do edema na pata dos camundongos, com BCG, observamos que o EHPI só foi efetivo na fase crônica, mesmo assim somente após o desafio com PPD, sugerindo um efeito imunomodulador, sobretudo se considerar que o tratamento estimulou a migração celular para diferentes sítios,

incluindo aumento de linfócitos T auxiliares (CD4+) e T citotóxicos (CD8+) no peritônio. Adicionalmente, o tratamento com EHPI ativou neutrófilos, pois a produção de peróxido de hidrogênio foi maior após o estímulo com PMA. Na análise dos leucócitos sanguíneos, foi observado que o EHPI, aumentou a migração de linfócitos e neutrófilos, confirmando o efeito do extrato sobre essas duas populações celulares.

No linfonodo poplíteo, também ocorreu aumento no número total de células, entretanto essas células não eram nem macrófagos e nem linfócitos T auxiliares e T citotóxicos, uma vez que os resultados obtidos não foram diferentes do controle. Possivelmente, o infiltrado presente nos linfonodos seja composto de células epitelióides, pois na inflamação granulomatosa induzida pelo BCG ocorre predominância dessas células.

As células epitelióides são macrófagos com tamanho aumentado, com núcleo alongado e cromatina frouxa, lembrando os fibroblastos. As células epitelióides são formadas por macrófagos agrupados, presos uns aos outros. O conjunto lembra vagamente um epitélio, onde as células também estão aderidas entre si (ABBAS et al. 2008). Assim, os marcadores de membrana acabam se tornando de difícil acesso, o que poderia explicar as similaridades entre o grupo controle e tratado, aqui observadas.

No peritônio o tratamento com EHPI, aumentou a população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, mas manteve inalterada a população de macrófagos. É importante ressaltar que a vacina BCG atua na imunidade celular, recrutando células CD4, CD8 e macrófagos (ROSEMBERG, 2001). Os linfócitos auxiliares ou linfócitos CD4⁺, compreendem uma população celular bem definida funcionalmente, tendo como funções principais a regulação de outras células do sistema imune a partir da produção de citocinas (ARAÚJO, 2009).

Na análise de macrófagos peritoneais, foi possível identificar um recrutamento de células F4/80+, entretanto de igual magnitude nos dois grupos. Estudos realizado por GHOSN et al., (2008) demonstraram a heterogeneidade da população de macrófagos na cavidade peritoneal de camundongos, por meio da expressão de CD11b e F4/80, foi possível descrever dois subtipos funcionais de macrófagos, sendo o PM-1 e PM-2, este último é caracterizado por serem os únicos macrófagos peritoneais que expressam MHC-II (GHOSN, 2008). Dessa forma é razoável propor que o efeito do EHPI deve ser específico para a

população que não expressa MHC-II, pois também permaneceram inalterados os números de células que expressavam esse marcador.

Um dos mecanismos usados pelos macrófagos ativados é a produção de espécies reativas de oxigênio, que tem início a partir da fagocitose. O “*burst*” respiratório tem como principal produto o H_2O_2 . (LOWENSTEIN; PADALKO, 2004).

Foi observado que o estímulo com PMA intensificou a produção desse composto, no grupo tratado com EHPI. O PMA e alguns de seus análogos são capazes de realizar um disparo no burst oxidativo dos fagócitos, por ser um agonista da proteína quinase C (PKC), independente dos receptores de membranas (SANTOS, 2016). PMA também induz a atividade NADPH-oxidase em neutrófilos das vias de transdução por dois sinais independentes: dependente ou independente de fosfatidilinositol 3-quinase (Karlsson et al., 2000).

Os efeitos biológicos dos tratamentos envolvendo espécies vegetais podem estar diretamente interlaçados com a composição química da planta, no estudo realizados com mastruz demonstraram que os flavonoides estavam envolvidos na regulação da proteína quinase C, alvo de ativação pelo PMA (Ferriola et al. 1989). A estrutura química dos flavonoides poderia facilitar a interação com a proteína quinase C, em uma possível ação moduladora da sinalização desta ou inibição da sua migração para a membrana, sendo um possível meio de regulação desses compostos na atividade da NADPH oxidase (ZHOLOBENKO et al., 2016).

Considerando os resultados obtidos é razoável inferir que o que o aumento celular observado pode estar relacionado a população de neutrófilos e células epitelioides, não há macrófagos, sobretudo no peritônio. Assim novas abordagens são necessárias para esclarecer o efeito anti-inflamatório observado, sobretudo por se tratar de efeito relacionado a ativação secundária do sistema imune e a fase inflamatória crônica do edema ocasionado por BCG.

