

MICHELLE PEDROZA JORGE

**ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO BRUTO
DE *Arrabidaea chica* (HUMB. & BONPL.) VERLOT**

CAMPINAS

Unicamp

2008

MICHELLE PEDROZA JORGE

**ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO BRUTO
DE *Arrabidaea chica* (HUMB. & BONPL.) VERLOT**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica na área de Ciências Básicas.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARY ANN FOGLIO

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANA LÚCIA TASCA GOIS RUIZ

CPQBA/UNICAMP

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

J768a	Jorge, Michelle Pedroza Atividade cicatrizante do extrato bruto de <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bonpl.) verlot / Michelle Pedroza Jorge. Campinas, SP : [s.n.], 2008. Orientadores : João Ernesto de Carvalho, Mary Ann Foglio, Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Arrabidaea chica. 2. Cicatrização. 3. Colageno. 4. Fibroblastos. 5. Capacidade antioxidante. 6. Antiulcerosos. I. Carvalho, João Ernesto de. II. Foglio, Mary Ann. III. Ruiz, Lúcia Tasca Góis. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. V. Título.
-------	---

Título em inglês : Evaluation of wound healing properties of Arrabidaea chica Verlot extract

Keywords: • Arrabidaea chica
• Wound healing
• Collagen
• Fibroblast
• Antioxidant capacity
• Anti-Ulcer Agents

Titulação: Mestre em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

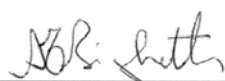
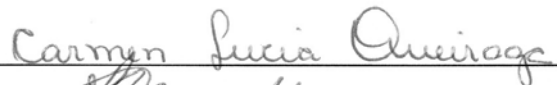
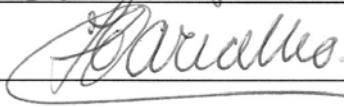
Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
Profa. Dra. Carmen Lúcia Queiroga
Profa. Dra. Aparecida Érica Bighetti

Data da defesa: 14 - 02 - 2008

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof Dr. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) .Aparecida Érika Bighetti 
 2. Prof(a). Dr(a). Carmen Lucia Queiroga 
 3. Prof(a). Dr(a). João Ernesto de Carvalho 
-

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 14/02/2008

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Vitória e ao meu pai Cláudio,

Realizamos juntos mais esta etapa e o título também é de vocês.

Obrigada pelo amor;

Obrigada pela educação;

Obrigada pela minha vida;

Obrigada por acreditarem na minha capacidade;

Obrigada por terem acolhido a família que eu formei: Felipe e Matheus.

Obrigada por tudo e mais um pouco.

Amo-vos Muito.

À minha linda Irmã Caroline,

Obrigada pela Amizade

Por acreditar em mim

Pelos conselhos

Brincadeiras

Risadas, gargalhadas

Por ser uma tia linda

Por todo seu amor!!!

Amo te muito!!!!

Ao meu marido Felipe e meu filhão Matheus,

Obrigada,

Pela alegria do dia a dia;

Pelo companheirismo;

Pela paciência;

Pelo amor;

Por darem sentido a minha vida;

Simplesmente por existirem!!!!

Amos-vos Muitão!!!

As minhas velhinhas prediletas Deolinda e Neiva,

Pelas broas,

Bolos de chocolate,

Macarrão gravatinha com bife a milanesa

Bomba de chocolate, Biliscão de goiabada

Pelos Sonhos de doce de leite, creme e goiabada

Pelos Sonhos sonhados juntos

Pelos terços rezados todos os dias

Pela Benção

Pelos gorrinhos e sapatinhos que nos aquecem até hoje

Pelas risadas

Pelos soninhos velados

Amo-vos Muito!!

A todos os meus tios e tias, primos e primas, agregados, amigos da faculdade, da vida, das baladas, do laboratório. Obrigada pela Torcida!!!

Em Especial a aqueles que sempre estiveram ao meu lado pro que der e vier:

As minhas “filhas”, Débora, Gabriela e Vanessa, Luzinha, obrigada pelas risadas e cumplicidade.

As minhas amigas irmãs, Matu, Carol Mãe, Carol Flores, Fernada, Leo, Ana Flávia, Débora, Samira *et al* obrigada por tudo!!!

A Ana P., Sica, Alik, Karin, Cris, Ilza e Rodney e Humberto obrigada por acreditarem e me ajudarem nesta etapa.

A tia Delma, Rosi, Luiza, tio Noro, a prima Cynthia, Dianne, Mariane e Danielle pela torcida constante, amor e carinho.

A família Moita *et al* por ter me acolhido desde o primeiro olhar, pela torcida, risadas, viagens, amor.

Um agradecimento mais que especial aos meus queridos orientadores João Ernesto de Carvalho, Ana Lucia, Mary Ann, por acreditarem, e desacreditarem, me deixando caminhar e aprendendo com os erros e acertos. Obrigada pelo carinho, ombro amigo, pelas conversas na cozinha....

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

	PÁG.
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxv
INTRODUÇÃO	29
1- Pele	32
A- Fibroblastos.....	34
B- Colágeno.....	35
2- Cicatrização	38
A- Fase inflamatória.....	38
B- Fase fibroblástica.....	39
C- Fase de remodelamento.....	40
3- Úlcera gástrica	40
A- Secreção gástrica.....	42
B- Mecanismos de defesa gástrica.....	42
C- Mediadores da defesa gástrica.....	44
4- Plantas medicinais	45
A- <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bonpl.) Verlot.....	46
❖ Biossíntese das antocianinas.....	48
OBJETIVOS	53
1- Objetivo geral	55
2- Objetivos específicos	55

MATERIAL E MÉTODOS.....	57
1- Estudo fitoquímico.....	59
A- Obtenção do material vegetal.....	59
B- Preparação de extratos vegetais.....	60
2- Testes de atividade farmacológica <i>in vitro</i>.....	62
A- Ensaio de Indução de Crescimento com Fibroblastos <i>in vitro</i>	62
B- Síntese de colágeno <i>in vitro</i>	64
C- Análise de hidroxiprolina.....	64
D- DPPH.....	65
E- Reagente de Folin Ciocalteu (FCR) - Ensaio de capacidade redutora.....	65
3- Testes de atividade farmacológica <i>in vivo</i>.....	66
A- Atividade anti-ulcerogênica.....	66
❖ Úlcera induzida por etanol.....	66
❖ Atividade antiulcerogênica: Triagem do mecanismo de ação.....	67
❖ Estudo da participação das substâncias sulfidrílicas não proteicas sobre a citoproteção gástrica.....	68
❖ Estudo da participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica.....	68
❖ Estudo da participação do óxido nítrico na citoproteção gástrica.....	69
B- Atividade antiinflamatória.....	69
❖ Edema de pata induzido por carragenina.....	69
❖ Edema de orelha induzido por óleo de cróton (ação tópica).....	70
C- Atividade cicatrizante.....	70
❖ Procedimento cirúrgico e tratamento.....	70
❖ Estudos histopatológicos.....	71

4- Análise estatística.....	71
RESULTADOS.....	73
1- Obtenção do extrato bruto de <i>arrabidaea chica</i>.....	75
2- Estimulo do crescimento de fibroblasto <i>in vitro</i>.....	75
3- Dosagem de hidroxiprolina para análise de síntese de colágeno <i>in vitro</i>...	76
4- Avaliação antioxidante.....	76
5- Úlcera induzida por etanol.....	77
6- Determinação da dose efetiva 50 (DE₅₀).....	78
7- Estudo da participação do óxido nítrico sobre a citoproteção gástrica.....	79
8- Estudo da participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica.....	80
9- Estudo da participação das substâncias sulfidrílicas não proteicas na citoproteção gástrica.....	81
10- Edema de pata induzido por carragenina.....	82
11- Edema de orelha induzido por óleo de cróton – tópico.....	83
12- Procedimento cirúrgico e tratamentos.....	84
13- Estudos histopatológico.....	87
14- Dosagem de hidroxiprolina para análise de síntese de colágeno <i>in vivo</i>..	87
DISCUSSÃO.....	89
CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
ANEXO.....	119
1- Artigo submetido.....	121
Evaluation of wound healing properties of <i>Arrabidaea chica</i> Verlot extract...	121

RESUMO

As folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot (Bignoniaceae), popularmente conhecida como Crajiru, são utilizadas na medicina popular como cicatrizante, antiinflamatória e no tratamento de cólicas intestinais. O presente trabalho descreve os efeitos cicatrizante, antiinflamatório, antiulcerogênico e antioxidante do extrato bruto metanólico das folhas de *Arrabidaea chica*. O extrato estimulou o crescimento de fibroblastos, *in vitro*, de forma proporcional à concentração utilizada com atividade similar à alantoina. Também estimulou a produção *in vitro* de colágeno de maneira semelhante ao ácido ascórbico. Nos ensaios de DPPH e Folin-Ciocalteu, o extrato bruto apresentou moderada ação antioxidante. A aplicação tópica do extrato bruto em modelos experimentais do processo cicatrizante *in vivo* reduziu em 96% a área cutânea ulcerada após dez dias de tratamento, enquanto o grupo salina apresentou redução de somente 36%. Em modelos de úlcera gástrica em ratos induzida por etanol, o extrato bruto de *A. chica* reduziu o índice de lesões em 90%. Apesar do uso popular em processos inflamatórios, esse extrato não reduziu o edema de pata induzido por carragenina nem o edema de orelha induzido por óleo de cróton em ratos. Esses resultados permitem concluir que o extrato bruto metanólico das folhas secas de *Arrabidaea chica* possui princípios ativos que ativam o processo cicatricial, através da proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, confirmando o uso popular cicatrizante desta espécie.

ABSTRACT

Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot (Bignoniaceae) leaves, popularly known as Crajiru, are employed in folk medicine for wound healing, anti-inflammatory, and intestinal colic. Herein we report the *in vitro* and *in vivo* healing, antulcerogenic, antiinflammatory and antioxidant activities of *Arrabidaea chica* crude methanolic extracts. *A. chica* crude methanolic extract stimulated cell growth in a concentration dependent way and demonstrated similar effect as allantoin and vitamin C increasing *in vitro* collagen production. Also, *A. chica* crude extract demonstrated moderate scavenger effect (DPPH assay) and moderate reducing effect (Folin-Ciocalteau reagent). Wound healing experimental models in rats reduced in 96% the wounds size after ten days treatment, whereas saline group showed only 36% wound healing.

Antiulcerogenic experimental models in rats showed gastroprotective activity, reduction of 90%, by measuring ulceration lesion index (ULI). The *Arrabidaea chica* crude extract showed no antiinflammatory activity. The crude extract's efficiency seems to involve fibroblast growing stimulus and collagen synthesis both *in vitro* and *in vivo*, beyond the moderate scavenging activity and antiulcerogenic activity, corroborating with the folk use of this plant species.

INTRODUÇÃO

A preocupação com o tratamento de feridas é descrita desde a antiguidade, por Hipócrates e Celsus. Na pré-história, agentes como extratos de plantas, água, neve, gelo, frutas e lama eram aplicados sobre as feridas. Na Mesopotâmia, as feridas eram lavadas com água ou leite e o curativo realizado com mel ou resina. Lã de carneiro, folhas e cascas de árvores eram utilizados para sua cobertura. Os egípcios concluíram que uma ferida fechada cicatrizava mais rápido do que uma aberta e, por isso, utilizavam tiras de pano para manter unidas as margens da lesão (Blanes, 2004).

Vários fatores locais e sistêmicos podem determinar alterações no desenvolvimento do processo normal de cicatrização, levando a retardo ou mesmo prolongamento do processo cicatricial. Os fatores locais mais importantes que determinam essas alterações no processo cicatricial são a infecção, a técnica cirúrgica, os hematomas na ferida, presença de corpos estranhos, a isquemia tecidual e os curativos. Já os fatores sistêmicos que alteram a cicatrização incluem desnutrição, obesidade, diabetes, assepsia, deficiência de oligoelementos e de vitaminas, entre outros (Mensah *et al*, 2001; Houghton *et al*, 2005; Gutierrez & Vargas, 2006).

Várias doenças estão associadas com alteração do processo cicatricial, dentre elas a síndrome de Ehlers-Danlos, a hemofilia, a doença de Von Willebrand, a deficiência de Fator XIII da coagulação, a hipofibrinogenemia de Werner, a insuficiência cardíaca congestiva, a aterosclerose, diabetes melito, a síndrome de Cushing, as doenças hematológicas associadas com trombocitopenia, a insuficiência hepática e a síndrome de deficiência imunológica (Fujita *et al*, 2005).

A utilização de alguns medicamentos pode promover alteração no processo cicatricial. Os medicamentos frequentemente relacionados com distúrbios da cicatrização são glicocorticóides, antiinflamatórios não esteroidais, colchicina, ciclosporina e penicilamina. Estas drogas atuam primordialmente alterando o processo inflamatório e a atividade imune, revelando a interação entre o sistema imune e o sistema de cicatrização (Barbul *et al*, 1995; Deodhar *et al*, 1997; Witte *et al*, 1997).

1- Pele

A pele é o maior órgão do corpo, correspondendo a 16 % do seu peso, que serve como barreira de agentes externos. É constituída por duas camadas denominadas epiderme e derme (Figura 1).

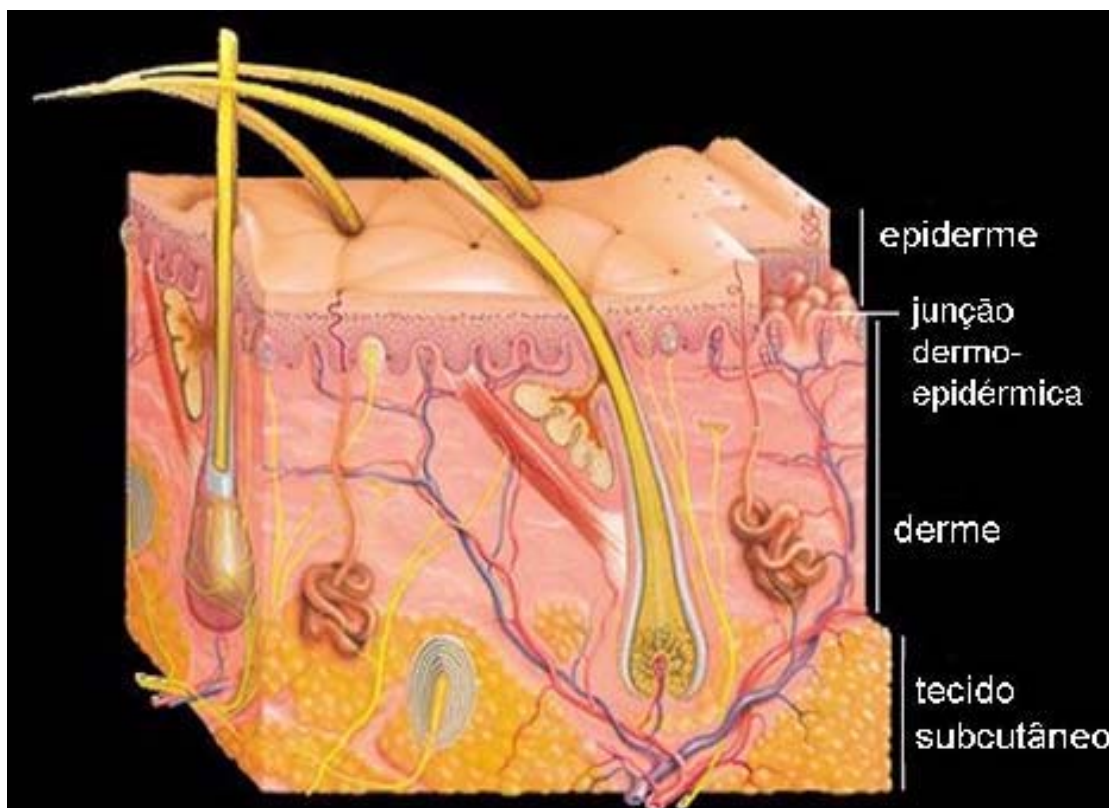


Figura 1- Anatomia da Pele (Baranoski S, Nursing Management 2001; 32(8):25-32, disponível em www.nursingcenter.com.)

A epiderme é a camada mais externa constituída por tecido epitelial tendo como principais tipos celulares os melanócitos, as células de Langerhans e os queranócitos. (Junqueira, 1999).

Sob a epiderme, localiza-se a derme que é constituída por tecido conjuntivo. Esse tecido conjuntivo é firme, flexível e elástico, além de nutrir e sustentar a epiderme devido à presença de vasos sanguíneos, terminações nervosas e vasos linfáticos. Apresenta

apêndices dérmicos como unhas, cabelos e glândulas. (Junqueira, 1999). O tecido conjuntivo é composto por diversos tipos celulares incluindo, células cartilaginosas, células ósseas e fibroblastos, os quais são especializados na secreção da matriz extracelular rica em fibras de colágeno e fibra elástica, responsáveis pela arquitetura estrutural do corpo (Figura 2). As células do tecido adiposo e as musculares lisas também fazem parte das células do tecido conjuntivo (Alberts *et al*, 2004).

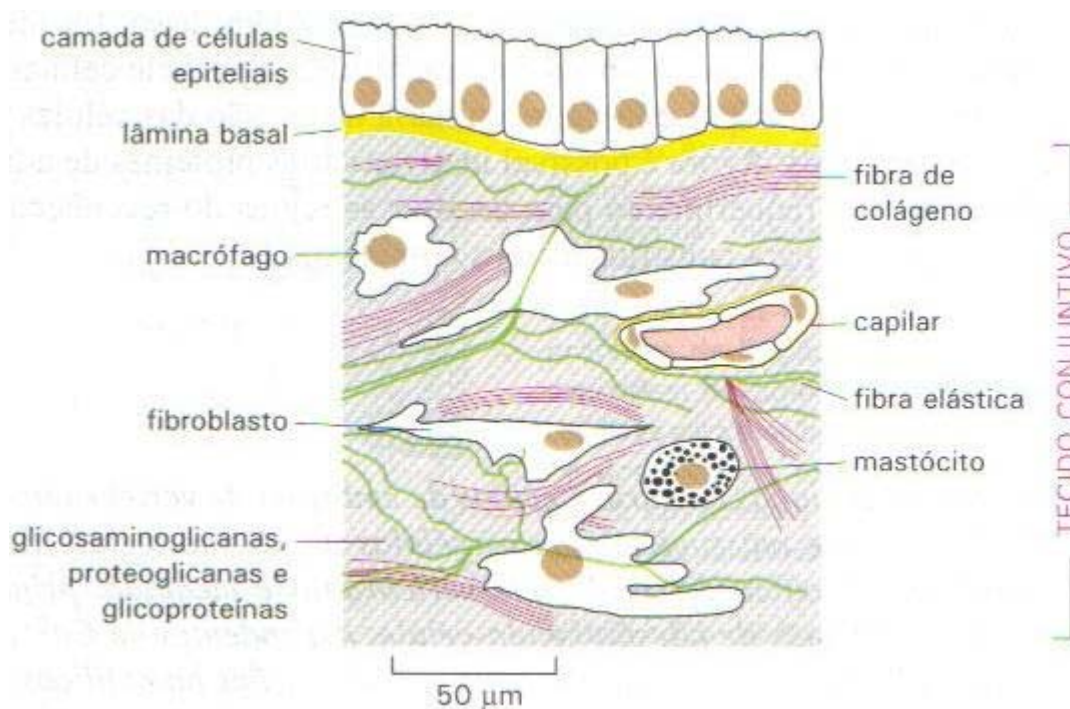


Figura 2- Esquema histológico do tecido conjuntivo e tecido epitelial de revestimento. (Alberts *et al*, 2004).

Agentes químicos, físicos, microbiológicos e mecânicos podem causar lesões teciduais. A perda da integridade de extensas porções de pele pode levar a grande disfunção ou mesmo morte (Balbino *et al*, 2005).

As células do tecido conjuntivo desempenham papel central no suporte e no reparo de quase todo tecido e órgão, e a capacidade de adaptação de seu estado diferenciado é uma característica importante das respostas a muitos tipos de lesão (Alberts *et al*, 2004).

A- Fibroblastos

Os fibroblastos são células pertencentes ao tecido conjuntivo, responsáveis pela secreção das macromoléculas da matriz extracelular, como glicosaminoglicanos e proteínas fibrosas, que incluem colágeno, elastina, fibronectina e a lamina, que exercem funções adesivas e estruturais. Em tecidos conjuntivos especializados como cartilagens e ossos encontram-se fibroblastos especializados denominados condroblastos e osteoblastos (Figura 3). (Alberts *et al*, 2004).

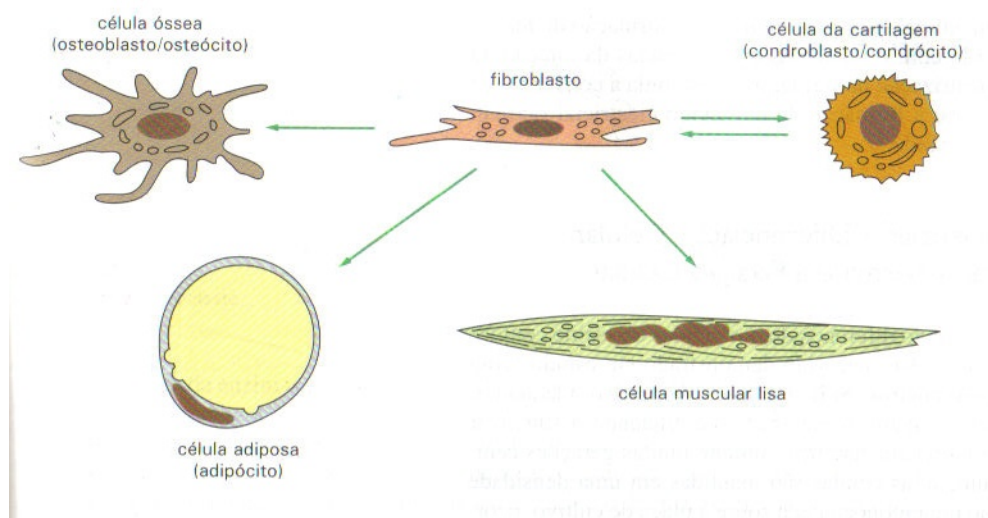


Figura 3- A família das células do tecido conjuntivo. (Alberts *et al*, 2004).

Quando um tecido é lesado, os fibroblastos próximos proliferam, migram para a região lesada e produzem grande quantidade de matriz rica em colágeno (tipos I e III), que ajuda a isolar e reparar o tecido lesado. Eles alteram a expressão gênica da actina e adquirem algumas das propriedades contráteis das células musculares lisas, auxiliando a aproximar as margens do ferimento, chamados então de miofibroblastos. Esta transformação é estimulada por fatores de crescimento como TGF- β , PDGF e IGF-I e IGF-II. (Mavioso, 2003; Maldelbaum *et al*, 2003; Alberts *et al*, 2004; Balbino *et al*, 2005)

B- Colágeno

Os colágenos são uma família de proteínas fibrosas encontradas em todos os animais multicelulares. São secretados por células do tecido conjuntivo e por grande variedade de outros tipos celulares. São o principal componente da pele e dos ossos, constituindo 25% da massa protéica total dos mamíferos (Alberts *et al*, 2004; Pimentel, 2001).

Existem 25 tipos de colágenos, com características químicas e estruturais próprias. Estas moléculas estão envolvidas, direta e indiretamente, na adesão e na diferenciação celular, quimiotaxia e outras funções importantes para o desenvolvimento e funcionamento do organismo (Tabela 1). (Alberts *et al*, 2004; Pimentel, 2001).

Tabela 1- Tipos de colágeno e suas funções. (Pimentel, 2001)

	TIPO	FÓRMULA MOLECULAR	FORMA POLIMERIZADA	DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL
Formadores de fibrilas (fibrilar)	I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	fibrila	ossos, pele, tendões, ligamentos, córnea, órgãos internos (constitui cerca de 90% do colágeno do corpo)
	II	$[\alpha 1(II)]_3$	fibrila	cartilagem, disco intervertebral, notocorda, humor vítreo do olho
	III	$[\alpha 1(III)]_3$	fibrila	pele, vasos sanguíneos, órgãos internos
	V	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ e $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	fibrila (com tipo I)	mesma para tipo I
	XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	fibrila (com tipo II)	mesma para tipo II
Associados a fibrilas	IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$ com algumas fibrilas tipo I	associação lateral com fibrilas tipo II	cartilagens
	XII	$[\alpha 1(XII)]_3$ com algumas fibrilas tipo I	associação lateral	tendões, ligamentos, outros tecidos
Formuladores de rede	IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$	rede em forma de camada	lâmina basal
	VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	fibrilas ancoradoras	abaixo do epitélio escamoso estratificado
Transmembrana	XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	não-conhecida	hemidesmossomos
Outros	XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	não-conhecida	lâmina basal ao redor dos vasos sanguíneos

Observe que os tipos I, IV e XI são compostos de 2 ou 3 tipos de cadeia α , enquanto tipos II, III, VII e XII são compostos apenas por um tipo de cadeia α . Apenas 9 colágenos são mostrados, mas cerca de 15 tipos de colágenos e 25 tipos de cadeias α foram definidos até o presente.

As moléculas típicas de colágeno (Figura 4) são constituídas por três cadeias polipeptídicas α , arranjadas em fita tripla helicoidal resultando em uma estrutura longa e rígida. São moléculas glicosiladas, sendo essencial a hidroxilação da prolina e da lisina para sua formação e desempenho de suas funções (Alberts *et al*, 2004; Pimentel, 2001).

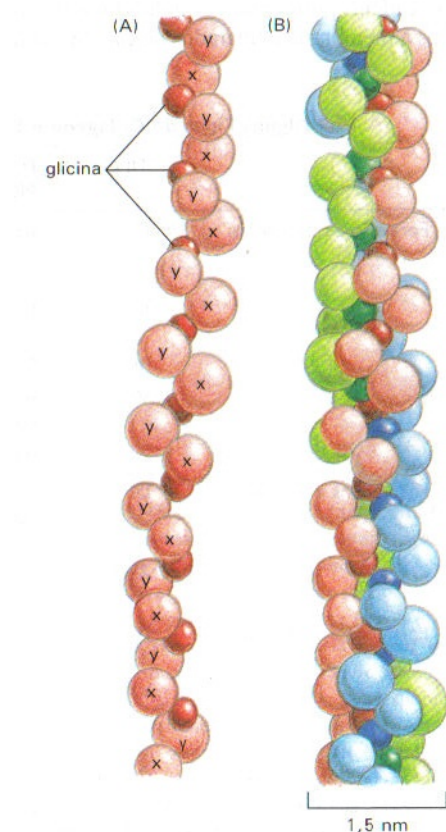


Figura 4- Estrutura de uma molécula típica de colágeno. (Pimentel, 2001)

A hidroxilação da prolina serve para a estabilidade da estrutura helicoidal e a da lisina para que ocorra a glicosilação, para participação do processo de formação de ligações cruzadas inter e intra-moleculares, que contribuem para aumentar a capacidade das fibrilas de colágeno de resistir às forças de tensão (Cilli, 2004; Gawronska-Kozak, 2004)

Estas hidroxilações dependem da presença de O_2 , α -cetoglutarato e de co-fatores, como ácido ascórbico e íon ferroso. A Figura 5 resume vários passos na síntese de colágeno (Cilli, 2004; Gawronska-Kozak, 2004).

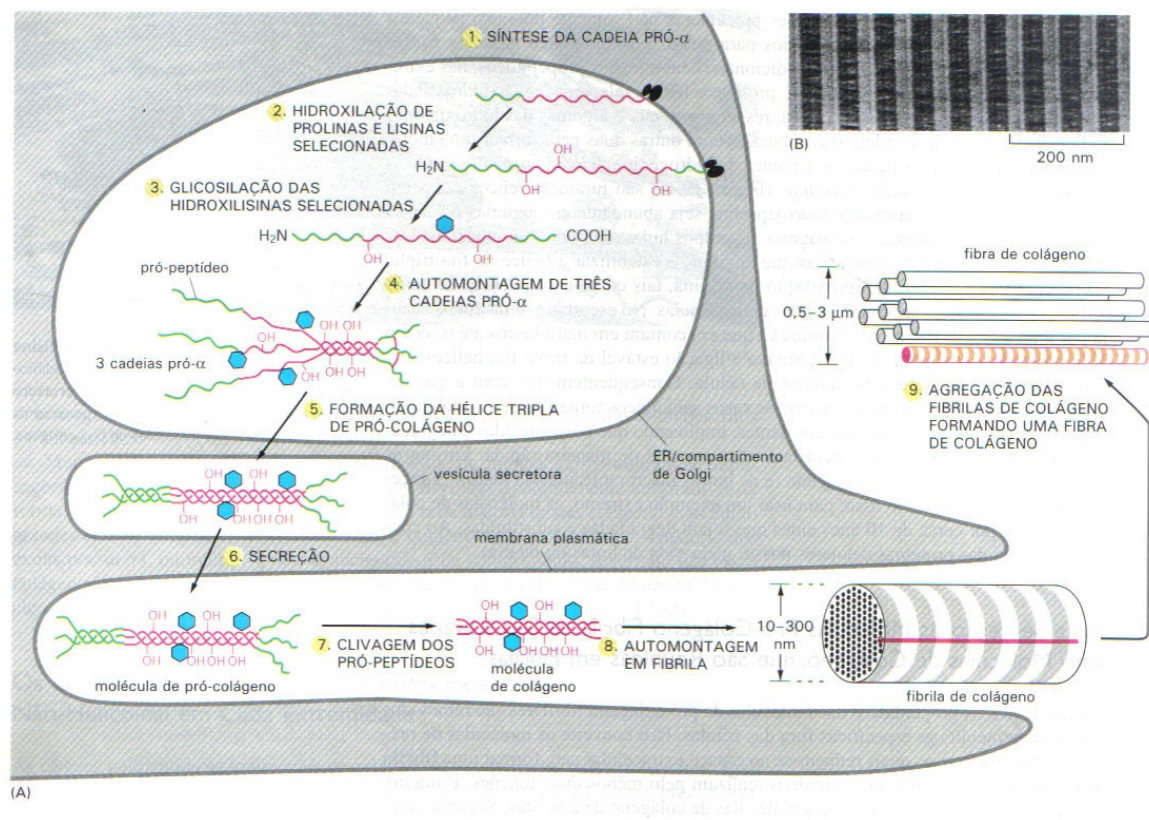


Figura 5- Os eventos intra e extracelulares envolvidos na formação da fibrila de colágeno. (Alberts *et al*, 2004)

A deficiência de ácido ascórbico enfraquece os vasos sanguíneos, causando hemorragias frequentes e fragilidade na inserção de dentes, cicatriz de baixa qualidade, devido a diminuição da quantidade de ligações cruzadas intra e intermoleculares nas fibrilas de colágeno (Pimentel, 2001).

Os principais tipos de colágeno encontrados no tecido conjuntivo são os do tipo I, II, III, V, e XI, sendo o do tipo I o principal da pele e dos ossos e o mais comumente encontrado (Pimentel, 2001).

Após serem secretadas para o espaço extracelular, as moléculas de colágeno reúnem-se em polímeros denominados fibrilas de colágeno, que são reforçadas pela formação de ligações covalente cruzadas entre as lisinas das moléculas de colágeno.

(Alberts *et al*, 2004; Pimentel, 2001). Fatores de crescimento como o IGF-I, que é expresso por células epidérmicas, macrófagos e outras células inflamatórias após 1 e 3 dias da lesão, demonstrou aumentar a expressão da cadeia pro-alfa 1(I) e da pró-alfa 1(III) do procólágeno em cultura de fibroblastos da derme .(Balbino *et al*, 2005).

2- Cicatrização

A cicatrização é um processo complexo e dinâmico que resulta na restauração da função e da continuidade anatômica. Este processo pode ser dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e remodelamento. Alterações em uma destas fases levam a uma lentidão no processo cicatrização ou até mesmo a não cicatrização (Mavioso, 2003).

A úlcera cutânea em cicatrização é um tecido extremamente complexo e dinâmico que em determinados aspectos, poderia ser considerado como um órgão, mesmo que temporário (Kumar *et al*, 2004).

A- Fase Inflamatória

Após o trauma, são liberados mediadores celulares, os quais estimulam a elaboração de substâncias, que desenvolvem o fenômeno inflamatório (histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e tromboxanes, linfocinas, interleucina 1 e 2) (Maldelbaum, 2003).

A ruptura de vasos sanguíneos nas lesões é quase que inevitável, ocorrendo então imediatamente o processo de hemostasia que se inicia com a agregação plaquetária para evitar grandes perdas sanguíneas. O colágeno subendotelial exposto é agonista nesta agregação plaquetária. A plaqueta ativada aumenta a ação da protrombinase que transforma a protrombina em trombina, aumentando a adesão plaquetária. Estas plaquetas liberam fatores de crescimento como o TGF- β e o PDGF, que auxiliam na migração de células envolvidas na resposta inflamatória, com a vasodilatação causando dor calor e rubor (Balbino, 2005; Maehata, 2007).

As células de defesa mais abundantes no sangue são os neutrófilos que migram em abundância para formação de uma barreira protetora contra invasão de microorganismos e desbridamento do tecido necrosado, para isto liberarem protease e espécies reativas de oxigênio (ROS). Um processo inflamatório exacerbado leva a uma liberação exagerada de ROS que prolongam a fase inflamatória, dificultando cicatrização (Mensah *et al*, 2001, Panchatcharam, 2006).

Os macrófagos acumulam-se no local no segundo dia após a lesão para auxiliar os neutrófilos, tendo como principal função a liberação de fatores de crescimento e citocinas essenciais na maturação da reação inflamatória e na iniciação do processo de cura da ferida, já que ativa a proliferação de fibroblastos (Balbino *et al*, 2005).

B- Fase Fibroblástica

A ativação de fibroblastos é intensificada com a liberação de mediadores químicos, liberados por macrófagos. Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação juntamente com as células endotelial fazendo a reparação do tecido conjuntivo. (Balbino *et al*, 2005).

Inicia-se a fibroplasia juntamente com a neovascularização. A fibroplasia é a formação do tecido de granulação formada por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que estão suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno. A neovascularização é essencial para as trocas gasosas e nutrição das células metabolicamente ativadas. A síntese de colágeno nas paredes dos vasos é essencial para a firmeza e integridade do novo vaso (Maldelbaum, 2003).

Os fibroblastos vão sofrendo modificações fenotípicas, apresentando reticulo endoplasmático rugoso abundante, devido a síntese protéica. Transforma-se em miofibroblastos e auxiliam na contração da lesão (Alberts *et al*, 2004; Pimentel, 2001).

Ao final, a ferida está totalmente preenchida pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida pela neovascularização e as fibras colágenas dão à região lesionada a aparência de cicatriz (Maldelbaum, 2003).

C- Fase de Remodelamento

A fase final da cura de uma ulceração corresponde a maturação e remodelagem da matriz extracelular. É durante esta fase que a cicatriz adquire sua máxima resistência tensil (Ozgen *et al*, 2006).

Sinalizadores como IGF-I exercem influências sobre os fibroblastos, acentua-se a deposição de colágeno, surgindo as primeiras fibras colágenas do tipo I. Este processo envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras de colágeno. A deposição de colágeno é feita de maneira aleatória tendo como orientação da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Repetições sucessivas de lise, ressíntese, redirecionamento e religação formam fibras maiores de colágeno e resultam numa configuração mais regular da cicatriz. Isso aumenta a sua resistência devido à organização das fibras acompanharem as forças mecânicas que o tecido está sujeito durante a atividade normal. Este processo ocorre lentamente, levando meses ou anos, uma cicatriz madura tem 70% da resistência da pele normal (Balbino *et al*, 2005).

3- Úlcera gástrica

Entre as diversas regiões do organismo, o estômago é a que possui o ambiente mais peculiar principalmente pela quantidade elevada de ácido clorídrico, que mantém o pH entre 0,9 e 2,0. Esse ambiente ácido, além de participar da digestão, desempenha um papel de extrema importância impedindo a entrada de muitos microorganismos e, portanto, protegendo o organismo de agentes infecciosos. No entanto, isso faz com que as mucosas estomacal e duodenal fiquem expostas à ação do ácido e da pepsina, responsáveis pelo início do processo de digestão (Bighetti *et al*, 2002).

Por definição, entendem-se como úlceras pépticas lesões do epitélio gastrointestinal que atingem a muscular da mucosa (Figura 6). Segundo sua localização, as úlceras pépticas podem ser classificadas em gástricas ou duodenais, sendo ambas histologicamente semelhantes (Monteiro, 2006).

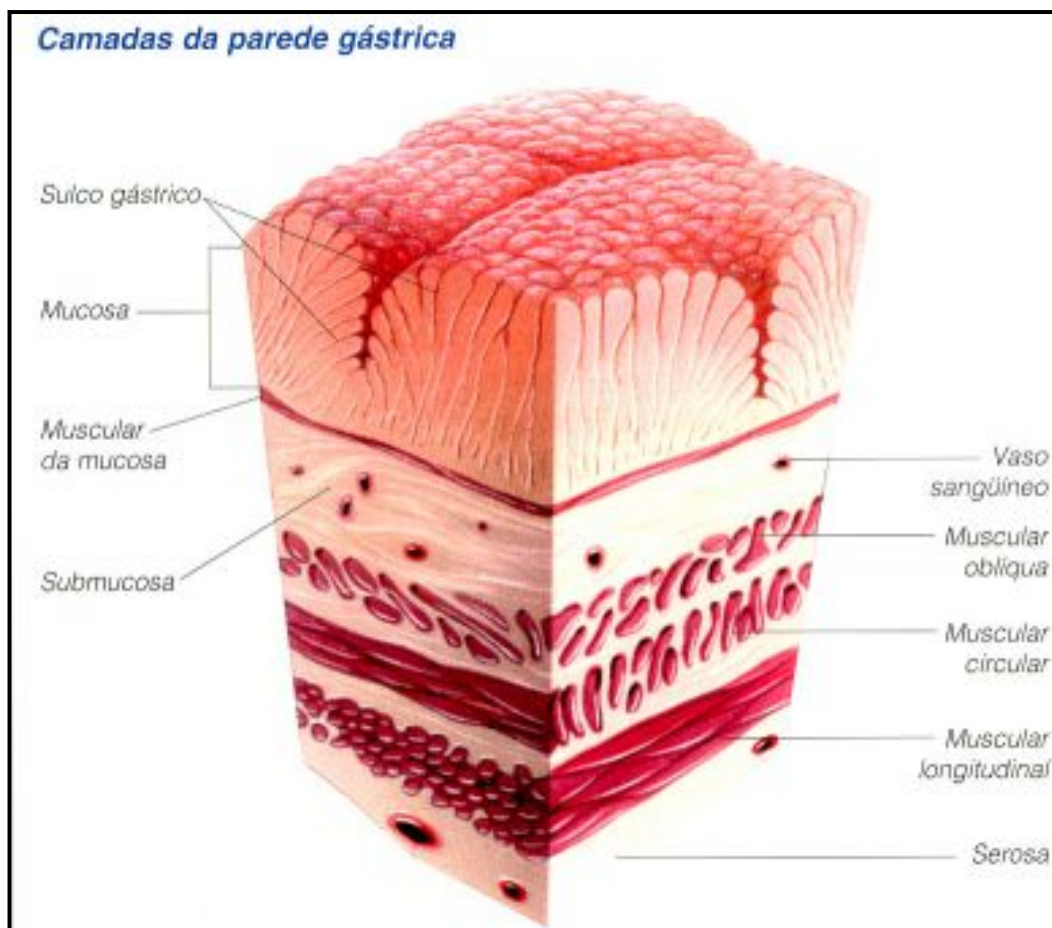


Figura 6- Representação de corte da parede gástrica (<http://www.gastronet.com.br>)

Em condições normais, essa mucosa possui mecanismos de defesa contra a ação do ácido e da pepsina, além de protegê-la contra agentes agressivos exógenos como etanol (Rajendram & Preedy, 2005), fumo (Afridi, 2003; Ma *et al*, 1999), uso freqüente de drogas antiinflamatórias não esteroidais (Motilva *et al*, 2005), presença de *Helicobacter pylori* e estresse (Pajares & Gisbert, 2006).

A úlcera gástrica é uma patologia complexa e multifatorial, cuja etiologia está relacionada com o desequilíbrio entre os fatores agressores e os defensores da mucosa gástrica. Durante o processo digestivo, essa mucosa está continuamente exposta ao ácido clorídrico e pepsina secretados. A produção de muco citoprotetor e bicarbonato criam uma barreira que neutraliza a ação do ácido sobre as células. Tal peculiaridade faz com que o

controle da secreção, da digestão e da produção de fatores citoprotetores seja de extrema complexidade, com a participação do sistema nervoso central, plexo mioentérico, sistema nervoso autônomo, hormônios, neurotransmissores e autacóides (Brzozowska *et al*, 2004).

A- Secreção gástrica

A secreção ácida gástrica é regulada por mecanismos centrais e periféricos. A regulação central envolve a estimulação vagal pelo sistema nervoso central (mediada por receptores muscarínicos M_1) e conseqüente liberação de neurotransmissores das fibras pós-ganglionares no epitélio gástrico. A regulação periférica, por sua vez, compreende os eventos de exocitose em células endócrinas gástricas e intestinais, estimuladas principalmente pela histamina, acetilcolina e pela gastrina (Schubert, 2000).