Com base nesses achados, sugere-se que o efeito supressor do extrato pode estar relacionado a ação imunomoduladora do mesmo, em decorrência da elevada concentração de flavonoides presentes no extrato do bacuri. Pois os flavonóides são compostos bioativos com ação anti-inflamatória e

imunomoduladora, além de outras numerosas propriedades biológicas, incluindo a capacidade em modular enzimas e (DOVICH; LAJOLO, 2011).

Nesse estudo não foi possível avaliar a produção de citocinas, novas análises serão realizadas posteriormente, utilizando a técnica de ELISA, pois as citocinas podem ser definidas como um grupo heterogêneo de proteínas, que são produzidas naturalmente e secretadas por células diversas, pertencentes ou não ao sistema imune. A funcionalidade dessas proteínas se dá na defesa do organismo, regulando parte da atividade das células que participam da imunidade inata e específica (TIZARD, 2002).

O estudo de compostos derivados de plantas farmacologicamente ativos, tem promovido a descoberta de fármacos utilizados no tratamento de doenças. Para o tratamento de dor, princípios ativos que derivam de plantas estão sendo estudados por indústrias e laboratórios acadêmicos, pois há uma necessidade da descoberta de novos analgésicos que sejam efetivos no combate das dores, principalmente dores crônicas, que afetam o bem-estar do indivíduo.

O teste Tail flick mostrou que o tratamento com EHPI ampliou o tempo que os animais permaneciam sobre a placa aquecida, sugerindo uma ação anti-nociceptiva, central, semelhante a morfina. A morfina é considerada um protótipo de analgésicos opióides, que são conhecidos pela sua eficácia, pois estes bloqueiam a transmissão dos estímulos dolorosos atuando sobre vários receptores pré e pós-sinápticos no gânglio da raiz dorsal e para centros superiores, podem atuar também sobre a transmissão neural em diferentes locais da própria medula espinhal (SOUZA, 2003), sugerindo efeito semelhante para o EHPI.

6. CONCLUSÃO

çConclui-se que o extrato de *P. insignis* não apresenta efeito cicatrizante, mas possui uma atividade anti-nociceptiva central, provavelmente por ativar neutrófilos, possui atividade imunomoduladora e anti-inflamatória em processos crônicos, possivelmente por interferir no processo de migração e proliferação celular.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise conjunta dos dados e informações apresentadas fornece um avanço importante dos efeitos e propriedades da espécie *P. insignis* (Mart.), especialmente de suas folhas, esta parte da planta tem recebido pouca atenção de estudos sistematizados.

Foi demonstrado que o tratamento com EHPI promove significativo efeito analgésico, o qual parece estar relacionado com a grande quantidade de flavonoides presentes nessa espécie. Quando avaliada a atividade anti-inflamatória, observou-se uma resposta no grupo tratado com o extrato na após o desafio com PPD, podendo estar relacionada à diminuição da migração de leucócitos para o foco dessa inflamação, sugerindo um efeito imunomodulador.

Este trabalho é pioneiro em abordar os efeitos do EHPI na cicatrização, inflamação e dor, abrindo uma fonte importante de investigação. Porém para a plena validação do uso popular da espécie é essencial que estes estudos sejam aprofundados, havendo necessidade de testes com uma dose maior do extrato, respeitando sempre o nível de toxicidade descrito na literatura.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; et al. Patologia Básica. 8 ed. São Paulo: Elsevier, 2008. 60p.
- ABLA, L.E.F; ISHIZUKA, M.M.A. Fisiopatologia das Feridas. In: FERREIRA L.M. Manual de cirurgia plástica. São Paulo: Atheneu, p.5-11, 1995.
- ALMEIDA, T. P. et al. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária. Veterinária em Foco, v. 3, n. 2, p. 107-118, 2006.
- ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. Journal of Ethnopharmacoly, v.109, n. 3, p. 464-471, 2007.
- ARAÚJO, F. F. et al. Avaliação do papel das células T reguladoras CD4+ CD25+ nas diferentes formas clínicas da Doença de Chagas. Tese de Doutorado. 2009.
- ARAÚJO, I. F. S. et al. Plantas medicinais comercializadas em Bacabal, Maranhão. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br> >. Acesso em: 07 set. 2018.
- BALBINO, C. et al. Revista brasileira de ciências farmacêuticas. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. São Paulo, 2005.
- BENTES, M. H. S. et al. Estudo das sementes de bacuri. Acta Amazônica, Vol. 16/17, pp. 363-368, 1986.
- BERG, M. E. V. D. Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu estudo sistemático. Belém: CNPq/PTU. 223p.1982.
- BEZERRA, J. E. A. Fotografia da espécie vegetal *Platonia insignis* (Mart.). 2017. Disponível em: < https://www.instagram.com/jose_emidio_21/> Acesso em 29 set, 2018.
- BLANES, L. Tratamento de feridas. In: Cirurgia Vasculare: guia ilustrado. 1. ed. São Paulo: Baptista-Silva JCC, 2004.
- BRANDÃO, E.S.; SANTOS, I. Enfermagem em dermatologia: Cuidados técnico, dialógico e solidário. Rio de Janeiro: Editora Copyright, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Tratamento Diretamente Observado da Tuberculose na Atenção Básica: Protocolo de Enfermagem. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BROUGHTON G. et al. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 117(7 Suppl):12S-34S. 2006.