Os neurônios entéricos secretam pelo menos uma dúzia de neurotransmissores cujas funções, da maioria deles, não são ainda totalmente conhecidas (Holzer, 2006). Acetilcolina e a noradrenalina são os mais estudados e provavelmente os mais influentes sobre esse sistema, onde o primeiro estimula suas funções enquanto o outro diminui. A adrenalina liberada pela glândula adrenal também exerce efeitos inibitórios sobre o trato gastrointestinal. Trifosfato de adenosina, serotonina, dopamina, colecistocinina, substância P, peptídeo intestinal vasoativo, somatostatina, leu-encefalina, met-encefalina também são neurotransmissores liberados pelo plexo mioentérico onde alguns têm ações estimulantes e outras inibitórias (Monteiro, 2006).

B- Mecanismos de defesa gástrica

Os mecanismos de defesa da mucosa gástrica podem ser didaticamente divididos em proteção pré-epitelial, epitelial e subepitelial (Guha & Kaunitz, 2002).

A proteção pré-epitelial é constituída pela barreira muco-bicarbonato, que auxilia na prevenção dos efeitos lesivos do conteúdo gástrico secretado. O muco, constituído principalmente por mucinas glicoproteicas, é secretado no lúmen

gastroduodenal pelas células epiteliais superficiais, pelas células do colo glandular e pelas glândulas submucosas de Brunner. É armazenado em grânulos no citoplasma das células mucosas do colo e nas células epiteliais superficiais, antes de ser liberado por exocitose (Allen & Flemstrom, 2005).

Diversos secretagogos estimulam a secreção de mucinas no estômago. Dentre eles estão os agonistas muscarínicos, os agonistas β -adrenérgicos, a substância P, o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), as prostaglandinas (E_1 , E_2 , $F_{2\beta}$, I_2) e a secretina. O Ca^{2+} , a proteína quinase C e o AMP_C , são os principais mediadores intracelulares envolvidos nos processos de secreção de mucinas (Forstner & Forstner, 1994).

O bicarbonato é produzido e secretado pelas células epiteliais superficiais da mucosa gástrica e pelas células de Brunner duodenais, tornando a secreção mucosa alcalina. A secreção gástrica do bicarbonato é estimulada pelo odor, paladar, visão e pensamento nos alimentos (fase cefálica), pelo ácido no lúmen gástrico (fase gástrica) e pelo ácido gástrico no lúmen duodenal (fase duodenal).

O peptídeo intestinal vaso ativo, as prostaglandinas e os agonistas muscarínicos também estimulam esta secreção. A ativação do sistema nervoso simpático (em situações de estresse) é capaz de inibir a secreção gástrica de bicarbonato (Takeuchi *et al*, 2005). A proteção epitelial é garantida pelas propriedades intrínsecas das células epiteliais presentes na mucosa gástrica, graças à sua morfologia e características bioquímicas. Essas propriedades incluem a) o caráter hidrofóbico da mucosa que impede a difusão de íons hidrogênio, b) a presença de compostos sulfidrílicos não-proteicos, capazes de seqüestrar ânions superóxido e proteger diretamente a camada de muco dos radicais livres, e c) a capacidade de renovação tecidual através de migração e proliferação celular, apresentando um dos menores tempos de renovação dos tecidos corporais (Qiao *et al*, 2006).

A proteção subepitelial envolve fatores que permitem a manutenção dos processos de proteção pré-epiteliais. São eles, o fluxo sangüíneo e a motilidade gastrointestinal. O fluxo sangüíneo garante o aporte adequado de oxigênio, nutrientes e hormônios, removendo os íons hidrogênio que penetram a barreira muco-bicarbonato e, nas células epiteliais, permitindo a rápida restituição de uma lesão epitelial

(Clarke & Thompson, 2002). Alterações na motilidade gastrointestinal participam nos processos de defesa gástrica (Ephgrave *et al*, 1998). A redução do esvaziamento gástrico e a atividade motora do antro mediada por óxido nítrico endógeno refletem uma ação protetora deste mediador liberado por neurônios motores inibitórios. De forma similar, as prostaglandinas possuem atividade relaxante da musculatura gástrica (Holzer, 2000).

C- Mediadores da defesa gástrica

Dentre os mediadores endógenos relacionados à defesa gástrica destacam-se as prostaglandinas (principalmente PGE₂ e PGI₂), o óxido nítrico, os neuropeptídeos (CGRP) e as taquicinininas (substância P, neurocinina A-NKA).

As prostaglandinas são eicosanóides sintetizados a partir do ácido araquidônico pela ação das cicloxigenases (Monteiro, 2006). São encontradas em altas concentrações no trato gastrointestinal e são capazes de aumentar o fluxo sanguíneo, estimular a síntese de muco e bicarbonato, promover a manutenção dos grupos sulfidrílicos, bem como reduzir a secreção ácida gástrica e a motilidade gástrica (Martin & Wallace, 2006).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir dos átomos de nitrogênio no terminal guanidina da L-arginina. Existem duas classes de enzimas que estão envolvidas em sua síntese, a saber, a NO sintase constitutiva (com atividade cálcio-dependente) e a NO sintase indutível (com atividade independente de cálcio). A primeira está presente em altas concentrações na mucosa gástrica, em diversos tipos celulares, tais como células produtoras de muco, músculo liso, corpos celulares de neurônios do plexo mioentérico e células endoteliais.

Essa ampla distribuição reflete a ampla participação do NO nos processos fisiológicos desse órgão, tais como a secreção de muco e bicarbonato, regulação do fluxo sanguíneo, modulação do tônus muscular e regulação da secreção ácida gástrica (Wallace, 2006). Entretanto, altas concentrações de NO produzidas pela ação da NO sintase indutível são lesivas à mucosa gástrica.

Os mediadores que participam do chamado “sistema neural de emergência” são o peptídeo CGRP e as taquicinas (substância P e NKA), cujas ações são mediadas pelo NO. Esse sistema envolve a estimulação de fibras nervosas aferentes sensoriais presentes no trato gastrointestinal, plexo mioentérico, camada muscular circular e mucosa gástrica, facilitando os processos de defesa pré-epitelial (Holzer, 2000).

A maioria dos hormônios e neurotransmissores que atuam no sistema digestivo também possuem outras funções no organismo e, portanto, drogas que interagem com alguma dessas substâncias podem também exercer outras funções no organismo. Dessa forma, modelos experimentais utilizando o sistema digestório, ou partes dele, podem ser de grande utilidade para a descoberta de novas drogas.

A Divisão de Farmacologia e Toxicologia (CPQBA/Unicamp) utiliza modelos experimentais de úlcera gástrica e de secreção estomacal, pois são modelos de custos relativamente baixo que necessitam basicamente de animais de laboratório e alguns reagentes.

4- Plantas medicinais

Até meados do século XX as plantas medicinais e os seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando a síntese química, no final do século XIX, iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso. Atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 25% são de origem vegetal, isolados diretamente ou produzidos por síntese partindo-se de um precursor vegetal. (Newman & Cragg, 2007).

Algumas estimativas revelam a existência de aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores em todo o mundo. Entretanto, dados disponíveis revelam que apenas 17% das plantas já foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal. Portanto, essa flora representa um potencial enorme para obtenção de novas moléculas para a descoberta de novos medicamentos (Hamburger *et al*, 1991; Cragg & Newman, 2005, Newman & Cragg, 2007).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Considerando-se que mais da metade dessas espécies se encontram nas florestas tropicais, cuja área corresponde a apenas 7% da superfície da terra, essas regiões devem ser consideradas como prioritárias no estabelecimento de programas de conservação *in situ* de germoplasma vegetal (Guerra & Nodari, 2007).

O tratamento medicamentoso na cicatrização também acompanha a história, uso de extratos de plantas ou parte, utilizados na cicatrização, é relatado desde a pré-história com o avanço da tecnologia passou a ser substituído por soluções de iodo e cloro, no século XIX, e por pomadas contendo enzimas ou princípios ativos, como a alantoína, que é encontrada em diversas espécies vegetais e já pode ser obtida por síntese orgânica (Blanes, 2004; Oliveira *et al*, 2001).

Com o intuito de se utilizar princípios ativos naturais, as prefeituras de diversas cidades do Brasil passaram a adotar o uso de fitoterápicos. Em Campinas o tratamento de feridas com pomadas fitoterápicas, de extratos de plantas ou enzimas isoladas, popularmente e cientificamente conhecidas, como os extratos de Calêndula, Babosa, Hamamelis, Camomila e as enzimas papaverina e bromelina, se tornou prioritário, principalmente em pacientes que apresentam doenças metabólicas, estão acamados e cadeirantes, o que dificulta o processo cicatrizante (Pimentel, 2002).

A- *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot

A espécie *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot, conhecida popularmente como pariri (no Pará), crajiru (no Amazonas), puca-panga, coapiranga, chica ou cipó-cruz é nativa de quase todo o Brasil e muito comum na Floresta Amazônica. Pertence à família Bignoniaceae, que compreende 120 gêneros com cerca de 800 espécies, distribuídas pelas regiões tropicais da América do Sul e da África (Von-Poser, 2000).

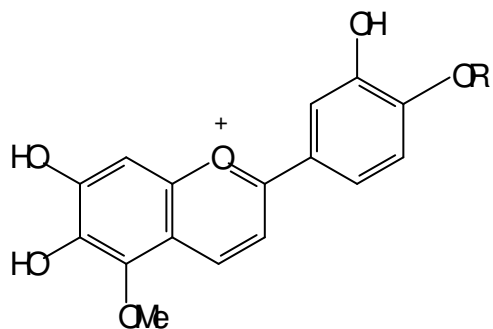
O gênero *Arrabidaea* ocorre na América tropical desde o sul do México até o Brasil central. Uma ampla revisão bibliográfica indicou que este gênero é fonte de antocianinas, flavonóides e taninos (Harborne, 1967; Takemura 1995; Zorn, *et al*, 2001;

Devia, *et al*, 2002; Alcerito, 2002; Pauletti *et al*, 2003). As espécies pertencentes ao gênero *Arrabidaea* são usadas na medicina tradicional para assepsia de feridas e tratamento de distúrbios intestinais (Corrêa, 1926). Pauletti, *et al*. (2003) descobriram novas glicosilxantonas isoladas do caule de *Arrabidaea samydoides* que apresentaram propriedades antioxidantes. Alcerito *et al*. (2002) isolaram quatro flavonóides com atividade antifúngica das folhas de *A. brachypoda*.

No nordeste do Brasil, *A. chica* é usada em tatuagens pelos índios devido aos pigmentos carajurina e carajurona (Corrêa, 1926; Chapman *et al*, 1927; Zorn *et al*, 2001). As folhas submetidas à fermentação e manipuladas como as anileiras (*Indigofera* spp.) fornecem matéria corante vermelho-escuro ou vermelho-tijolo. Algumas tribos preparam uma infusão das folhas para o tratamento de conjuntivite aguda, e uma pasta, na forma de cataplasma, contra ataque de insetos. São atribuídos à espécie *Arrabidaea chica* propriedades terapêuticas para enfermidades da pele (psoríase, empinagem, feridas, úlceras), propriedades adstringentes, contra cólica intestinal, diarreia com sangue, piodermite e corrimento vaginal. Há ainda relatos de eficácia como antiinflamatório e contra câncer de boca, de útero e leucemia (Kalil Filho *et al*, 2000).

O primeiro estudo fitoquímico das folhas de *A. chica* (Chapman *et al*, 1927) relata o isolamento de 3-deoxiantocianidina (carajurina). Posteriormente, Scogin (1980) e Harborne & Willians (1998) propuseram que a ocorrência deste raro pigmento em Bignoniaceae era provavelmente restrita a *A. chica*. Estudos posteriores resultaram no isolamento de antocianinas, fito-esteróis, 7,4'-di-hidroxi-5-metaxiflavona e 6,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavona (carajuruflavona) (Takemura *et al*, 1995).

Williams & Grayer (2004) citam que mais de 50 novas antocianinas foram isoladas a partir de plantas, não somente das pétalas das flores, mas também de frutos, folhas e sementes. Dentre as novas agliconas destacam-se a 3-deoxiantocianidina, a 6,7,3'-trihidroxi-5-dimetoxiflavilium (**1**) e a 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-flavilium (**2**) (Figura 7), que foram isoladas das partes aéreas da *A. chica* juntamente com a conhecida 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium (carajurina).



1 R= Me

2 R= H

Figura 7- Agliconas isoladas das folhas de *A. chica*

❖ Biossíntese das Antocianinas

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenois, biossintetizados a partir dos fenilpropanoides. São produtos derivados da cinamoil-CoA com extensão da cadeia com 3 moléculas de malonil-CoA (Figura 8). As antocianinas são compostos produzidos na via biossintética dos flavonóides (Figura 9) (Dewick, 2006).

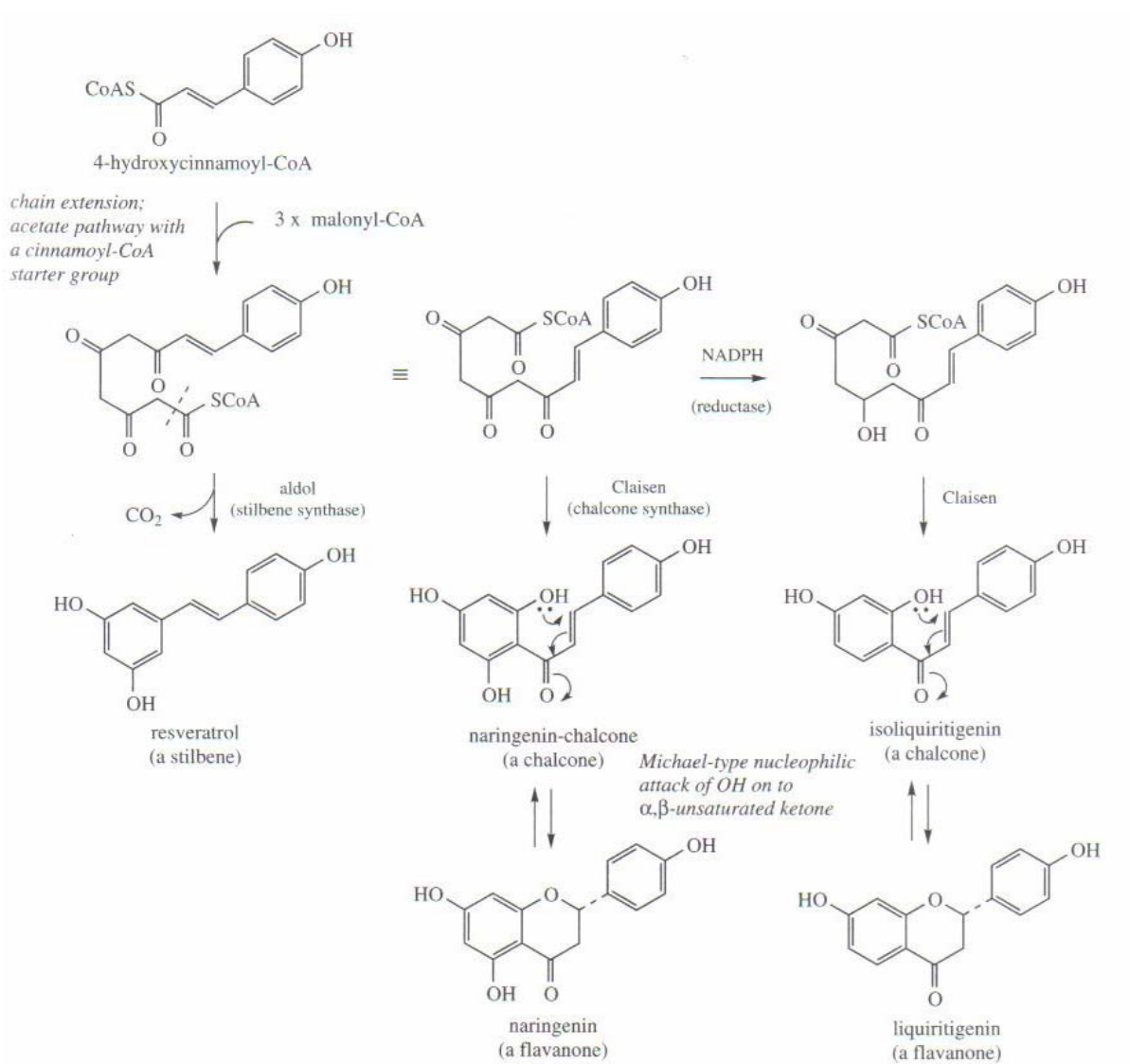


Figura 8- Esquema da biossíntese da Flavona. (Dewick, 2006).

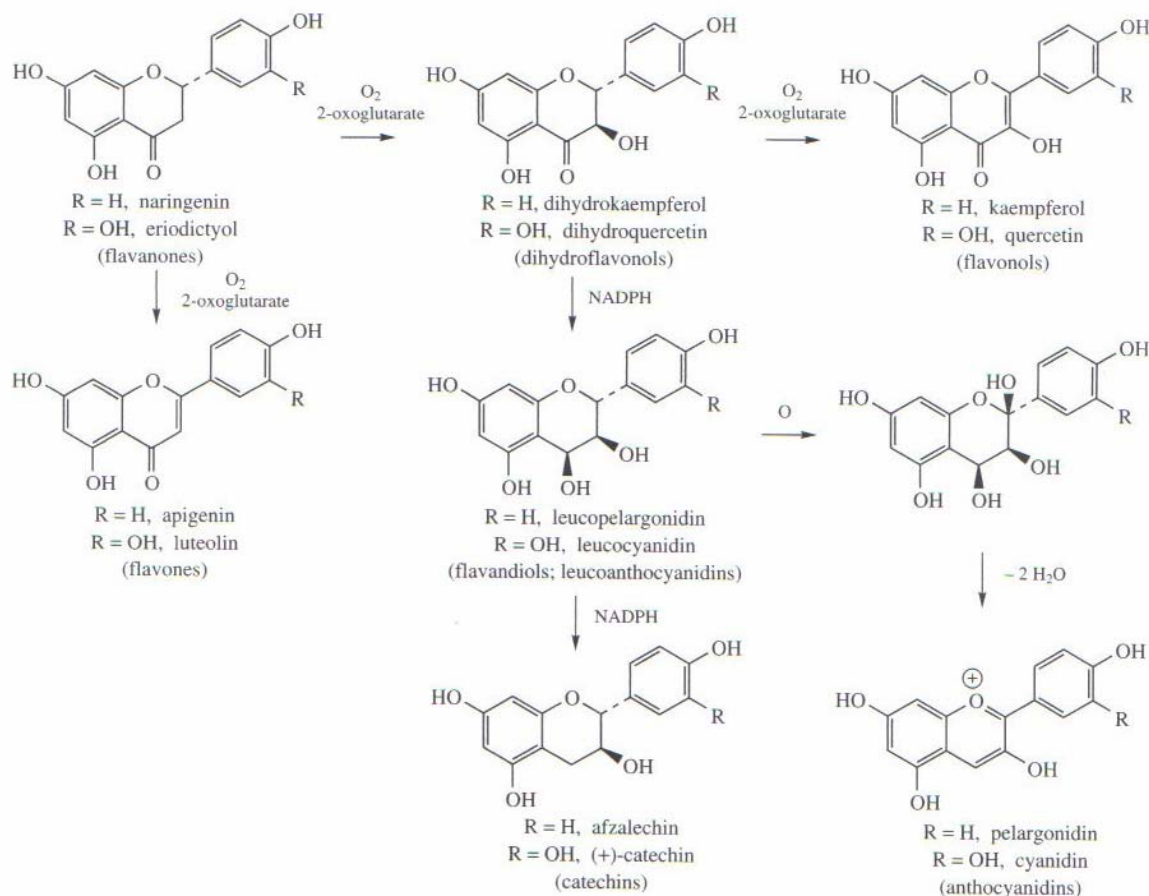


Figura 9- Esquema da biossíntese de antocianinas a partir dos flavonóides.(Dewick, 2006).

As antocianinas são corantes naturais raramente isoladas e identificadas devido à sua grande instabilidade. Elas são flavonóides glicosilados formados por antocianidinas (aglicona) e açúcares.

As antocianidinas (**3**, estrutura básica) mais freqüentes na natureza são pelargonidina (**4**), cianidina (**5**), peonidina (**6**), petunidina (**7**) e malvidina (**8**) (Figura 10). Os açúcares mais encontrados nas antocianinas são glicose, ramnose, galactose e arabinose). Estes açúcares ocorrem como monoglicosídeos e triglicosídeos substituídos diretamente na glicona nas posições 3, 5 e 7 (Mazza & Miniati, 1993). As antocianinas desempenham importante papel nas interações de insetos com plantas para a polinização e dispersão de sementes. Também apresentam um papel importante nas interações alelopáticas ligadas à defesa contra insetos predadores.

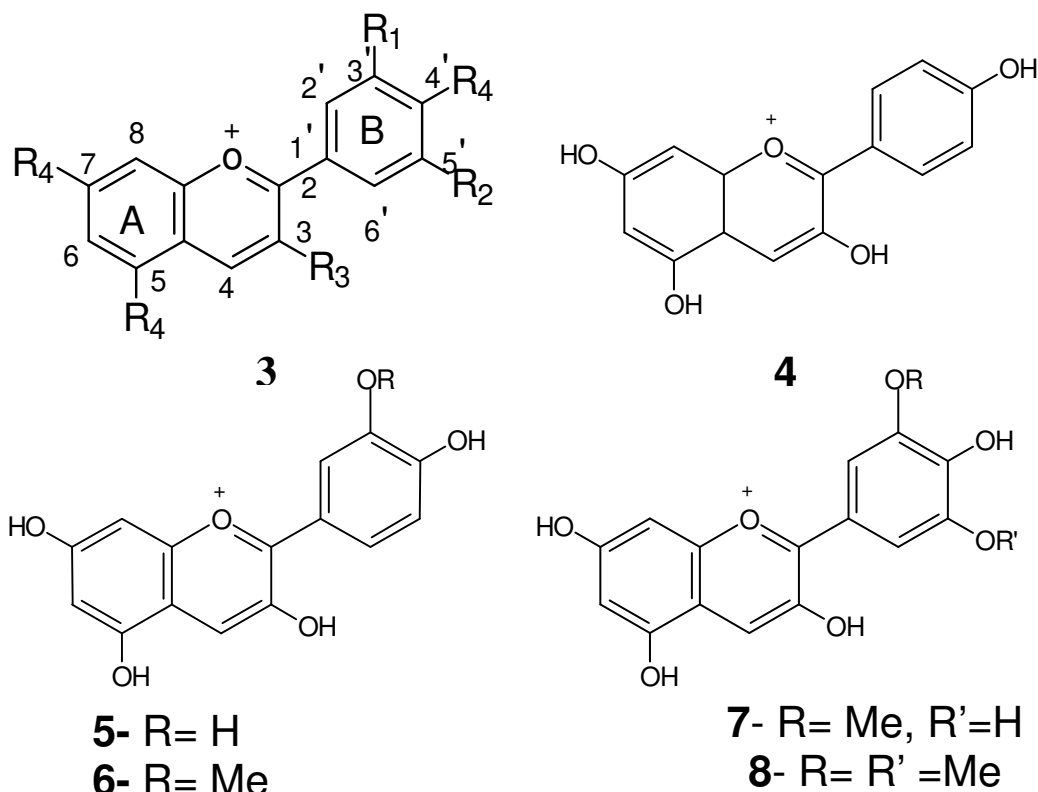


Figura 10- Antocianidinas mais freqüentes.

Estudos farmacológicos com antocianinas destacam o alto poder antioxidante em doenças metabólicas. As antocianinas de frutas vermelhas, como framboesa, mirtilo, amora e morango, demonstraram alta capacidade de absorverem radicais de oxigênio, além da ação antiesclerótica e antiangiogênica e potencial citotoxicidade combatendo *Helicobacter pylori*, um patógeno nocivo que causa diversas doenças gastrointestinais incluindo úlcera duodenal e câncer gástrico (Zafra-Stone *et al*, 2007).

O suco de fruta de *Aronia melanocarpa* rico em antioxidantes fenólicos, principalmente flavonóides e antocianinas demonstraram significativa redução de glicose sanguínea em ensaios com ratos diabéticos (Valcheva-Kuzmanova *et al*, 2007). *Vaccinium angustifolium* Ait. (Lowbush blueberry), também rica em antocianinas, também apresentou poder antidiabético (Harris *et al*, 2007).

O extrato rico em antocianinas de Black Rice (*Oryza sativa* L. *indica*), administrados em ratos submetidos a dieta de ração de frutose, foi capaz de prevenir e evitar a hiperlipidemia e resistência à insulina, induzido por uma dieta de alto teor de frutose. O mecanismo pode estar relacionado principalmente a inibição de estresse oxidativo e melhoramento do perfil lipídico do plasma, indicando que o extrato rico em antocianinas de Black Rice promete ser um potente ingrediente nutracêutico, de grande importância clínica que poderá evitar diabetes e síndrome metabólica. (Guo *et al*, 2007).

Estudos demonstraram que o tratamento de adipócitos humanos com antocianina pode controlar a expressão do gene de adipocitocina melhorando as funções relacionada a obesidade e diabetes (Tsuda *et al*, 2006). Além disso, apresenta atividade antiinflamatória e anticâncer devido sua ação antioxidante (Kong *et al*, 2003).

Uma vez que as folhas de *Arrabidaea chica* são ricas em antocianinas e são utilizadas em medicina popular, este trabalho buscou comprovar a ação cicatrizante de *Arrabidaea chica* através de testes farmacológicos *in vitro* e *in vivo*.

OBJETIVOS

1- Objetivo geral

Avaliar atividade cicatrizante do extrato bruto metanólico de folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot.

2- Objetivos específicos

Avaliar a atividade sobre a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno *in vitro*;

Avaliar a atividade antiinflamatória e a capacidade antioxidante;

Comprovar a atividade cicatrizante através do tratamento de ulcerações cutâneas e gástricas.

MATERIAL E MÉTODOS

1- Estudo fitoquímico

Estes estudos foram realizados na divisão de fitoquímica, do CPQBA-UNICAMP, sob supervisão da Profa. Dra. Mary Ann Foglio.

Foram utilizados solventes Grau P.A. Os adsorventes utilizados foram sílica gel 60 (0,040-0,063mm) Merck, cartucho C18 Supelco, celulose microcristalina para cromatografia Merck. As análises por cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolha de alumínio, sílica gel 60 F₂₄₅ (Merck). A detecção dos compostos foi feita com lâmpada UV a 254 e 366nm e, posteriormente, com reagente específico. Foram feitas análises por espectrofotômetro UV-Vis Beckman Du-70.

A- Obtenção do material vegetal

Foram coletadas folhas do acesso 06 (germoplasma oriundo de Manaus) de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot, cultivado no campo experimental do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP, localizado no município de Paulínia (22° 45' 00''Sul e 47°10'21''Oeste), Estado de São Paulo. (Figura 11). Excicata depositada sobre o número1348, no herbarium do CPQBA. Dra. Glyn Mara Figueira foi a responsável pela identificação.

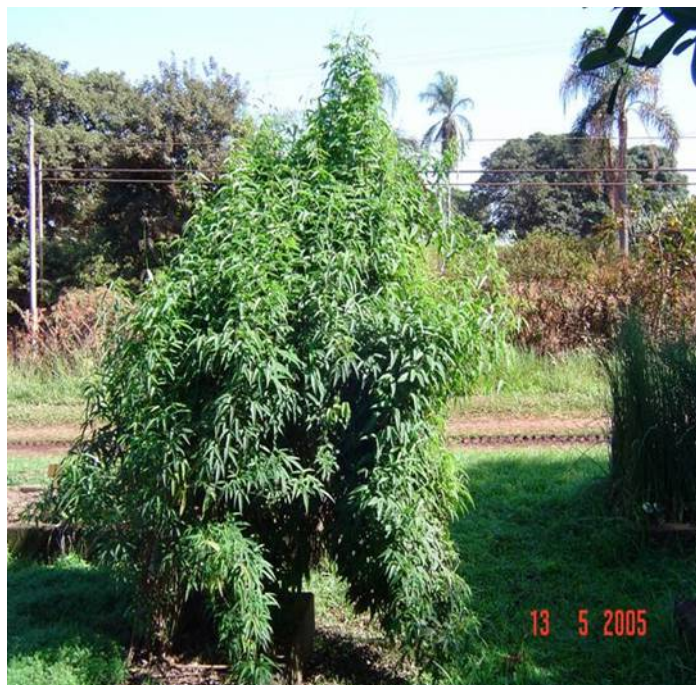


Figura 11- Exemplar de *Arrabidaea chica*, cultivado no campo experimental do CPQBA/UNICAMP.

B- Preparação de extratos vegetais

Folhas secas (10 g) foram moídas em um triturador de facas (Stephen, UM 40) e extraídas, por maceração, três vezes com uma mistura de metanol/ácido cítrico 0,3%, na proporção de 1:5 (v/v), protegido da luz, em agitador oscilatório. O extrato foi filtrado, seco com Na_2SO_4 anidro, filtrado novamente e o solvente eliminado sob vácuo a 40° C, protegido da luz e em seguida liofilizado (Virtis modelo 8L) (Figura 12).

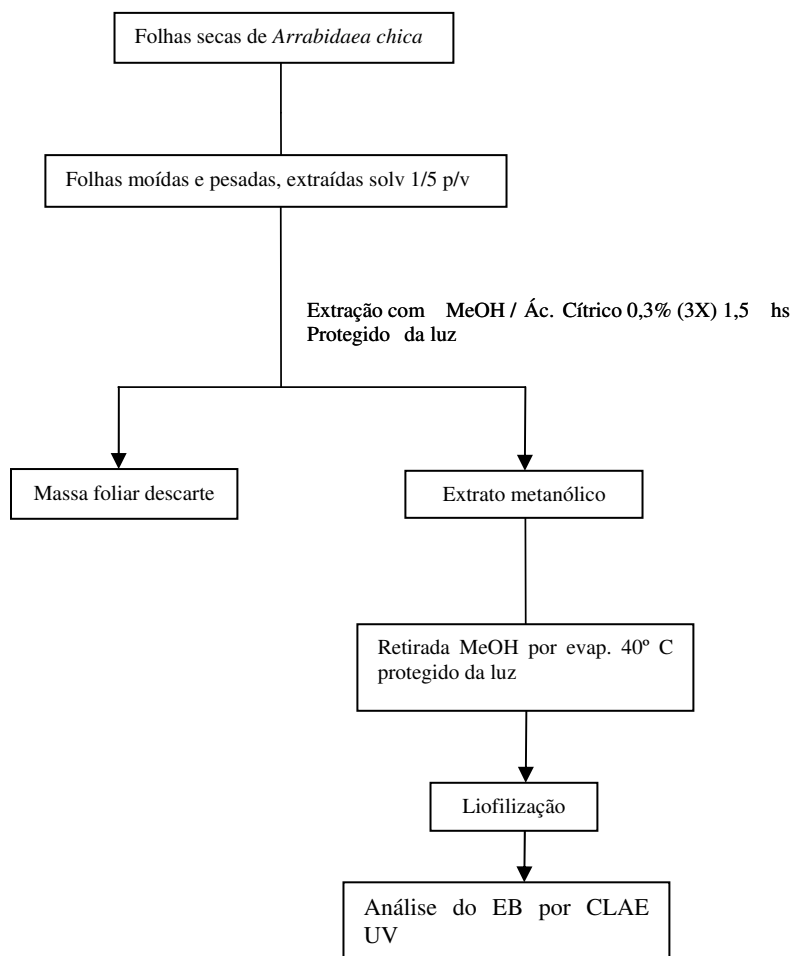


Figura 12- Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto metanólico (EB).

2- Testes de atividade farmacológica *in vitro*

A- Ensaio de indução de crescimento com fibroblastos *in vitro*:

Este ensaio foi desenvolvido de acordo com Mensah *et al* (2001) com pequenas modificações. Fibroblastos humanos, doados pela Allergisa Pesquisa Dermato-Cosmética Ltda, foram usados para este experimento. . Inoculou-se 100µL/compartimento de uma suspensão de fibroblastos (densidade de inoculação de 1×10^3 cel/mL) em meio DMEM/Soro Fetal Bovino (SFB) 10%, em placas de 96 compartimentos. em meio.

Foi preparada uma placa T_0 que submetida à avaliação por MTT para quantificação das células presentes na placa teste no momento da inoculação das amostras. Após 24h de incubação (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO₂), todo o meio foi aspirado, foram adicionados 100µL/compartimento de meio DMEM suplementado com 0,3% de SFB e as placas foram incubadas por 48h (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO₂). Ao final desse período, foram adicionados 100µL/compartimento das amostras a serem testadas, em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL), seguindo o modelo apresentado na Figura 13. O controle positivo foi alantoína, nas mesmas concentrações das amostras.

As placas foram então incubadas por 72h. Ao final desse período, todo o meio foi aspirado e substituído por meio DMEM/SFB 10%, e as células foram mantidas em estufa por 24h, antes da coloração com MTT (Mosmann, 1983). Para essa coloração, todo o meio foi aspirado e trocado por meio DMEM/SFB acrescido de MTT (0,5%). As placas foram incubadas por 4h (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO₂) protegidas da luz. Depois desse período, o meio foi trocado por dimetilsulfóxido e a leitura espectrofotométrica foi realizada a 570 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												



Branco do meio de cultura (sem células)



Branco da suspensão celular



Branco das amostras teste



Suspensão celular na presença da amostra 1 em quatro concentrações distintas



Suspensão celular na presença da amostra 2 em quatro concentrações distintas



Suspensão celular na presença da amostra 3 em quatro concentrações distintas



Suspensão celular na presença da amostra 4 em quatro concentrações distintas



Suspensão celular na presença da amostra 5 em quatro concentrações distintas

Figura 13- Esquema da placa teste (T1).

B- Síntese de colágeno *in vitro*

Este ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo publicado por Cilli *et al* (2004) com pequenas modificações. Fibroblastos humanos, doados pela Allergisa Pesquisa Dermato-Cosmética Ltda, foram usados para este experimento. Inoculou-se 100µL/compartimento de uma suspensão de fibroblastos (densidade de inoculação de 1×10^3 cel/mL) em meio DMEM/SFB 10%, em placas de 96 compartimentos. Após 24h de incubação (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO₂), foram adicionados 100µL/compartimento das amostras (extrato bruto de *A. chica*, alantoína e ácido ascórbico) dissolvidas em meio DMEM/DMSO sendo as concentrações finais de ácido ascórbico de 25µg/ml e de alantoína e extrato de *A. chica* de 250µg/ml. As placas foram incubadas por 72h (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO₂) e, ao final deste período, o sobrenadante de cada compartimento foi coletado e armazenado em freezer. Uma alíquota de 1ml de cada sobrenadante foi hidrolizada com 0,5 mL de HCL 6N, por 20 minutos, a 120 °C, em autoclave e submetida à dosagem de hidroxiprolina.

C- Análise de hidroxiprolina

Este ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo publicado por Woessner (1961) modificado por Gawronska-Kozak *et al* (2006). 20 µL de cada amostra hidrolizada foram adicionadas em uma placa de 96 compartimentos e incubadas por 20 minutos, a temperatura ambiente, com 50 µL/compartimento de solução de cloramina T (282 mg cloramina T, 2 mL *n*-propanol, 2 ml de água destilada, e 16 mL tampão acetato citrato). Após esse período, 50 µL/compartimento de solução de Erlich [2,5 g 4-(dimetilamino)-benzaldeído, 9,3 ml *n*-propanol, e 3,9 mL de 70% de ácido perclórico] foram adicionados e a mistura foi incubada por 15 min a 65°C. Mediu-se a absorbância a 550nm em um leitor de microplaca (VERSA Max, Molecular Devices). Uma curva de calibração de hidroxiprolina (0 a 10 µg/mL) foi preparada e os resultados foram expressados em µg/mL de hidroxiprolina.

D- DPPH

O ensaio de DPPH foi desenvolvido como descrito por Brand-Williams *et al* (1995) modificado por Brem *et al* (2004). Em placa de 96 compartimentos, as amostras diluídas (100µL/ compartimento, 0.25, 2.5, 25 and 250µg/mL), em triplicata, receberam solução de DPPH (40µM em methanol, 100 µL/compartimento) e a absorbância foi medida a 550nm em leitor de microplaca (VERSAmax, Molecular Devices), a cada 5 minutos durante 30 min para avaliar a cinética da reação. A porcentagem de DPPH livre foi calculada como: $\%DPPH_{\text{livre}} = 100 \times ([DPPH]_{\text{amostra}}/[DPPH]_{\text{branco}})$.

Obteve-se então um gráfico porcentagem de DPPH livre *versus* concentração da amostra e através de regressão exponencial, calculou-se a concentração necessária de antioxidante para diminuir em 50% a concentração de DPPH livre (EC₅₀). O tempo necessário para alcançar o EC₅₀ (TEC₅₀) foi verificado experimentalmente e correlacionado com a concentração efetiva através da eficiência antirradicalar (Jiménez-Escrig *et al*, 2000), que foi calculada como: $AE = 1/(EC_{50} \times TEC_{50})$.

E- Reagente de Folin Ciocalteu (FCR) - Ensaio de capacidade redutora

Este ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo publicado por Prior *et al* (2005), com pequenas modificações. Uma alíquota de 10µL da amostra (1mg/mL) foi diluída em água destilada (600 µL). Em seguida, esta solução foi aplicada em uma placa de 96 compartimentos (150 µL/compartimento), em triplicata, e recebeu a solução de Folin-Ciocalteu (12,5 µL), carbonato de sódio (37,5 µL, 1M) e água (50µL). Após incubação a 37°C durante 2h, a absorbância foi medida a 725nm em leitor de microplaca (VERSA Max, Molecular Devices). Uma curva padrão de ácido gálico foi feita e os resultados foram expressos em equivalente de mg de ácido gálico por grama de amostra.

3- Testes de atividade farmacológica *In vivo*

Os animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e mantidos em câmaras com temperatura controlada ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos (150-250 g) e camundongos Swiss machos (25-50 g), aclimatados às condições do laboratório por 7 dias, sendo agrupados ao acaso, em grupos de até 10 animais, submetidos a jejum de 12 horas.

Os protocolos estão de acordo com o Princípio Ético Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética animal da Unicamp, em anexo.

A- Atividade anti-ulcerogênica

❖ Úlcera induzida por etanol.

Após um período de 12 horas em jejum, com acesso livre à água, os animais foram separados em 8 grupos de 5 animais onde cada grupo recebeu, por via oral, o tratamento correspondente, ou seja, solução salina 0,9% (10mL/kg) como controle negativo, carbenoxolona (200mg/kg), como controle positivo e o extrato bruto e *Arrabidaea chica*, nas doses de 500 e 1000mg/kg. Após 30 minutos da administração, foi realizada a administração oral de 1mL de etanol absoluto, de acordo com a metodologia descrita por Robert (1979), citado por Monteiro, 2006. Os animais foram sacrificados uma hora depois, por deslocamento cervical. Os estômagos foram retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0,9% para posterior contagem e avaliação das lesões ulcerativas. O índice de lesões ulcerativas (ILU) foi calculado, para cada um dos animais, por meio da somatória dos parâmetros, de acordo com o esquema (Tabela 2) descrito por Gamberini *et al* (1991), citado por Monteiro, 2006.

Tabela 2- Avaliação das lesões ulcerativas em estomago.

Tipo de Lesão	Pontuação	
Perda de pregas da mucosa	um ponto	
Descoloração da mucosa	um ponto	
Edema	um ponto	
Hemorragias	um ponto	
Petéquias	até 10 petéquias	dois pontos
	mais de 10 petéquias	três pontos
Úlceras até um milímetro	* n x dois pontos	
Úlceras maiores que um milímetro	* n x três pontos	
Úlceras perfuradas	* n x quatro pontos	

*n refere-se ao número de lesões observadas.

Para a determinação da porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas apresentados pelos grupos tratados em relação ao grupo controle, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{ILU médio}_{\text{controle}} - \text{ILU médio}_{\text{tratado}}}{\text{ILU médio}_{\text{controle}}} \times 100$$

❖ Atividade antiulcerogênica: Triagem do mecanismo de ação

Para avaliação do mecanismo de ação foi empregada a dose efetiva do extrato bruto de *A. chica* (DE₅₀). Esta foi obtida a partir de uma curva dose versus resposta, do modelo de úlcera induzida por etanol nas concentrações de 100, 300 e 1000 mg/Kg.

Foram avaliados os mecanismos de citoproteção gástrica que envolve a participação de substâncias sulfidrílica, de prostaglandinas e óxido nítrico.

❖ Estudo da participação das substâncias sulfidrílicas não proteicas sobre a citoproteção gástrica

Foram utilizados ratos Wistar machos, em jejum por um período de 12 horas com livre acesso à água. Os animais foram divididos em quatro grupos de 5 animais. Dois grupos receberam tratamento prévio, via subcutânea, de N-etilmaleimida (alquilante dos grupos sulfidrílica) na dose de 10,0 mg/Kg. Após 30 minutos, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o respectivo tratamento, ou seja, o primeiro grupo recebeu solução de NaCl (0,9%) na dose de 10,0 ml/kg como controle negativo (grupo que não recebeu N-etilmaleimida subcutânea), o segundo grupo recebeu solução de NaCl a 0,9% (grupo que recebeu N-etilmaleimida subcutânea), o terceiro grupo recebeu o extrato bruto de *A. chica* na dose de 453 mg/Kg (grupo que não recebeu N-etilmaleimida subcutânea) e o quarto grupo recebeu o extrato bruto de *A. chica* na dose de 453 mg/Kg (grupo que recebeu N-etilmaleimida subcutânea). Após 30 minutos, seguiu-se o protocolo de úlcera induzida por etanol, descrito no item 3, sub-item A. (Arrita *et al*, 2003)

❖ Estudo da participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica

Foram utilizados ratos Wistar machos, em jejum por um período de 12 horas com livre acesso à água. Os animais foram divididos em quatro grupos de 5 animais. Dois grupos receberam tratamento prévio, por via intraperitoneal, de indometacina na dose de 5,0 mg/Kg .