CARVALHO, J. E. U. Aspectos botânicos, origem e distribuição geografia do bacurizeiro. In: LIMA, M. C. (Org.). Bacuri: agrobiodiversidade. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, p. 17-27. 2007.

CARVALHO, P.T.C. Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos. Dissertação 31(Mestrado) - Área interunidades em Bioengenharia da EESC/FMRP/IQSC - USP, 2002.

CAVALCANTE, P. B. Frutas comestíveis da Amazônia. 6. ed. Belém, PA: CNPQ: Museu Paraense Emílio Goeldi, 279 p. 1996.

CAVALCANTE L.C. et al. Efeito da pedra umes no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. *Braz J Periodontol*; 22(1): 69-73. 2012.

CAVENAGHI, I. M. C. O ultra-som como recurso na área de fisioterapia Dermatofuncional. IBRATE, Curitiba, 2004.

CHEN, Y.U; JUNGER, W. G. Measurement of oxidative burst in neutrophils. In: *Leucocytes*. Humana Press, 2012. p. 115-124.

CITÓ, A. M. G. et al. Atividade do óleo das sementes de *Platonia insignis* Mart como leishmanicida. 2011, Brasil. Patente: Modelo Industrial. Número do registro: PI1101608-6, data de depósito: 15/04/2011, título: "Atividade do óleo das sementes de *Platonia insignis* Mart como leishmanicida".

CLEMENT, C. R.; VENTURIERI, G. A. Bacuri and cupuassu. *Fruits of tropical and Subtropical Origin*, p. 178-192, 1990.

COLDITZ, G.A. et al. A eficácia da vacinação do bacilo Calmette-Guerin de recém-nascidos e lactentes na prevenção da tuberculose: meta-análises da literatura publicada. *Pediatrics* 96: 29 -35. 1995.

COSTA JÚNIOR, J. S. et al. Evaluation of antioxidant effects in vitro of garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 5, p. 293-299, 2011.

COSTA JÚNIOR, J. S. et al. Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. Seed. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, Vol.112, pp. 3441, 2013b

COSTA JUNIOR, J.S. et al. Citotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. *Natural Product Research* Vol.27, No.4-5, Pp. 470-474, 2013a.

COSTA JÚNIOR, J.S. et al. Evaluation of effects of ethanolic extract (EE) from *Platonia insignis* Mart. on pilocarpine-induced seizures. *Journal of biological Science*, Vol. 10, pp.747-753, 2010.

COUTINHO, D. F. et al. Estudo etnobotânicos de plantas medicinais utilizadas em comunidades indígenas do estado do Maranhão Brasil. Curitiba: Visão acadêmica, v. 3, n.1, p: 7-12, jan-jun./ 2002.

CUNHA, M. M. C. et al. Perfil etnobotânicos de plantas medicinais comercializadas nas feiras livres de São Luís, Maranhão, Brasil. [S. L]: Scientia Plena, 2015.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.72, p.74-9, 1941.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.72, p.74-9, 2013.

DAMATTA, R.A. Modelos animais na pesquisa biomédica. *Sci Med*. 20(3):210-11. 2010.

DAVENNE, T.; MCSHANE, H. Why don't we have an effective tuberculosis vaccine yet? *Expert Rev Vaccines*.15(8):1009-1013. 2016.