Após 30 minutos, o primeiro grupo recebeu solução de NaCl (0,9%) na dose de 10,0 mL/kg (v.o) como controle negativo (grupo que não recebeu indometacina), o segundo grupo recebeu solução de NaCl a 0,9% (grupo que recebeu indometacina) na dose de 10,0 mL/kg (v.o), o terceiro grupo recebeu o extrato bruto de *A. chica* na dose de 453mg/Kg (v.o) (grupo que não recebeu indometacina) e o quarto grupo recebeu o extrato bruto de *A. chica* na dose de 453mg/Kg (v.o) (grupo que recebeu indometacina). Após 30 minutos, seguiu-se o protocolo de úlcera induzida por etanol, descrito no item 3, sub-item A. (Arrita *et al*, 2003)

❖ Estudo da participação do óxido nítrico na citoproteção gástrica

Foram utilizados ratos Wistar machos, em jejum por um período de 12 horas com livre acesso à água. Os animais foram divididos em quatro grupos de 5 animais. Dois grupos receberam tratamento prévio com uma solução aquosa de L-NAME (inibidor inespecífico da NO sintase), via endovenosa, na dose de 5,0 mg/Kg.

Após 30 minutos, o primeiro grupo recebeu solução de NaCl (0,9%) na dose de 10,0 mL/kg (v.o) como controle negativo (grupo que não recebeu L-Name), o segundo grupo recebeu solução de NaCl a 0,9% (grupo que recebeu L-Name) na dose de 10,0 ml/kg (v.o), o terceiro grupo recebeu o extrato bruto de *A. chica* na dose de 453mg/Kg (v.o) (grupo que não recebeu L-Name) e o quarto grupo recebeu o extrato bruto de *A. chica* na dose de 453mg/Kg (v.o) (grupo que recebeu L-Name). Após 30 minutos, seguiu-se o protocolo de úlcera induzida por etanol, descrito no item 3, sub-item A. (Arrita *et al*, 2003)

B- Atividade Antiinflamatória

❖ Edema de pata induzido por carragenina

Neste experimento foram utilizados três grupos de cinco ratos machos Wistar (100-150g, em jejum de 12h) por grupo. O primeiro grupo foi tratado, por via oral, com o extrato bruto de *A. chica* (1000mg/kg), o segundo com solução salina (NaCl 0,9%, 10 ml/kg) e o terceiro com indometacina (10 mg/kg), utilizada como controle positivo. Após 60 minutos, os animais foram submetidos a uma injeção sub-plantar de 0,1 ml de carragenina 1% em solução fisiológica (agente edematogênico) na pata esquerda posterior.

O volume da pata do rato foi medido imediatamente antes, após a injeção do agente edematogênico e em intervalos pré-estabelecidos, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália). A pata esquerda posterior de cada animal foi submersa, até o maléolo lateral, em um recipiente preenchido com uma solução salina 0,9% e conectado por um sistema de vasos comunicantes a um outro menor, contendo um transdutor de volume ligado a um multímetro digital. As variações de volume, mediante a

imersão das patas no recipiente maior, foram numericamente registradas no multímetro digital nos tempos zero (imediatamente após as injeções de carragenina) 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos após a injeção do agente flogístico (Winter *et al*, 1962).

As respostas edematogênicas foram expressas como aumento de volume da pata (mL), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, para cada grupo de tratamento e expressos como porcentagem de variação (aumento ou inibição) do volume total de edema em comparação com o grupo controle.

❖ Edema de orelha induzido por óleo de cróton (ação tópica)

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss machos, pesando entre 25-35g, separados em 4 grupos de oito animais. Em cada um desses grupos foi aplicado topicamente, na orelha esquerda, 20 μ l de cada tratamento, extrato bruto de *A. chica* (1000mg/kg), alantoína (1000mg/Kg) e como controle positivo dexametasona (4mg/mL), diluído em acetona. E para o grupo do controle negativo, foi aplicado, também na orelha esquerda, somente acetona.

Após 60 minutos, foram aplicados 20 μ l de uma solução de óleo de cróton a 5 % em acetona p.a. na superfície interna da orelha esquerda. Na orelha direita foi aplicado volume equivalente do solvente. Após quatro horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e porções padronizadas (6 mm diâmetro) das duas orelhas, foram retiradas. Cada uma delas foi pesada separadamente e a diferença de peso foi considerada como o edema produzido pelo óleo de cróton (Tubaro *et al*, 1985).

C- Atividade cicatrizante

❖ Procedimento cirúrgico e tratamento

Este ensaio foi desenvolvido de acordo com Panchatcharam *et al* (2006). Ratos Wistar pesando entre 250-300g foram divididos em 3 grupos de 5 animais cada, denominados grupos I (salina, 0,9%), II (alantoína, 100mg/mL) e III (*A. chica*, 100mg/mL).

Após a anestesia inalatória por éter, as costas dos animais foram tricotomizadas e esterilizada com 70% EtOH. Úlceras cutâneas medindo, em média, 1.5 cm² foram excisionadas e tratadas topicamente durante 10 dias com aplicações de 200µL/úlceras de cada amostra, e protegidas com curativos específicos. As úlceras cutâneas foram analisadas todos os dias medindo-se a área de contração e foi calculada a porcentagem de redução da área inicial da lesão.

No 11º dia os animais foram sacrificados por inalação de éter . O tecido da região da lesão de cada animal foi retirado para análise histopatologica e para determinação do total de colágeno pelo ensaio de hidroxiprolina. Oito milímetros foram puncionados da área cicatrizada e homogeneizados em 2 ml de solução de tampão fosfato (pH 6,0) e conservado a 4°C, por uma noite. Em seguida, 1mL do homogenato foi hidrolizado com 0,5mL de HCL 6N, por 5 horas a 120°C, sob refluxo. As amostras hidrolizadas foram congeladas para posterior avaliação no ensaio de hidroxiprolina descrito no item 2, sub-item C.

❖ Estudos histopatológicos

Amostras de pele cicatrizada de ratos dos três grupos foram colocadas em solução de formalina a 10% e enviadas para análise histopatológica no laboratório CITOCAMP, onde foram analisadas por microscopia ótica, utilizando-se coloração por Tricromo de Masson. A quantidade de colágeno foi expressa em uma escala de leve a intenso (+ a ++++), usando como basea metodologia de Vidinsky *et al* (2006).

4- Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos a análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico $p < 0,05$ para que fosse considerada diferença significante entre os grupos controle e tratados, seguida do Teste de *Duncan*, considerando-se o mesmo nível crítico.

RESULTADOS

1- Obtenção do extrato bruto de *Arrabidaea chica*

O procedimento utilizado para a extração, conforme descrito na seção de Materiais e Métodos, resultou na obtenção de 1,31g de extrato bruto, com rendimento de 13,1%.

2- Estimulo do crescimento de fibroblasto *in vitro*

O extrato bruto de *A. chica* e alantoina (0.25µg/ml a 250µg/ml) estimularam o crescimento de fibroblastos com CE₅₀ de 30µg/ml para *A.chica* e 2µg/ml para alantoina. O valor de CE₅₀ representa a concentração necessária para aumentar em 50% a quantidade de fibroblastos iniciais, sendo que fibroblastos não tratados expostos ao carenciamento de soro foram usados como controle e a sua viabilidade foi considerada como 100% (Figura 14).

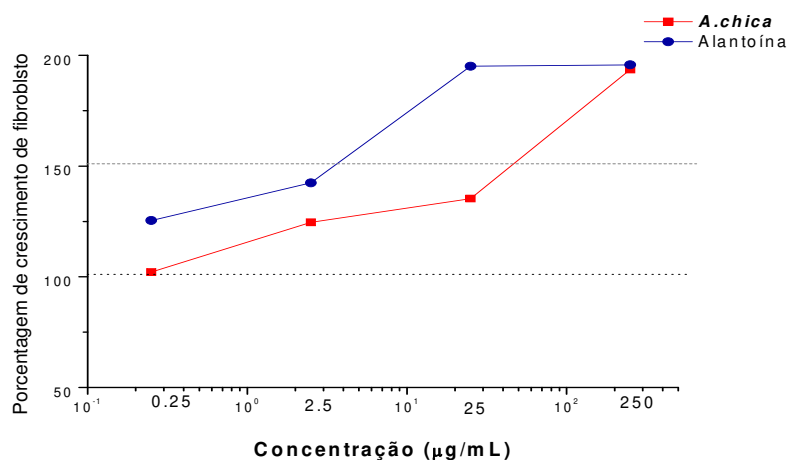
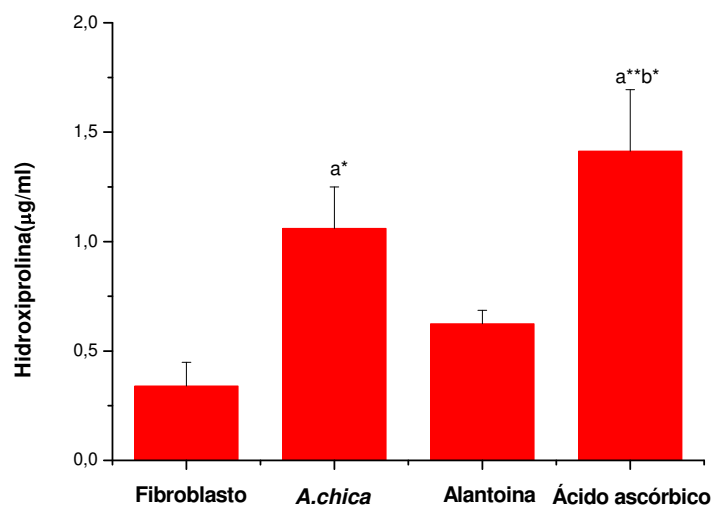


Figura 14- Efeito estimulante do extrato de *Arrabidaea chica* em fibroblastos humanos

3- Dosagem de hidroxiprolina para análise de síntese de colágeno *in vitro*

Figura 15 apresenta a variação na síntese de colágeno, determinada pela concentração de hidroxiprolina, após o tratamento de fibroblastos com extrato bruto de *A. chica* (250µg/ml), alantoína (250µg/ml) e ácido ascórbico (25µg/ml). Os resultados demonstram que o extrato bruto de *A. chica* estimulou em três vezes a síntese de colágeno ($p < 0.01$), quando comparado com os fibroblastos sem tratamento.



^a diferente do fibroblasto; ^b diferente da alantoína, ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$

Tratmento: extrato de *A. chica* (250µg/mL), Alantoína (250µg/mL), Ácido ascorbico (25µg/mL).

Figura 15- Efeito estimulante do extrato de *Arrabidaea chica* na síntese de colágeno *in vitro* dosado pela análise de Hidroxiprolina

4- Avaliação antioxidante

Os testes de DPPH e FCR demonstraram moderada atividade antioxidante produzida pelo extrato de *A. chica* (Tabela 3).

Tabela 3- Efeito Antioxidante do extrato de *Arrabidaea chica* em ensaios de DPPH e FCR.

	DPPH *			FCR *
	CE ₅₀	TCE ₅₀	EA	mg _{AcG} /g _{extrato}
<i>Arrabidaea chica</i>	15.98 ± 0.78	0.1	0.44 ± 0.17	67.69 ± 0.68
rolox	2.73 ± 0.10	0.1	3.68 ± 0.14	116.70 ± 21.01

* Resultados expressos com média ± epm

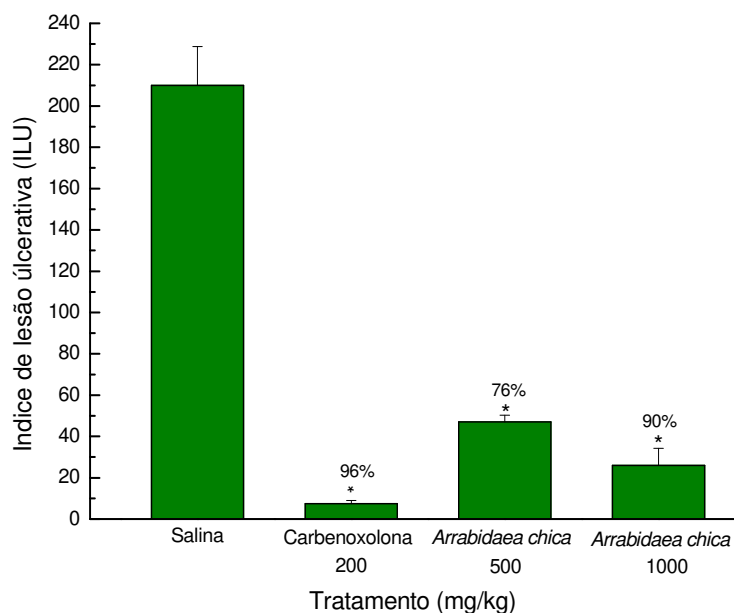
CE₅₀: Concentração (µg/ml) necessária para reduzir em 50% a concentração de DPPH

TCE₅₀: Tempo (min) necessário para que ocorra a CE₅₀

EA: Eficiência antiradicalar EA= 1/(CE₅₀x TCE₅₀)

5- Úlcera induzida por etanol

No modelo de úlcera induzida por etanol, o extrato de *A. chica*, administrado oralmente na dose 500 e 1000 mg/kg, apresentou atividade antiulcerogênica, com uma porcentagem de inibição de 76% e 90%, respectivamente, enquanto que carbenoxolona, administrada pela mesma via, na dose de 200 mg/kg, utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 96%. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão médio do ILU, estão demonstrados na Figura 16.



diferente da salina,* p<0,001

Tratamento: extrato de *A. chica* (500 e 1000mg/Kg), Carbenoxolona (200mg/Kg).

Figura 16- Efeito gastroprotetor do extrato de *Arrabidaea chica* em úlcera induzida por etanol.

6- Determinação da dose Efetiva 50 (DE₅₀)

O efeito antiulcerogênico apresentado pelo extrato de *A. chica* no modelo de úlcera induzida por etanol, administrado oralmente, foi avaliado nas doses 100, 300 e 1000mg/Kg, para construção de uma curva dose *versus* resposta. A curva demonstrou que a DE₅₀ é de 453 mg/Kg (Figura 17).

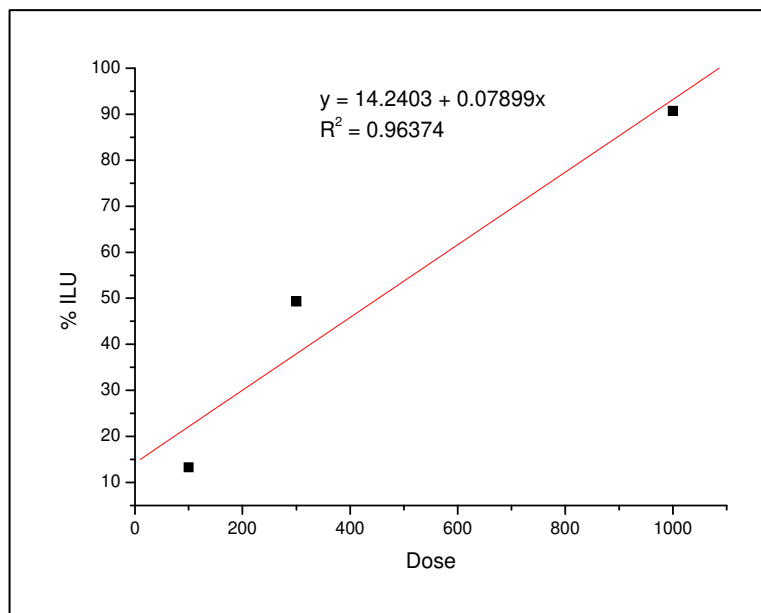
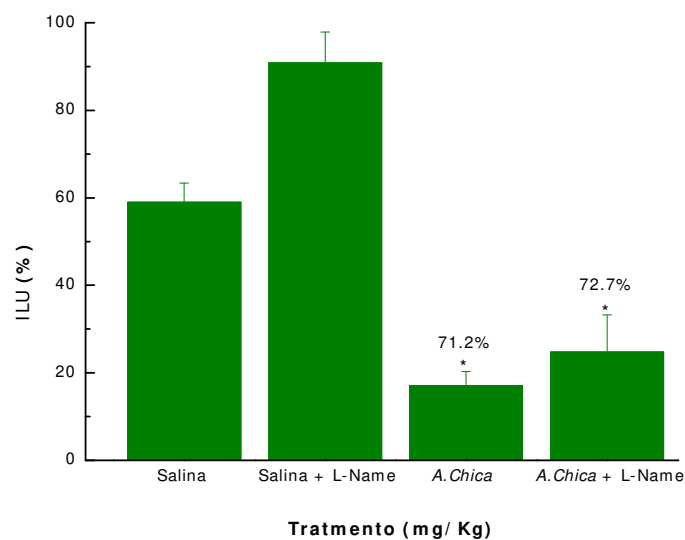


Figura 17- Curva dose *versus* resposta do extrato de *Arrabidaea chica*.

7- Estudo da participação do óxido nítrico sobre a citoproteção gástrica

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de L-NAME, a porcentagem de inibição do ILU do extrato de *A. chica* (453 mg/kg, vo) foi de 72,7%, enquanto o grupo sem o tratamento prévio a redução foi de 71,2% (Figura 18).



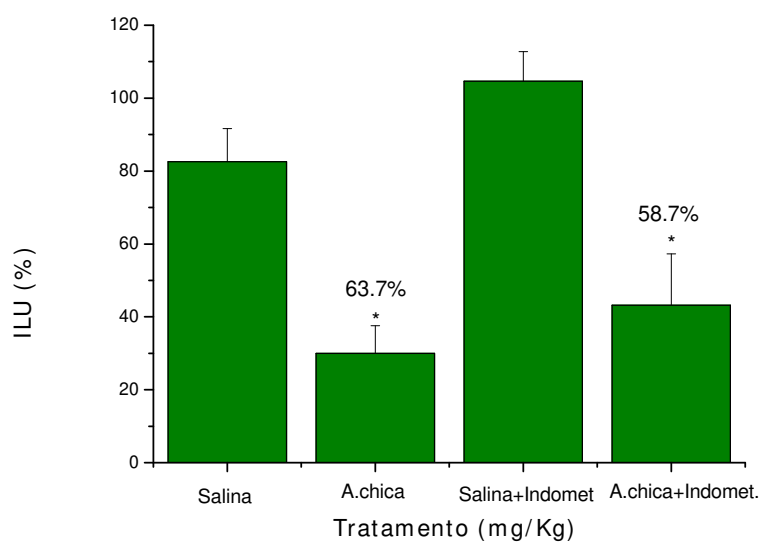
diferente da salina,* p<0,001

Tratmento: extrato de *A. chica* (453mg/Kg)

Figura 18- Modelo experimental para avaliação da participação do óxido nítrico na citoproteção gástrica em modelo de úlcera induzida por etanol.

8- Estudo da participação de prostaglandinas na citoproteção gástrica

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de indometacina na dose de 5 mg/kg por via intraperitoneal, a porcentagem de inibição do ILU do extrato de *A. chica* (453 mg/kg, vo) foi de 58,7%, enquanto no grupo sem o tratamento prévio a redução foi de 63,7% (Figura 19).



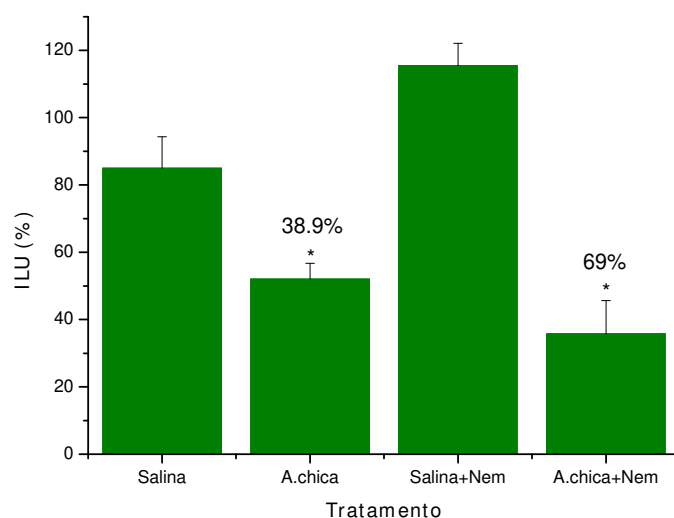
diferente da salina,* p<0,001

Tratmento: extrato de *A. chica* (453mg/Kg)

Figura 19- Modelo experimental para avaliação da participação das prostaglandinas na citoproteção gástrica em modelo de úlcera induzida por etanol.