DEALEY, C. Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

DEGEN, A. N. et al. Ensaio toxicológico de infusões das folhas de *Platonia insignis* frente ao microscrustáceo *Artemia salina*. XXIII Salão de Iniciação Científica: Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná - CEULJI/ULBRA, 2016.

DHARMARATNE, H.R.W.; WANIGASEKERA, W.MA.P. Xantones from root bark of *Calophyllum thwaitesii*. *phytochemistry*, v. 42, n.1, p. 249-250, 1996.

DI PIETRO L.A. et al. MIP1alpha as a critical macrophage chemo attractant in murine wound repair. *J. Clin. Invest.*, v. 101, p. 1693-1698, 1998.

DICCINI, S. et al. Incidência de úlcera por pressão em pacientes neurocirúrgicos de hospital universitário. *Rev. Acta Paul Enferm*. v.2, n.22, p.2015-9, 2009.

DOVICH, S. S.; LAJOLO, F. M. Flavonoides e sua relação com doenças do Sistema Nervoso Central. *Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr*, v. 36, n. 2, 2011.

- EMING, S.A. et al. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.*127:514–21. 2007.
- FANTONI, D. T.; MASTROCINQUE, S. Fisiopatologia e Controle da Dor. Anestesia em Cães e Gatos. São Paulo: Rocca. p. 323-334. 2002.
- FERREIRA, R. O. et al. Biflavonoids from the Unripe Fruits of *Clusia paralicola* and their antioxidante activity. *Natural Product Communications*, v. 7, n. 12, p.1598- 1600, 2012.
- FERRIOLA, P.C. et al. Protein Kinase C inhibition by plant flavonoids: Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochemical pharmacology*, 38 (10), 1617-1624. 1989.
- GEOVANINI, T; OLIVEIRA JUNIOR, A.G; PALERMO, T.C.S. Manual de curativos. São Paulo: Ed. Corpus, 2007.
- GHOSN, E. E. B. Revisitando a cavidade peritoneal de camundongos: identificação de novos subtipos funcionais de linfócitos B-1 e macrófagos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2008.
- GILLITZER, R. et al. Chemokines in cutaneous wound healing. *Journal of Leukocyte Biology* 69: 513-21, 2001.
- GOMES, P. R. M. et al. Estudo etnobotânicos de plantas medicinais hipoglicemiantes no bairro do Maracanã no município de São Luís, Maranhão, Brasil. *São Luís: Scientia plena*, v. 10, n. 09. 2014.
- GUZZO, L. S. Avaliação de atividades farmacológicas de diferentes espécies de *Lychonophora* utilizadas pela população. 2007.99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Núcleo de pesquisa em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007..
- HELLEBREKERS, L. J. Dor em Animais. São Paulo: Manole, p.69-79. 2002.
- HERZMANN, C. et al. Childhood bcg vaccination does not influence control of *Mycobacterium tuberculosis* growth by human bronchoalveolar lavage cells. *Tuberculosis*. 95(3):321-327. 2015.
- HO, G. T. T. et al. Effect of phenolic compounds from elderflowers on glucose- and fatty acid uptake in human myotubes and HepG2-cells. *Molecules*, v. 22, n. 1, p. 90, 2017.
- HOCHMAN, B. et al. Desenho de pesquisa. *Acta Cir Bras*. 20(Supl 2):2-9. 2005.

- HUNT, T. K. Wound Healing. In: Doherty GM, Way LW, editors. Current Surgical diagnosis and treatment. 12th edition. New York: McGraw-Hill; 2006.
- IRION, G. Feridas: Novas Abordagens, Manejo Clínico e Atlas em Cores. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.
- KANOUTÉ, D.B. Fotografia da espécie *Platonia insignis* (Mart.). 2018. Disponível em < <https://www.instagram.com/fotografandomato/>> Acesso em 29 set, 2018.
- KARLSSON et al., Psychometric properties and factor structure of the Three-Factor Eating Questionnaire (TFEQ) in obese men and women. Results from the Swedish Obese Subjects (SOS) study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24, 1715-1725. 2000.
- LAPA A. J. et al. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Porto Alegre. 2003.
- LEANDRO, L. M. et al. O gênero *Eperua* Aublet: uma revisão. *Scientia Amazonia*, vol. 1, Pp. 14-22, 2012.
- LÉVÊQUE, C. A. Biodiversidade. Bauru: Ed. da Universidade Sagrado Coração, 1999.
- LINHARES, J. F. P. et al. Etnobotânica das principais plantas medicinais comercializadas em feiras e mercados de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil. São Luís: Revista Pan- Amazônica de Saúde (Online), v. 5 p. 39-46, 2014.
- LIU H.L, et al. Role of cytokines in neutrophil functions. In: AGGARWAL, B.B., PURI, R, eds. *Human Cytokines: their role in disease and therapy*. Science. 1995; 71-86.
- LOPES, C.R. et al. Folhas de chá. Viçosa: UFV, 2005.
- LORENZI, H.; MATOS F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum; 2002.
- LOUREIRO, A. A. et al. Essências madeireiras da Amazônia. Manaus: INPA, V.1. 245p.1979.
- LOWENSTEIN, C.; PADALKO, E. iNOS (NOS2) at a glance. *J. Cell Sci.* 117:2865-7. 2004.
- LUNA, J. A. C. Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias. Paris-Francia, 2003.