9- Estudo da participação das substâncias sulfidrílicas não proteicas na citoproteção gástrica

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de NEM, a porcentagem de inibição do ILU do extrato de *A. chica* (453 mg/kg, vo) foi de 69%, enquanto o grupo sem o tratamento prévio a redução foi de 38,9% (Figura 20).



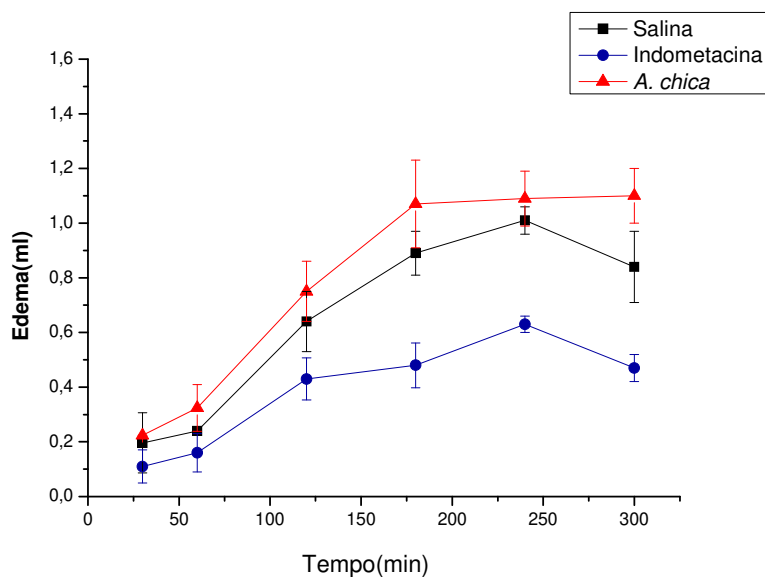
diferente da salina,* p<0,001

Tratamento: extrato de *A. chica* (453mg/Kg)

Figura 20- Modelo experimental para avaliação da participação das substâncias sulfidrílicas não proteicas na citoproteção gástrica em modelo de úlcera induzida por etanol.

10- Edema de pata induzido por carragenina

Neste ensaio foram avaliados os efeitos do extrato bruto de *A. chica* sobre o curso temporal da resposta inflamatória. O extrato de *A. chica* (1000 mg/Kg, v.o.) não alterou o edema de pata induzido por carragenina (Figura 21).

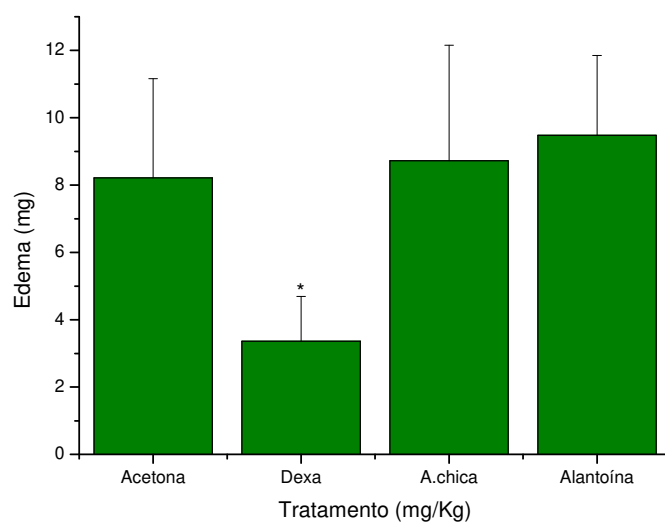


Tratamento: extrato de *A. chica* (1000 mg/Kg) e indometacina (10 mg/Kg)

Figura 21- Efeito da administração oral do extrato bruto de *Arrabidaea chica* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos.

11- Edema de orelha induzido por óleo de Cróton – Tópico

O extrato bruto de *A. chica*, administrado por via tópica, não foi capaz de reduzir o edema de orelha induzido por óleo de cróton. A dexametasona, usada como controle positivo, reduziu em 85% após 4 horas de administração do agente flogístico (Figura 22).



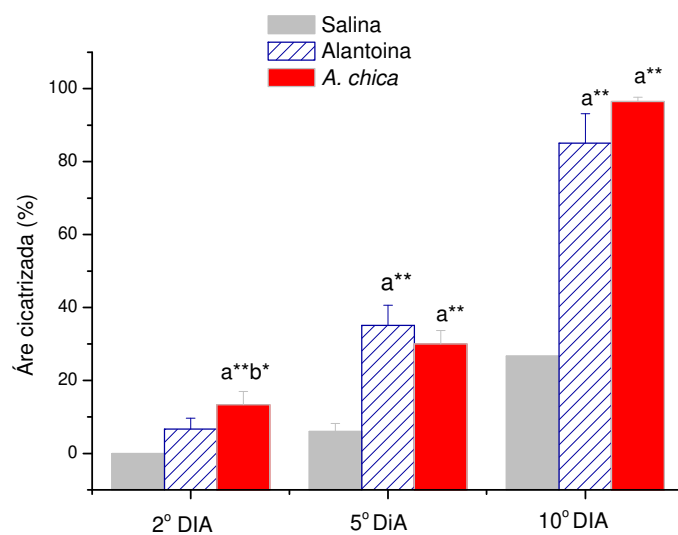
diferente da acetona,* $p < 0,001$

Tratamento: extrato de *A. chica* (1000mg/ml) e dexametasona (4mg/ml)

Figura 22- Efeito da administração tópica de dexametasona e do extrato de *Arrabidaea chica* no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.

12- Procedimento cirúrgico e tratamentos

A Figura 23 demonstra a evolução da cicatrização durante dez dias de tratamento. O tratamento com o extrato bruto de *A. chica* diminui significativamente a área ulcerada quando comparada com o grupo salina (Figura 24).



^a diferente da salina; ^b diferente da alantoína, ** p<0,001, *p< 0,01

Tratamento: extrato de *A. chica* (100 mg/mL), Alantoína (100 mg/mL), Salina (0,9%).

Figura 23- Efeito cicatrizante de *Arrabidaea chica* no tratamento diário (10 dias) de úlceras cutâneas *in vivo*.



A) Salina



B) Alantoina



C) *A. chica*

Figura 24- Observação visual do processo cicatrizante após dez dias de tratamento. A) Salina, B) *A. chica*, C) Alantoina.

13- Estudos histopatológico

As análises macroscópica e microscópica das áreas cicatriciais, após dez dias de tratamento, mostram um efeito cicatrizante significativo do extrato de *A. chica* quando comparando com os demais grupos (Tabela 4).

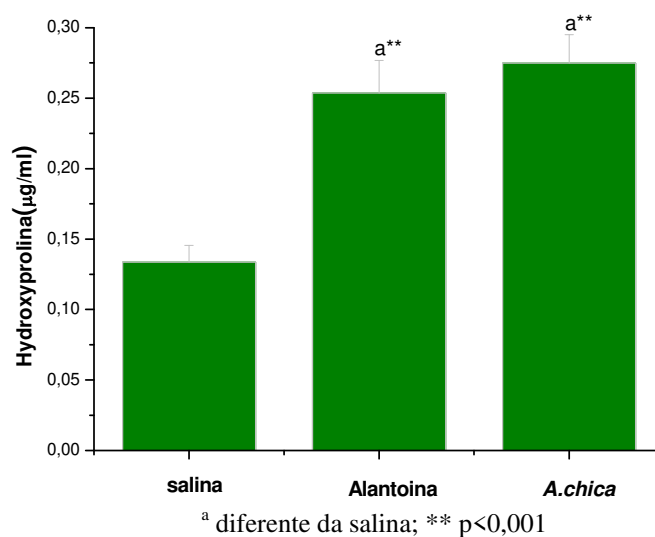
Tabela 4- Análises macro e microscópica da área em processo cicatrizante após dez dias de tratamento.

	Macroscopico*	Microscopico
	Área lesionada	Colágeno
Salina	1.0 cm ²	+
Alantoina	0.25 cm ²	+++
<i>A. chica</i>	0.15 cm ²	+++

* área de lesão inicial = 1.5 cm²

14- Dosagem de hidroxiprolina para análise de síntese de colágeno *in vivo*

Os resultados indicam que o extrato de *A. chica* estimulou significativamente a síntese de colágeno ($p < 0.001$), quando comparado com o grupo salina e estatisticamente análogo ao grupo alantoína, utilizado como controle positivo (Figura 25).



Tratmento: extrato de *A. chica* (100mg/mL), Alantoina (100mg/mL), Salina (0.9%).

Figura 25- Efeito estimulante de colágeno do extrato de *Arrabidaea chica* *in vivo* dosado pela análise de hidroxiprolina

DISCUSSÃO

A preocupação com o tratamento de úlceras cutâneas está presente na história da humanidade desde a antiguidade quando surgiram complicações com o processo cicatricial de ferimentos provocados por armas cortantes durante as primeiras guerras (Blanes, 2004). Partes de plantas, como cascas, ou seus extratos foram utilizados por muito tempo nos curativos até serem substituídos por novas drogas, como iodo, cloro, princípios ativos isolados e posteriormente sintetizados, como a alantoína, e enzimas (Houghton *et al*, 2005).

Como já salientado, fatores locais como infecções, técnica cirúrgica, hematomas locais, presença de corpos estranhos, isquemia tecidual e os curativos, interferem no processo cicatricial (Mandelbaum, 2003; MacKay & Miller, 2003; Balbino, 2005). Da mesma forma, diversas doenças como a síndrome de Ehlers-Danlos, hemofilia, doença de Von Willebrand, hipofibrinogenemia de Werner, insuficiência cardíaca congestiva, aterosclerose, diabetes melito, síndrome de Cushing, doenças hematológicas associadas com trombocitopenia, insuficiência hepática e a síndrome de deficiência imunológica, também retardam esse processo (Fujita *et al*, 2006).

Alguns medicamentos também podem alterar o processo cicatricial. Os medicamentos frequentemente relacionados com distúrbios da cicatrização são glicocorticóides, antiinflamatórios não esteroidais, colchicina, ciclosporina e penicilamina. Estas drogas atuam primordialmente determinando alteração no processo inflamatório e na atividade imune, revelando a interação entre o sistema imune e o sistema de cicatrização (Brunius & Zederfeldt, 1965; Aguilar-Nascimento *et al*, 2000).

A última década registrou um aumento expressivo no interesse em drogas derivadas de espécies vegetais evidenciado pelo crescimento de publicações desta linha de pesquisa nas principais revistas científicas das áreas de química e farmacologia (Calixto, 2000).

O interesse por drogas vegetais que auxiliem no processo cicatricial, principalmente de úlceras em diabéticos, é evidenciado em diversas publicações científicas (Houghton *et al*, 2005; Mensah *et al*, 2001; Gutierrez & Vargas, 2006).

O uso de cremes e géis fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) de diversas cidades do Estado de S. Paulo, tendo Campinas como exemplo, no tratamento de ulcerações cutâneas, de pé-diabético, acamados, cadeirantes, entre outros, tem demonstrado resultados promissores significativos. Extratos obtidos de plantas como *Aloe vera*, *Calendula officinales* e *Hamamelis virginiana* são os mais utilizados, tendo a literatura como base (Pimentel, 2002).

Vários experimentos foram realizados nos últimos anos na tentativa de ampliar o conhecimento sobre o mecanismo da cicatrização, procurando aumentar a rapidez ou mesmo corrigir o processo cicatricial, quando este se desenvolve de maneira insatisfatória. O grande interesse destes estudos é avaliar a ação de extratos vegetais nas três etapas do processo inflamatório, avaliando a ação antioxidante, proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (Reddy *et al*, 2007; Balbino *et al*, 2005; MacKay *et al*, 2003).

Com o interesse de se desenvolver novos fármacos que acelerem o processo cicatricial deficiente, o presente projeto selecionou a espécie *Arrabidaea chica* levando-se em conta seu uso popular e a carência de estudos que possam comprovar sua eficácia. Com esse objetivo, foi obtido o extrato metanólico de folhas secas de *A. chica*, cultivada no campo experimental do CPQBA. Com esse extrato, o trabalho farmacológico teve início através da avaliação sobre o crescimento de fibroblastos humanos em cultura.

Trabalhos anteriores desenvolvidos no CPQBA-UNICAMP, em parceria com a Empresa Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. (FAPESP 03/09317-5), visaram a domesticação e a produção em larga escala da *Arrabidaea chica*, para produção de um corante vermelho. Nesse projeto, foi avaliada a capacidade de produção das antocianinas (pigmento vermelho) por plantas oriundas de distintas partes do Brasil, quando cultivadas sob as mesmas condições, no campo experimental do CPQBA-Unicamp.

O perfil cromatográfico dos extratos preparados com metanol:ácido cítrico 0,3%, de sete diferentes acessos (CPQBA, Campo Grande, Tijuco do Sul, Manaus, Curitiba, Paulínia e Campinas) foi comparado por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando-se a mistura butanol: água: ácido acético, na proporção 4:5:1, como fase móvel, e sílica gel 60 F₂₅₄, como fase estacionária. As antocianinas foram observadas como manchas avermelhadas (Figura 26), sem revelação da placa.

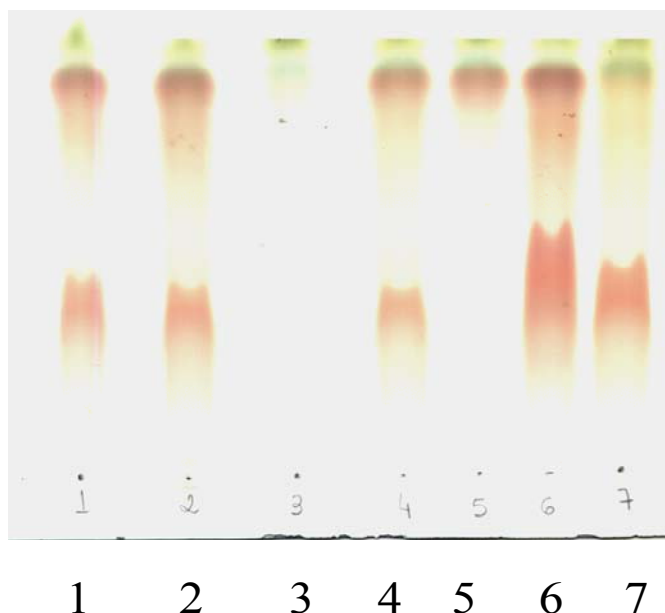


Figura 26- CCD comparativa de diferentes acessos de *Arrabidaea chica* Verlot. F.M.

Fase Móvel: butanol/água/ácido acético (5:4:1), sem revelação.

Acesso CPQBA (1), Campo Grande (2), Tijuco do Sul (3), Manaus (4), Curitiba (5), Paulínia (6) e Campinas (7).

A análise por CCD (Figura 26) dos sete acessos de *A. chica*, permitiu verificar que os extratos dos acessos de Tijuco do Sul (acesso 3) e Curitiba (acesso 5) não apresentavam coloração avermelhada. Tal característica pôde ser associada à época da florescência, uma vez que a primeira planta apresentava flores na data de coleta e a segunda terminara sua florescência alguns dias antes da coleta (Figura 27).



Figura 27- Flores do acesso 03 de Tijuco do Sul - Paraná.

Os demais extratos apresentaram algumas diferenças na coloração, possivelmente por diferenças na concentração dos compostos coloridos.

Dentre os sete acessos analisados, o acesso Paulínia foi o que apresentou coloração mais intensa, e por isso este acesso foi selecionado para a extração em maior escala para realização dos estudos farmacológicos. Em seguida, os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos (Wen *et al*, 2005).

As antocianinas majoritárias foram observadas nos tempos de retenção 7,9 min (pigmento 1, 6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium), 11,17 min (pigmento 2, 6,7,4'-trihidroxi-5- metoxi flavilium) e 18,22 min (pigmento 3, carajiruna – 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi flavilium) (Tabela 5). Constatou-se que os acessos Manaus e Paulínia apresentaram uma proporção média de 21% do pigmento 1, 48% do pigmento 2 e 30% do pigmento 3, que correspondia a uma coloração avermelhada mais satisfatória dentre os acessos estudados.

Tabela 5- Percentagem (%) dos três pigmentos em diferentes acessos de *Arrabidaea chica*.

Acesso	pigmento1	pigmento2	pigmento3
1	25,50	42,61	31,89
2	27,35	36,77	19,31
3	52,76	47,24	—
4	21,11	46,15	32,74
5	—	—	—
6	21,50	48,32	30,18
7	17,90	35,83	46,27

Pigmento 1: Azul (6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5- metoxi flavilium); pigmento 2: Vermelho (6,7,4'-trihidroxi-5- metoxi flavilium); pigmento 3: Amarelo (carajiruna, 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi flavilium). Acesso 1 - CPQBA, 2 - Campo Grande, 3 - Tijuco do Sul, 4 - Manaus, 5 - Curitiba, 6 - Paulínia e 7 - Campinas.

Com base nos resultados obtidos, observou que o acesso 06 (Paulínia), coletado no mês de maio de 2005 e 2006, era o que apresentava coloração avermelhada mais satisfatória. Extratos resultantes desse mesmo acesso, porém coletados no mês de setembro de 2006, foram incapazes de reproduzir as colorações avermelhadas observada para as amostras coletadas e processadas no primeiro semestres do ano, indicando uma variação desses compostos ao longo do ano.

Estudos apontam o alto poder antioxidante das antocianinas para combater doenças metabólicas e suas complicações (Kong *et al*, 2003; Tsuda *et al*, 2006; Zafra-Stone *et al*, 2007; Valcheva-Kuzmanova *et al*, 2007; Harris *et al*, 2007; Guoi *et al*, 2007).

Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo essenciais para a formação da derme e da mucosa, por secretar colágeno, responsável pela firmeza estrutural (Pimentel, 2001). Após lesão tecidual, os fibroblastos próximos proliferam, migram para a ferida e produzem grande quantidade de matriz rica em colágeno (tipo I e III), que ajuda a isolar e reparar o tecido lesado. Aumentando a expressão do gene de actina, adquirem algumas das propriedades contráteis das células musculares lisas, auxiliando a aproximar as margens do ferimento e por isso, são chamados de *miofibroblastos*. Esta transformação é estimulada por fatores de crescimento como TGF- β , PDGF e IGF-I e IGF-II (Balbino *et al*, 2005).

Com isto, Houghton (2005) relata que uma das formas de iniciar o trabalho de avaliação de um possível agente cicatrizante é através da indução proliferativa de fibroblasto e a síntese de colágeno.

O extrato bruto de *A. chica* estimulou o crescimento celular de forma concentração dependente, apresentando uma CE₅₀ de 30 µg/ml (Figura 14). Por se tratar de um extrato bruto, este resultado foi muito interessante quando comparado aos obtidos com a alantoína, utilizada como controle positivo, que apresentou CE₅₀ de 2 µg/ml.

A alantoína foi descoberta por Vanquelin e Buniva em 1800 e sintetizada por Grimax em 1876. É um composto branco não tóxico, não irritante e não alérgico que vem sendo reportado por promover estímulos de epitelização e diminuição da dor (Shestopalov *et al*, 2006). Esse agente cicatrizante também é encontrado na espécie vegetal *Symphomn officinalis*, conhecida popularmente como confrei, tradicionalmente utilizada para acelerar processos cicatriciais (Oliveira *et al*, 2001).

A hidroxilação da prolina e da lisina, aminoácidos essenciais, é uma etapa vital para a formação do colágeno e ocorre no ribossomo do fibroblasto que sofreu alterações morfológicas para a secreção de colágeno. Oxigênio, ácido ascórbico e ferro são co-fatores nesta hidroxilação (Grant, 2007). Através da determinação do conteúdo de colágeno sintetizado no meio de cultura de fibroblastos é possível avaliar também o potencial cicatrizante de uma droga. (Maehata *et al*, 2007; Cilli *et al*, 2004). Nesse experimento, o extrato bruto de *A. chica* aumentou significativamente a síntese de colágeno, quando comparado com a alantoína e com o ácido ascórbico, utilizados como controle positivo (Figura 15).

A maioria dos hormônios e neurotransmissores que atuam no sistema digestivo também possuem outras funções no organismo e, portanto, drogas que interagem com alguma dessas substâncias podem também exercer outras funções no organismo. Dessa forma, modelos experimentais utilizando o sistema digestivo, ou partes dele, podem ser de grande utilidade para a descoberta de novas drogas.

A camada mais interna do tubo digestivo é constituída por uma membrana mucosa ou mucosa. Esta mucosa apresenta um revestimento epitelial e uma camada de tecido conjuntivo, a lâmina própria. Contém fibroblastos e macrófagos. Existe também uma submucosa rica em fibras colágenas e elásticas, assim como células de tecido conjuntivo. (Junqueira, 2005).