- MADALENO, I. M. Plantas da medicina popular de São Luís, Brasil. Belém: Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas, v. 6, n2, p. 273-286, maio-ago. 2011.
- MATOS, G.B. et al. Levantamento Socioeconômico do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) nativos das Mesorregiões do Nordeste Paraense e do Marajó. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 81p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 351). 2009.
- MAUÉS, M. M.; VENTURIERI, G. C. Identificação e técnicas de criação de polinizadores de espécies vegetais de importância econômica no Estado do Pará. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. Geração de tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do Trópico Úmido. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU: IICA. p. 17-55. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 85). 1996.
- MENDES, C.S.M. de. Delineamento de um fitomedicamento a partir de 1,3-diestearil-2-oleilglicerolisolado de *Platonia insignis* Mart.: avaliação da atividade cicatrizante. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí. Teresina. p. 80. 2013.
- MENDONÇA, R.J.; COUTINHO NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. Na Bras Dermatol. 84(3): 257-62. 2009.
- MENEZES, A.J.E.A. et al. Caracterização de sistemas de manejo de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) nas Mesorregiões do Nordeste Paraense e do Marajó, Estado do Pará. Amazônia: Ci. & Desenv., Belém, v. 6, n. 11, p. 49-62. 2010.
- MENTER, A. et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. J Am Acad Dermatol; 58:826-50. 2008.
- MORAES, M.E.A.; SANTANA, G.S.M. Aroeirado-sertão: um candidato promissor para o tratamento de úlceras gástricas. Funcap, v. 3, p. 5-6, 2001.
- MORAES, R.L.B.; GUTJAHR, E.; Química de Oleogenosas - Valorização da Biodiversidade Amazônica. Agência de Cooperação Técnica Alemã, 2009.
- MOURÃO, K. S. M. M. Morfologia e desenvolvimento de frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). 90 p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 1992.
- MOURÃO, K. S. M. M.; BELTRATI, C. M. Morfologia dos frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). I. Aspectos anatômicos dos

frutos e sementes em desenvolvimento. Acta Amazônica, Manaus, v. 25, n. 1/2, p. 11-14, 1995a.

MOURÃO, K. S. M. M.; BELTRATI, C. M. Morfologia dos frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). II Morfo-anatomia dos frutos e sementes maduros. Acta Amazônica, Manaus, v. 25, n. 1/2, p. 13-45, 1995b.

NASCIMENTO, J. L. et al. Avaliação da atividade antioxidante in vitro do extrato hexânico da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de seu complexo de inclusão com β -ciclodextrina. Boletim informativo Geum, v. 5, n. 2, p. 44-53, 2014

NASCIMENTO, J. M.; CONCEIÇÃO, G. M. Plantas medicinais e indicações terapêuticas da comunidade quilombola olho d'água do raposo, Caxias, Maranhão, Brasil. Caxias: Biofar ISSN 1983-4209, v.6.n. 02. 2011.

NETO, J.C.L. Considerações sobre a cicatrização e o tratamento de feridas cutâneas em equinos. Disponível em:

http://www.merial.com.br/veterinarios/equinos/biblioteca/equinos_documentoLis
t. Acesso em: 21.out.2018. 2003.

OLIVEIRA A.F. Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia ferrea* (tul.) Martius (Jucá) em lesões cutâneas de caprinos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, Rio grande do Norte, 65p. 2008.

OLIVEIRA, D. M. et al. Antibacterial mode of action of the hydroethanolic extract of *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. involves bacterial membrane perturbations. Journal of Ethnopharmacology, v. 172, p. 356–363, 2015.

PANOBIANCO, M.S. et al. Comparação da cicatrização pós-mastectomia entre mulheres portadoras e não-portadoras de diabetes mellitus. Rev. Rene. 11:15-22. 2012.

PAULA, J. E.; ALVES; J. L. Madeiras nativas anatomia dendrologi, dendrometria, produção e uso. Brasília: Empresa Gráfica Gutenberg, 541p. 1997.

PESCE, C. Oleaginosas da Amazônia. Belém: Revista da Veterinária, 130p., 1941.

RAJA S.K. et al. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. Front Biosci.12:2849–68. 2007.

RÊGO, T. J. A. S. Plantas Medicinais da baixada Maranhense. In: VIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Manaus, 1985.

- RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain and antinociception: current concepts. *Zeitschrift fur Rheumatologie*, v. 60, n.6, p. 404-415, 2001.
- ROBSON M.C. et al. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. In: Robson MC; Steed DL; Franz MG. *Wound healing. Curr Probl Surg. Chicago*, 38(2): 73-94. 2001.
- ROCHA, E.S. Produção de bioprodutos com atividade antimicrobiana a partir do extrato das folhas de *Platonia insignis* Mart.(Bacuri). 2017.
- ROGEZ, H. et al. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). *European Food Research and Technology*, Vol. 218, pp. 380384, 2004.
- ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da tuberculose: Síntese e atualização. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, 9(1); 2001.
- RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry, Kidlington*, Vol. 121, pp. 996-1002, 2010.
- SANTOS, G. B. Ação do nitróxido de tempol sobre a atividade do complexo enzimático NADPH oxidase (Nox2) em neutrófilos. 2016. 97f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.
- SARANDY, M.M. Avaliação do efeito cicatrizante do extrato de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) em ratos wistar. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 49p. 2007.
- SCHUGART R.C, et al. Wound angiogenesis as a function of oxygen tension: a mathematical model. *Proc Natl Acad Sci USA*.105:2628–33.2008.
- SHANLEY, P.; MEDINA, G. Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Pará: Belém. 54p. 2005.
- SOLÉ, D. Imunidade e hipersensibilidade. In: TUBERCULOSE na Infância e na adolescência. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.
- SILVA, R.C; FIGUEIREDO; MEIRELES et al. Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem- 2ª Ed. São Caetano do Sul. SP. Ed.Yendis, 2007.
- SOMMER C, WHITE F - Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. – *Pharmacology of Pain*. 1st Ed, Seattle, IASP Press;279-302. 2010.

- SOUZA, H. J. M. Coletâneas em Medicina e Cirurgia felina. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2003.
- SOUZA, V.A.B. et al. Bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). Jaboticabal: Funep. p.72. (Série Frutas Nativas, 11). 2000.
- TIZARD, I.R. Imunologia veterinária – Uma introdução. 6.ed. São Paulo: Roca. 532p. 2002.
- TOMAZZONI, M. I. et al. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática Terapêutica. Texto Contexto Enferm, Florianópolis; 15(1): 115-21. 2006.
- TORRES et al., Effect of repeated stress on novelty induced anti-nociception in rats. Braz J Med Biol Res. 34:241-4.
- VERRI J.R. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? Pharmacology & Therapeutics, v.112, p.116-138, 2006.
- VIANA, A. F. S. C. et al. Avaliação da atividade gastroprotetora das cascas do caule da *Platonia insignis* Mart. em ensaios experimentais de lesão gástrica em roedores. Anais do I Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas, v.4, n. 2, p. 129- 130, 2013.
- VIEIRA, C.S.C.A. et al. Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas. Caderno de Reabilitação em Hanseníase, n.2, p. 52, 2002.
- VIEIRA, L. M. et al. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. Revista Brasileira de Fruticultura, Vol. 33, No.3, Pp.888-897, 2011.
- WERNER; GROSE et al. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev. 83: 835-70, 2003.
- YAMAGUCHI, K. K. L. et al. Química e farmacologia do bacuri (*Platonia insignis*). Scientia Amazonia, v. 3, n. 2, p. 39-46, 2014.
- YAMAGUCHI, K.K.L. et al. (adaptado) Atividades biológicas e uso etnofarmacológico de bacuri (*Platonia insignis*). Scientia Amazonia, v. 3, n. 2, p. 39-46, 2014.
- ZHOLOBENKO, A. et al. Polyphenols from *Silybum marianum* inhibit in vitro the oxidant response of equine neutrophils and myeloperoxidase activity. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, 39(6), 592-601. 2016.