Os testes de atividade antiulcerogênica além de avaliar possíveis agentes para tratamento de gastrite e úlcera gastroduodenal podem também ser utilizados para teste de agentes cicatrizante. O extrato bruto de *A. chica* (1000 mg/kg) em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos reduziu em 90,7% o índice de lesões ulcerativas (Figura 16). Em uma curva dose *versus* resposta, utilizando-se doses de 100, 300 e 1000mg/Kg, a DE₅₀ foi de 453 mg/Kg (Figura 17). Esses resultados demonstrando uma provável atividade antiulcerogênica estimularam outros testes para estudo do mecanismo de ação.

Alguns mecanismos de citoproteção foram avaliados. Entre eles, a participação do óxido nítrico, substância endógena que aumenta a resistência da mucosa por promover vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo local. Em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com L-NAME, inibidor inespecífico de NO-sintase, o extrato bruto de *A. chica* manteve sua atividade antiulcerogênica, sugerindo que esta atividade não está relacionada com o óxido nítrico (Figura 18) (Arrieta *et al*, 2003).

Outra hipótese seria a interferência dos grupos sulfidríla não protéicos da mucosa. Estas substâncias provavelmente promovem uma diminuição do aumento da permeabilidade vascular ou ainda impedem a ação de radicais livres sobre a mucosa. Para avaliar esta hipótese, foi utilizado o modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com N-etilmaleimida, alquilante dos grupos sulfidríla. (Arrieta *et al*, 2003). O extrato bruto de *A. chica*, por via oral, manteve sua atividade, sugerindo que este grupo de substâncias também não está envolvido na ação antiulcerogênica observada (Figura 20).

Um outro grupo de substâncias endógenas importantes no processo de citoproteção são as prostaglandinas, que aumentam a secreção de muco e bicarbonato (Arrieta *et al*, 2003). Em modelo de úlcera induzido por etanol, com administração prévia de indometacina, antiinflamatório não esteroideal, que inibe a cicloxigenase e

consequentemente a síntese de prostaglandinas, o extrato bruto de *A. chica* manteve sua atividade antiulcerogênica, sugerindo que esses prostanóides não participam da atividade observada (Figura 19).

O leque de atividades apresentado até o momento com estímulo do crescimento de fibroblastos e da síntese de colágeno bem como, diminuição das lesões ulcerativas gástricas, direcionou o trabalho para avaliação da atividade em lesões cutâneas.

O processo cicatricial é o evento final da resposta inflamatória que, independentemente do agente lesivo, caracteriza-se por uma resposta estereotipada, com uma seqüência ordenada de fenômenos que, possibilitam a restauração da área lesada, caso haja cessação do fator desencadeante, ou cronificação do processo, caso permaneça o fator irritante. Começa com a degranulação das plaquetas e ativação do Fator de Hageman, dando início a um sistema de amplificação biológico, com participação do complemento, cininas, fatores da coagulação e cascata de derivados da plasmina. As cininas e as prostaglandinas promovem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, determinando a formação de edema caracterizando a fase inflamatória. Caso não ocorra infecção ou contaminação, a fase inflamatória é curta (Maldelbaum *et al*, 2003, Balbino *et al*, 2005).

A inflamação, portanto, é todo um processo e não apenas uma fase na reparação do tecido. Drogas que interferem na resposta inflamatória podem modificar o processo de reparação tecidual. Os corticóides, por exemplo, são utilizados para retardar o processo cicatricial na tentativa de diminuir a formação de quelóides (Aguilar-Nascimento, 2000).

Como *A. chica* é popularmente indicada para tratamento de processos inflamatórios, o extrato bruto de *A. chica* foi avaliado em modelos experimentais de inflamação. Tanto no edema de orelha de camundongos, produzido pela aplicação de óleo de cróton, como no edema de pata de rato por carragenina, o extrato bruto de *A. chica* não apresentou atividade, descartando a possível atividade antiinflamatória (Figuras 21 e 22).

Estes resultados são positivos, pois em 1921 Carrel (citado por Prandi Filho *et al*, 1988) demonstrou que a inflamação é necessária para que ocorra a cicatrização. Por outro lado, uma reação inflamatória exagerada, como observada em feridas infectadas, retarda a cicatrização. (Brunius *et al*, 1965; Mavioso, 2003).

As primeiras células a serem recrutadas são os neutrófilos, responsáveis pelo desbridamento do tecido necrosado combatendo também agentes microbianos. Isto ocorre pela liberação de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (ROS). No entanto quando a resposta inflamatória é exagerada, causada por infecção, problemas metabólicos ou ainda quando se torna crônica, estas enzimas e ROS são liberados em excesso causando retardamento no processo cicatricial. Exposição a radicais livres conduz o organismo a lançar uma série de mecanismo de defesa antioxidante como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT).

Atividade antioxidante não enzimática é produzida por ácido ascórbico, α -tocoferol (vitamina E), glutathione (GSH), carotenóides, flavonóides e outros antioxidantes (Balbino *et al*, 2005; Panchatcharam, 2006; Valko *et al*, 2007). Portanto, se o composto apresentar potencial antioxidante pode ser um bom agente terapêutico para acelerar o processo cicatricial (Houghton *et al*. 2005).

O extrato bruto de *A. chica* foi submetido a ensaios de DPPH e capacidade redutora utilizando-se reagente de Folin-Ciocalteu (FC), demonstrando moderado efeito sequestrante (DPPH) e também moderado efeito redutor (FC) (Tabela 4).

Este caminho supõe que a propriedade cicatrizante do extrato bruto de *A. chica* possa ser explicada em parte pela atividade antioxidante das antocianinas e pelo efeito estimulante da proliferação de fibroblasto e da síntese de colágeno. Além desses efeitos, os polifenóis geralmente produzem precipitação de proteínas, que auxilia na formação de uma barreira física, a qual protege e facilita o processo de reparação tecidual (Simões, 2004).

O principal objetivo do processo cicatricial é o fechamento da ulceração no menor tempo possível, com o mínimo de dor, desconforto e pânico do paciente. No local do fechamento cicatricial uma fina e flexível cicatriz com alta força de tensão é desejada (MacKay & Miller, 2003).

A fase inflamatória é seguida então pela fase proliferativa em torno do terceiro dia após a injúria, caracterizada pela formação do tecido de granulação, que consiste de fibroblastos, células inflamatórias e vasos neoformados dispostos em uma matriz extracelular (Barbul *et al*, 1995).

Os macrófagos, que aparecem na fase inflamatória, liberam fatores de crescimento e citocinas, cruciais na maturação da fase inflamatória e iniciação do processo de cura da ferida. Os fatores de crescimento como IGF-I e TGF- β , são responsáveis pela proliferação de fibroblastos. O IGF-I aumenta a expressão da cadeia pró-alfa 1 (I) e pró-alfa 1 (III) do pró-colágeno em cultura de fibroblastos da derme (Pimentel, 2001; Balbino, 2005).

Os resultados obtidos até o momento precisariam ser confirmados em modelos de cicatrização de feridas em animais de laboratório. Dessa forma, o extrato bruto de *A. chica* foi avaliado em lesão cirúrgica efetuada no dorso de ratos. Nesse modelo, o extrato bruto de *A. chica*, já no segundo dia de tratamento, havia provocado uma contração da ferida de 13%. Com o tratamento, esse processo foi se intensificando atingindo 96%, após dez dias. Nesse mesmo período, as feridas do grupo tratado com salina reduziram em apenas 36%. Já o grupo tratado com alantoína apresentou, no mesmo período, redução de 87% (Figuras 23 e 24).

Vidinsky (2006) aponta a importância para os estudos histopatológicos, visto que estes ajudam a analisar o mecanismo do processo cicatrizante, através da análise das células envolvidas e quantificação das fibras colágenas.

A análise histopatológica dessas lesões permitiu a observação de moderada deposição de colágeno nos grupos tratados com o extrato bruto de *A. chica* e com alantoína. Apesar de moderada, a deposição de colágeno nesses grupos foi maior do que a observada no tratado com salina (Tabela 5). Estes resultados foram corroborados pela quantificação de hidroxiprolina dos homogenatos (Figura 25) da pele em processo cicatricial, demonstrando mais uma vez a eficiência do extrato bruto em promover elevado estímulo cicatricial.

Os resultados reportados aqui podem dar suporte ao uso popular desta espécie vegetal para cicatrização de feridas. A eficiência do extrato bruto envolve o estímulo do crescimento de fibroblasto e a síntese de colágeno com moderada atividade seqüestrante e redutora.

A seqüência desse trabalho terá como objetivo identificar os princípios ativos responsáveis pelo efeito cicatrizante e também avaliar sua toxicidade.

CONCLUSÃO

• Os resultados obtidos nos ensaios farmacológicos revelam que o extrato bruto metanólico de *A. chica*:

- induziu a proliferação de fibroblastos *in vitro*;
- estimulou a síntese de colágeno *in vivo* e *in vitro*;
- apresentou moderada capacidade anti-oxidante;
- apresentou atividade anti-ulcerogênica;
- não apresentou atividade anti-inflamatória;

• Esses resultados de *A. chica* fornecem subsídios científicos para confirmação do uso popular dessa espécie na cicatrização de úlceras cutâneas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afridi, M. A., 2003. Tobacco use as contributory factor in peptic ulcer disease. Journal of College of Physicians and Surgeons Pakistan 13 (7): 385-387.

Aguilar-Nascimento J.E., Silva L.R.F., Teixeira R.L., Oliveira A.F., 2000. Deflazacort e cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. Rev Ass Med Brasil 46(3): 218-223.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P., 2004. Biologia Molecular da célula. 4ª edição, Artmed, Porto Alegre, 1300-1303.

Alcerito, T.; Barbo, F. E.; Negri, G.; Santos, D.Y.A.C.; Meda, C. I.; Young, M.C.M.; Chávez, D.; Blatt, C.T.T., 2002. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. Biochemical and Systematics Ecology. 30: 677-683.

Allen, A. & Flemstrom, G., 2005. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. American Journal of Physiology- Cell Physiology 288(1): C1-19.

Arrieta, J.; Benitez J.; Flores E.; Castilho, C.; Navarrete, A., 2003. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterugium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. Planta Medica 69(10): 905-909.

Bajay, H. M., Jorge, S.A., Dantas, S.R.P.E. (coords.). 1999. Tratamento de feridas. Grupo de Estudo de Feridas, Hospital de Clínicas, Unicamp, Campinas, SP, 79 pp.

Balbino, C. A., Pereira, L. M., Curi, R. 2005. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 41: 27-51.

Barbul, A.; Regan, M.C., 1995. Immune Involvement in Wound Healing. Otolaryngol Clin of North Am, U.S.A., v. 28, p. 955-968.

Bighetti, A.E., Antonio, M.A., Carvalho, J.E., 2002. Regulation and modulation of gastric secretion. Revista de Ciências Médicas 11(1):55-60.

Blanes, L., 2004. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. Disponível em: URL: <http://www.bapbaptista.com>

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm-Wiss u-Techol 28: 25-30.

Brem B, Seger C, Pacher T, Hartl M, Hadacek F, Hofer O, Vajrodaya S, Greger H. 2004. Antioxidant dehydrotocopherols as a new chemical character of *Stemona* species. *Phytochemistry* 65: 2719-2729.

Brunius, U.; Zederfeldt, B. 1965. Effects of Antiinflammatory Treatment on Wound Healing, *Acta Chir Scand*, Sweden, v. 129, p. 462-467

Brzozowska I., Targosz, A., Sliwowski, Z., Kwiecien, S., Drozdowicz, D., Pajdo, R., Konturek, P.C., Brzozowski, T., Pawlik, M., Konturek, S. J., Pawlik, W.W., Hahn, E.G., 2004. Healing of chronic gastric ulcers in diabetic rats treated with native aspirin, nitric oxide (no)-derivative of aspirin and cyclooxygenase (cox)-2 inhibitor. *Journal of Physiology and Pharmacology* 55, 4, 773-790.

Calixto, J.B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Brazilian Journal and Biological Research*. 33: 179-189.

Chapman, E.; Perkin, A.G.; Robinson, R., 1927. The colouring matters of carajura. *Journal Of The Chemical Society* 3015-3041.

Cilli F., Khan M., Fu F., Wang J.H.C. 2004. Prostaglandin E₂ affects proliferation and collagen synthesis by human patellar tendon fibroblasts. *Clin J Sport Med*, 14:232-236.

Clark, D. L. & Thompson, S. R., 2002. Attenuated gastric mucosal blood flow predicts non-healing of benign gastric ulcers. *European Surgical Research* 34(6): 432-436.

Corrêa, P.M., 1926. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas I*; Imprensa Nacional: Rio De Janeiro, p.31-39.

Cragg, M.G. & Newman, D.J., 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 72-79

Deodhar, A.K.; Rana, R.E., 1997. Surgical Physiology of Wound Healing: a Review. *J Postgrad Med*, 43: 52-56.

Devia, B., Llabres, G., Wouters, J., Dupont, L., Escribano-Bailon, M. T., Pascual-Teresa, S., Angenot L., Tits M. 2002. New 3-Deoxyanthocyanidins from Leaves of *Arrabidaea chica*. *Phytochem. Anal.* 13: 114–120.

- Dewick, P.M., 2006. The Shikimate Pathway: Aromatic Amino Acids and Phenylpropanoids: Flavonoids and Stilbenes. In: Dewick, P.M. Medicinal Natural Products, 2nd Edition, John Wiley & Sons LTD, England, p. 149-151.
- Ephgrave, K. S., Brasel, K. J., Culle, J. J., Broadhurst, K. A., 1998. Gastric mucosal protection from enteral nutrients: role of motility. Journal of American College of Surgeons 186(4): 434- 440.
- Forstner, J. F. & Forstner, G. G., 1994. Gastrointestinal mucus. In: Johnson, L. R., editor. Physiology of the Gastrointestinal tract. 3rd ed. New York: Raven Press; 1255- 1283.
- Fujita, I.; Kiyama, T.; Mizutani, T.; Okuda, T.; Yoshiyuki, T.; Tokunaga, A.; Tajiri, T., 2006. Factor XIII of Anastomotic Leak, and Circulating Growth Factors. J Nippon Med Sch, Nippon. 73: 18-23.
- Galvano F., Fauci L., Lazzarino G., Fogliano V., Ritieni A., Ciappellano S., Battistini N. C., Tavazzi B., Galvano G. 2004. Cyanidins: metabolism and biological properties. Journal of Nutritional Biochemistry 15: 2–11.
- Gawronska-Kozak, B.; Bogacki, M.; Rim, J.-S.; Monroe, W. T.; Manuel, J. A., 2006. Scarless skin repair in immunodeficient mice. Wound Rep Reg 14: 265–276.
- Guerra, M. P. & Nodari, R. O., 2007. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. 2007. *Farmacognosia: da planta ao medicamento* Florianópolis: Editora da UFSC / Porto Alegre: Editora da UFRGS, 5^a ed..p.13-28.
- Guha, S. & Kaunitz, J.D., 2002. Gastroduodenal mucosal defence: an integrated protective response. Current Opinial in Gastroenterology 18 (6): 650 – 657.
- Guo, H.H., Ling W.H, Wang Q., 2007. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. Plant Foods for Human Nutrition 62 (1): 1-6.
- Gutierrez, R.M.P., Vargas R. 2006. Evaluation of the wound healing properties of *Acalypha langiana* in diabetic rats. Fitoterapia 77: 286–289.

- Hamburger, M.; Marston, A.; Hoostettmann, K., 1991 Search for new drugs of plant origin. *Advances in Drug Research* 20:167-169.
- Harborne, J. B.; Williams, C. A., 1998. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Report* 15: 631-652.
- Harborne, J.B., 1967. Comparative Biochemistry of the flavonoids – VI. Flavonoid Patterns in the Bignoniaceae and the Gesneriaceae. *Phytochemistry*, 6: 1643-1651.
- Harris, C.S., Burt A.J., Saleem A., Le P.M., Martineau L.C., Haddad P.S., Bennett S.A., Arnason J.T., 2007. A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*. *Phytochemical Analysis* 18 (2): 161-169.
- Holzer, P., 2000. Gastroduodenal mucosal defense. *Current Opinion in Gastroenterology* 16(6): 469-478.
- Holzer, P., 2006. Efferent-like roles of efferent neurons in degut: blood flow regulation and tissue protection. *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical* 125(1-2): 70-75.
- Houghton, P.J., Hylands, P.J., Mensah, A.Y., Hensel, A., Deters A.M. 2005. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. *J Ethnopharmacol* 100: 100–107.
- Jiménez-Escrig A., Jiménez-Jiménez I., Sánchez-Moreno C., Saura-Calixto F., 2000. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Sci Food Agric* 80: 1686-1690.
- Junqueira L. C., Carneiro J. (1999). *Histologia Básica*. 9º edição, Guanabara Koogan, 72-97.
- Kalil Filho, A. N.; Costa Kalil, G.P.; Reis Luz, A.I., 2000. Conservação de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da Amazônia brasileira para uso humano. Ministério da Agricultura e do Abastecimento: Comunicado Técnico EMBRAPA, 50:1-4.
- Kong, J. M.; Khang, N.K.; Chia L. S.; Chia, T.F., 2003. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacology Singapore* 24 (1): 7-21.

Kumar, S.; Wong, P.F.; Leaper, D.J., 2004. What's New in Wound Healing? Turk J Med Sci 34:147-160.

Ma L., Chow, J. Y. C., Liu, E. S. L., Cho, C. H., 1999. Cigarette smoke and its extract delays ulcer healing and reduces nitric oxide synthase activity and angiogenesis in rat stomach. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 26 (10): 828–829.

MacKay, D., Miller, A. L.. 2003. Nutritional Support for Wound Healing. Altern Med Rev 8: 359-377.

Maehata Y., Takamizawa S., Ozawa S., Izukuri k., Kato Y., Sato S., Lee M., Kimura A., Hata R. 2007. Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. Matrix Biology 26:371-381

Mandelbaum, S.H., Di Santis, E.P., Mandelbaum, M.H.S.A., 2003. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources – Part I. An Bras Dermatol, 72: 393-410.

Martin, G. R. & Wallace. J. L., 2006. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. Experimental Biology & Medicine 231(2): 130-137.

Martindale JL, Holbrook NJ. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. Journal of Cellular Physiology 192:1-15.

Mavioso C., 2003. Noções Básicas sobre feridas e cicatrização. <http://www.gaif.net/feridasecicatriz.pdf>, acessado em 10/2007.

Mazza, G.; Miniati, E., 1993. *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. Boca Raton, FL: CRC Press 379p.

Mensah A.Y., Sampson J., Houghton P.J., Hylands P.J., Westbrook J., Dunn M., Hughes M.A., Cherry G.W. 2001. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing Journal of Ethnopharmacology 77: 219–226.

Monteiro K M, 2006. Avaliação Farmacológica e Toxicológica do Complemento nutricional “TK3”, Dissertação de Mestrado, 161 pg

- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Motilva, V., Alarcón de la Lastra, C., Bruseghini, L., Manuel Herreiras, J., Sanchez-Fidalgo, S., 2005. Cox expression and PGE2 and PGD2 production in experimental acute and cronic gastric lesions. *International Immunopharmacology* 5: 369-379.
- Newman D. J. & Cragg G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70(3):461-77.
- Oliveira S.T., Leme M.C., Pippi N. L., Raiser A.G., Manfron M.P. 2001. Preparation of comfrey (*Symphytum officinale* L.) on cutaneous wound healing in rats. *Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro.* 7/8: 61-65.
- Ozgen, U., Ikbali M., Hacimuftuoglu A., Houghton P.J., Gocer F., Dogan H., Coskun M.. 2006. Fibroblast growth stimulation by extracts and compounds of *Onosma argentatum* roots. *Journal of Ethnopharmacology* 104: 100–103.
- Pajares JM, Gisbert JP., 2006. Helicobacter pylori: its discovery and relevance for medicine. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 98: 770- 785.
- Panchatcharam, M., Miriyala, S., Gayathri, V. S., Suguna, L. 2006. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biochemistry* 290: 87–96.
- Pauletto, P.M.; Castro-Gamboa, I.; Silva, D.H.S.; Young, M.C.M.; Tomazela, D.M.; Eberlin, M.N.; Bolzani, V.S., 2003. New antioxidant C-Glucosylxanthones from stems of *Arrabidaea samydoides*. *Journal of Natural Products*. 66: 1384-1387.
- Pimentel E. R., 2001. Matriz Extracelular. In: *A Célula*, 1ª edição, Editora Manole, Brasil, p.217-234
- Pimentel E. C., 2002. Fitoterapia, disponível em URL: http://www.campinas.sp.gov.br/saude/programas/saude_fitoterapia.htm consultado em dezembro de 2007.

Prandi Filho, W.; Simões, M.J.; Kulay Jr., L.; Gondenber, S., 1988. Aspectos morfológicos e morfométricos do processo inflamatório provocado por fio de algodão no subcutâneo de ratos tratados com diclofenaco sódico. *Acta Cirurgica Brasileira* 3: 32-37.

Prior R.L., Wu X., Schaich K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.

Qiao, W. L., Wang, L., Zang, J. F, Zang, Y. M., 2006. Effects of gastric ischemia-reperfusion on gastric mucosal cellular apoptosis and proliferation in rats. *Acta Physiologica Sinica* 58(3) 237-243.

Rajendram, R. & Preedy, V. R., 2005. Effect of alcohol consumption on the gut. *Digestive Diseases* 23(3-4): 214-221

Reddy, B.S., Reddy, R.K.K., Naidu, V.G.M., Madhusudhana, K., Agwane, S.B., Ramakrishna, S., Diwan, P.V. 2007. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and wound healing potentials of *Holoptelea integrifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* doi:10.1016/j.jep.2007.09.031, assessed in 11/2007.

Roger, C. C., Hanaway, M., Alloway, R.R., Alexander, J.W., Boardman, R.E., Trofe, J., Gupta, M., Merchen, T., Buell, J. F., Cardi, M., Roy-Chaudhury, P., Succop, P., Woodle, E. S. 2005. Corticosteroids avoidance ameliorates lymphocele formation and wound healing complications associated with sirolimus therapy. *Transplantation Proceeding* 37: 795-797.

Schubert, M.L., 2000. Gastric secretion. *Current Opinion in Gastroenterology*, 16: 463- 468.

Schwartz R.A, Centurion S. A., Solis C. S. 2007. Cosmeceuticals. <http://www.emedicine.com/derm/topic509.htm>, assessed in 28/11/2007.

Scogin, R., 1980. Anthocyanins of the Bignoniaceae. *Biochemical and Systematics Ecology* 8: 273-276

Shestopalov A. V., Shkurat T. P., Mikashinovich Z. I., Kryzhanovskaya I. O., Bogacheva M. A., Lomteva S. V., Prokofev V. N., Gus'kov E. P. 2006. Biological Functions of Allantoin. *Biology Bulletin*, 33: 437-440.

Sobre seu estômago: Gastrite e dispepsia funcional, disponível em: URL: <http://www.gastronet.com.br/imagens/mucosagastr.jpeg>, acesso em Dezembro de 2007

Takemura, O. S.; Iinuma, M.; Tosa, H.; Miguel, O. G.; Moreira, E. A.; Nozawa, Y., 1995. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *cuprea*. *Phytochemistry* 38: 1299-1300.

Takeuchi K, Aihara E, Hayashi M, Sasaki Y., 2005. Role of Prostaglandin E Receptor Subtypes in Gastroduodenal HCO₃ – Secretion. *Medicinal Chemistry* 1(4):395-403.

Tsuda T, Ueno Y, Yoshikawa T, et al., 2006. Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. *Biochemical Pharmacology* 71(8):1184-1197.

Tubaro A, Dri P, Delbello G, Zilli C and Della Loggia R, 1985. The Croton oil ear test revisited. *Inflammation Research* 17: 347-349.

Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Tancheva S., 2007. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin induced diabetic rats. *Methods And Findings In Experimental And Clinical Pharmacology* 29 (2): 101-105

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44–84.

Vidinsky, B., Gal P., Toporcer, T., Longoauer, F., Lenhardt, L., Bobrov, N., Sabo, J., 2006. Histological study of the first seven days of skin wound healing in rats. *Acta Vet. Brno* 75: 197-202.

Von Poser, G.L., Schripsema, J., Henriques, A.T., Jensen, S.R., 2000. The distribution of iridoids in Bignoniaceae *Bioch. Syst. Ecol.* 28, 351-366.

Wallace J. L., 2006. Nitric oxide, aspirin-triggered lipoxins and NO-aspirin in gastric protection. *Inflammation & Allergy Drugs Targets* 5(2): 133- 137.

Wen, D.; Li, C.; Di, H.; Liao, Y.; Liu, H., 2005. A universal HPLC method for determination of phenolic acids in compound herbal medicines. *American Chemical Society* 53(17): 6624-6629.

Williams, C.A. & Grayer, R.J., 2004. Review Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Product Reports* 21(4): 539-573.

Winter C.A., Risley E.A., Nuss G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 111:544-547.

Witte, M.B.; Barbul, A., 1997. General Principles of Wound Healing. *Surg Clin North Am* 77: 509-528.

Woessner Jr., J. F. 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 93: 440-447.

Zafra-Stone S., Yasmin T., Bagchi M., 2007. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research* 51(6):675-683.

Zorn B., Garcia-Piñeres A. J., Castro V., Murillo R., Mora G., Merfort I. 2001. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry* 56: 831–835.

ANEXO

1. Artigo Submetido

Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract

Michelle P. Jorge^{1,2}, Cristiana Madjarof¹, Ana Lúcia T. G. Ruiz¹, Alik T. Fernandes^{1,2}, Rodney.A.F. Rodrigues¹, Ilza M.O. Sousa¹, Mary Ann Foglio¹, João Ernesto de Carvalho^{1,2*}

¹CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, UNICAMP; ²Depto de Clínica Médica, UNICAMP

* Corresponding author: PO BOX: 6171, 13083 970, Campinas, SP, Brazil

Tel: +5519-38847500, Fax: 55 19 3884 7811; e-mail: carvalho@cpqba.unicamp.br

Abstract

Arrabidaea chica Verlot. (Bignoniaceae), leaves, popularly known as Crajiru, is employed in folk medicine for wound healing, anti-inflammatory, and intestinal colic. Herein we report the *in vitro* and *in vivo* healing and antioxidant activities of *Arrabidaea chica* Verlot crude extracts.

A. chica crude extract stimulated cell growth in a concentration dependent way and demonstrated similar effect as allantoin and vitamin C increasing *in vitro* collagen production. Also, *A. chica* crude extract demonstrated moderate scavenger effect (DPPH assay) and moderate reducing effect (Folin-Ciocalteu reagent).

Wound healing experimental models in rats reduced in 96% the wounds size after ten days treatment, while saline group showed only 36% wound healing.

The crude extract's efficiency seems to involve fibroblast growing stimulus and collagen synthesis both *in vitro* and *in vivo*, beyond the moderate scavenging activity, corroborating with the folk use of this plant species.

Keywords: *Arrabidaea chica*, wound healing, collagen, fibroblast, antioxidant activity.

1. Introduction

The skin is the largest organ of the body with the purpose to serve as barrier against external agents. The lost of skin tissue integrity can cause lesions or illnesses that can lead to death. (Balbino et al, 2005). Wound healing is a dynamic process involving biochemical and physiological phenomena that behave in a harmonious way in order to guarantee tissue restoration (Mandelbaum et al, 2003). Wound healing consists of an orderly progression of events that re-establish the integrity of the damaged tissue: inflammatory, proliferation and remodeling stages. Alterations in any of these steps can lead to healing delay or even the inability for dermal wound healing. (Mavioso C., 2003).

The inflammation stage begins immediately after injury, first with vasoconstriction that favors homeostasis and releases inflammation mediators. The proliferative phase is characterized by granulation tissue proliferation formed mainly by fibroblast and the angiogenesis process. The remodeling stage is characterized by reformulations and improvement in the components of the collagen fiber that increases the tensile strength. (Mandelbaum et al, 2003).

The injury evaluation is essential in order to establish the proper treatment. This involves appraisal of injury location, depth, size, tissue evolution, neighboring tissues, organs, necrosis, secretion, coloring, sensibility, and if patient's health is in risk (Bajay et al, 1999).

Collagen synthesis is essential for wound healing and may be affected by decrease of iron, O₂, vitamin C and alfa-cetoglutarate. These deficiency impair the proline and lysine hydroxylation that result in a synthesis of low resistance collagen and consequently in cicatrization deficiency. (Maehata et al, 2007). Another parameter that can impair the healing process is continuous use of corticoids and anti-inflammatory drugs as well as neuropathologies and ischemic diseases (Rogers et al, 2005; Gutierrez et al, 2006).

The therapeutic benefits of secondary metabolites of plant origin have been focused in many studies (MacKay and Miller, 2003; Houghton et al. 2005; Ozgen et al, 2006). *Arrabidaea chica* Verlot. (Bignoniaceae) leaves, popularly known as Crajiru, is employed in folk medicine for wound healing, treatment of inflammation and intestinal colic. The red

color of its extract is related to the presence of desoxyanthocyanidins (Zorn et al, 2001; Devia et al, 2002). Anthocynins are the most important and widespread group of coloring matters in plants belonging to phenolic compounds class with antioxidant activity, a common property of this type of compounds. (Galvano et al, 2004).

Herein we report the *in vitro* and *in vivo* healing and antioxidant activities of *Arrabidaea chica* Verlot crude extracts.

2. Material and Methods

2. 1. Plant material:

Leaves of *A. chica* were collected at CPQBA-Unicamp experimental field (Paulínia, Brazil). Voucher deposit 1348 at CPQBA-Herbarium. Dr. Glyn Mara Figueira was responsible for identification.

2. 2. Extraction:

The fresh grinded leaves were extracted with a methanol/ 0.3% citric acid solution at room temperature by maceration. The extract was filtered and the solvent eliminated under vacuum providing the crude extract with 15% yield (leaves dry basis).

2. 3. Pigment Quantification (Devia et al, 2002)

The extract was analyzed for carajurin and carajurone presence by HPLC-DAD (Shimatzu), Phenomenex Gemine C-18 column (4,6 mm x 250mm i.d. 3 µm), flow rate 1 mL/min, mobile phase methanol : water phosphoric acid (pH 2,00) gradient elution.

2. 4. *In vitro* test for fibroblast growth stimulation

This assay was performed according to Mensah et al (2001) with small modifications. Confluent human fibroblasts, kindly donated by Allergisa Pesquisa Dermato-Cosmética Ltda, were used for the experiments. Cells (passage 15 to 25) were trypsinized and resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/10% fetal bovine serum

(FBS) and diluted in the same mixture to give a standardized suspension of 1×10^4 cells/ml. The cells were seeded at a density of 1×10^3 cells/well in a 96 well plate and plates maintained at 37°C in a humidified incubator of 5%CO₂ atmosphere. The medium was replaced after 24 h with DMEM/0.3% FBS and after 48 h serial dilutions of the extract of *Arrabidaea chica* and Allantoin were added in this medium to give a final concentrations in the wells between 0.25µg/ml and 250µg/ml. DMEM/0.3% FBS and DMEM/10% FBS alone were used to serve as maintenance and positive growth stimulant controls respectively. The cells were incubated for 72 h, the medium was discarded and cells were allowed to recover in fresh medium for 24h before MTT assay (Mosmamm, 1983) to access cell viability.

2.5. Collagen Synthesis *in vitro* Experiment

The assay was performed following the protocol published by Cilli et al. (2004) with small modifications. Human fibroblast were seeded at a density of 1×10^3 cells/well in a 96 well plate and plates maintained at 37°C in a humidified incubator of 5%CO₂ atmosphere. After 24 h, samples (*A. chica* extract, allantoin and ascorbic acid) were added to the growth medium to give a final concentration of 25µg/ml of ascorbic acid (positive group) and 250 µg/ml of allantoin and *A. chica* extract. The cells were incubated in this medium for 72 hour. Then the medium of each well was collected; 1mL aliquots were hydrolyzed with 0.5mL of 6 N HCL for 20 minutes at 120°C by autoclave. Samples where then cooled to measure total collagen levels using hydroxyproline analyses.

2.6. Hidroxyproline assay

The assay was performed following the protocol published by Woessner (1961) modified by Gawronska-Kozak et al (2006). 20µL of each hydrolyzed samples was added to 96-well plate and incubated for 20 minutes at room temperature with 50µL/well of chloramines T solution (282mg chloramines T, 2mL *n*-propanol, 2ml distilled water, and 16mL citrate acetate buffer). Then 50µL/well of Erlich's solution [2.5g 4-(dimethyloamino)benzaldehyde, 9,3ml *n*-propanol, and 3,9mL 70% perchloric acid] was added and incubated for 15 min at 65°C. Absorbance was measured at 550nm with a microplate reader (VERSA Max,

Molecular Devices). Hydroxyproline concentrations from 0 to 10µg/mL were used to make a standard curve, and results were expressed as µg/mL of hidroxiprolina.

2.7. DPPH

Microplate DPPH assay was performed as described by Brand-Williams et al (1995) modified by Brem et al (2004). Briefly, in a 96-well plate, successively sample dilutions (100µL/well, 0.25, 2.5, 25 and 250µg/mL), in triplicate, received DPPH solution (40µM in methanol, 100 µL/well) and absorbance was measured at 550nm with a microplate reader (VERSAmax, Molecular Devices). Results were determined each 5 minutes until 150 min in order to evaluate kinetic behavior of the reaction. The percentage of remaining DPPH was calculated as follows: $\%DPPH_{rem} = 100 \times ([DPPH]_{sample}/[DPPH]_{blank})$. A calibrated Trolox standard curve was also made.

The percentage of remaining DPPH against the standard concentration was then plotted in an exponential regression, to obtain the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% (EC₅₀). The time needed to reach the steady state to EC₅₀ (TEC₅₀) was verified experimentally and in order to correlated TEC₅₀ and EC₅₀ the antiradicalar efficiency (Jiménez-Escrig et al, 2000), was calculated as follows: $AE=1/(EC_{50} \times TEC_{50})$.

2.8. Folin Ciocalteu Reagent (FCR) Reducing Capacity Assay:

It was performed as described by Prior et al (2005), with small modifications in order to use a microplate reader. Briefly, an aliquot (10 µL) of the sample (1mg/mL) was diluted in distilled water (600 µL). Then, this solution was applied in a 96-well plate (150µL per well), in triplicate, and received Folin-Ciocalteu solution (12.5 µL), sodium carbonate (37.5 µL, 1M) and water (50 µL). After incubation at 37°C during 2h, absorbance was measured at 725nm with a microplate reader (VERSA Max, Molecular Devices). A calibrated gallic acid standard curve was made and results were expressed as mg equivalents in gallic acid per gram of sample.

2.9. *In vivo* wound healing evaluation:

2.9.1. Animals

Health adults (250-300g) male Wistar (*Rattus norvegicus*) acquired from the experimental animal center (CEMIB) of the University of Campinas were used. During maintenance period (at least seven days before the beginning of study) all animals were housed in polycarbonate cages, under a climate-controlled environment ($22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ and relative humidity 30-70%), a 12-hour light/dark cycle and unlimited access to convectional standard palletized laboratory ration (Nuvilab[®]) and water.

Animal's welfare guidelines were adopted (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 1996, International Guiding Principles for Biomedical Research involving animals, 1985). The protocols employed are in agreement with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the Unicamp animal ethic committee.

2.9.2. Surgical procedures and treatment

This assay was performed according to Panchatcharam et al (2006) with small modifications. Wistar rats weighting 250-300g were divided in 3 groups of 5 animals each: saline (group I), allantoin (100mg/mL, group II) and *A. chica* (100mg/mL, group III). After anesthesia by thiopental, the backs of animals were shaved and sterilized with 70% EtOH. Excision wounds sized 1.5 cm^2 in average were made and treated topically during 10 days by applying 200 μL /wound of each sample, and protected by wound curative. The wounds were analyzed every day and wound area contractions were measured and calculated as percentage reduction of initial wound area.

In the 11 day the animals were sacrificed by thiopental anesthesia. Tissues from the wound site of each animal were removed for histopathological analysis and for total collagen determination by hidroxypoline assay. Eight millimeter diameter skin punches were homogenized in 2ml of phosphate buffered saline and stored in 4°C overnight. After that, 1mL aliquots were hydrolyzed with 0.5mL of 6N HCL for 5 hours at 120°C . Samples where then cooled and were evaluated by hydroxypoline analyses as described in item **2.6**.

2.9.3. Histopathological studies

Skin specimens from treated and untreated rats were collected in 10% buffered formalin and after the usual processing, 5µm-thick sections were cut and stained with Masson Trichrome. Sections were qualitatively assessed under the light microscope and graded with respect to collagen formation employing light to intense scale (+ to ++++) (Vidinsky et al, 2006).

2.10. Statistical analysis

All treated groups were compared with the control group and the results were analyzed statistically using multi-way ANOVA and followed by Duncan test to identify the differences between treated groups and control. The data were considered significant at $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Pigment Quantification

The HPLC analyses demonstrate the presence of carajurin and carajurone in *A. chica* crude extracts used in the pharmacological assays.

3.2. *In vitro* test for fibroblast growth stimulation

A. chica crude extract and allantoin (0.25µg/ml to 250µg/ml) stimulated fibroblast growth with EC₅₀ of 30µl/ml for *A.chica* and 2µl/ml for allantoin. Untreated fibroblasts exposed to SFB medium were used as control. Their final state was considered 100% (Figure 1).

3.3. *In vitro* Collagen Synthesis by Hydroxyproline analyses

Figure 2 demonstrated synthesis collagen variation, determined by hydroxyproline concentration after fibroblast treatment with crude *A. chica* extract (250µg/mL), allantoin (250µg/mL) and ascorbic acid (25µg/mL). The results demonstrated that *A. chica* crude extract stimulated in three fold collagen synthesis ($p < 0.01$).

3.4. Antioxidant Evaluation:

Table 1 shows the results of DPPH e FCR tests, which demonstrated moderate antioxidant activity produced by *A. chica* crude extract.

3.5. Surgical procedures and treatment

Figure 3 demonstrates healing evolution throughout ten days with treatment. *A. chica* crude extract significantly decreased the lesion area compared to saline and allantoin groups. (Figure 4)

3.6. Histopathological studies

Table 2 demonstrates the macroscopic and microscopic analysis after ten days treatment. The results showed a significant healing effect by *A. chica* compared to the other groups tested.

3.7. *In vivo* Collagen Synthesis Experiments by Hydroxyproline analyses

Figure 5 presents the collagen synthesis variation, determined by hydroxyproline concentration, after wound treatments with *A. chica* crude extract, allantoin and saline. The results indicated that *A. chica* crude extract stimulated collagen synthesis *in vivo*, statistically significant ($p < 0.001$) when compared to saline group and statistically analogous to allantoin group, employed as positive control.

4. DISCUSSION

The healing process begins with tissue reposition by cell proliferation presented in connective tissue. The main cells that trigger the wound healing process are the macrophage cells that remove foreign bodies and direct granular tissue development. Sequentially fibroblast and endothelial cells migrate towards the injured area increasing tissue permeability and collagen fiber production. The events of this phase are fibroblast proliferation with collagen synthesis that decreases vascularization by a contraction process

that triggers the scar process. Neovascular tissue and macrophage cells carry chemical mediators, such as enzymes, oxygen and vitamins that are essential to establish high quality fibroblast and collagen formation (Balbino et al, 2005). Therefore induced fibroblast proliferation and collagen production is a way to study the activity of cicatrization drugs (Houghton et al. 2005).

We firstly developed fibroblast culture and collagen quantification techniques to evaluate *in vitro* the *A. chica* crude extract. *A. chica* crude extract stimulated the cell growth in a concentration dependent way with EC₅₀ de 30µl/ml (Fig.1). The result was considered of high potency considering that the sample refers to a crude extract when compared to the positive control, allantoin (EC₅₀ = 2µl/ml). Allantoin was discovered by Vanquelin and Buniva in 1800 and synthesized by Grimax in 1876. This compound is a white, nontoxic, nonirritating, nonallergenic powder that has been reported to promote epithelial stimulation and decrease pain (Shestopalov et al, 2006). It's used as healing agent and detected in *Symphomn officinalis*, traditionally used in wound healing (Oliveira et al, 2001). Therefore after purification and isolation of the crude extract, the active principles with similar activity to allantoin will be identified.

Hydroxyproline is an amino acid essencial for collagen fiber synthesis. For this reason, hydroxyproline content has been used as an indicator to determine the collagen content (Reddy et al, 2007). By measuring hydroxyproline content, *A. chica* crude extract increased collagen production in a similar way of allantoin and vitamin C. The vitamin C is necessary for the hydroxylation of proline and lysine residues in pro-collagen, which is necessary for collagen release. Hydroxyproline also stabilizes the collagen triple-helix structure. In addition to collagen production, vitamin C enhances neutrophil function, increases angiogenesis, and has a powerful antioxidant effect (MacKay and Miller, 2003).

The first cell type recruited into injury site is the neutrophil which has a role in anti-microbial defense and debridement of devitalized tissue by production of proteolytic enzymes and reactive oxygen species. However, the presence of increased numbers of neutrophils through chronic inflammation and the concomitant release of excess proteases and ROS overwhelm the antiprotease substances that normally protect the tissue cells and

the extra cellular matrix from unwanted damage (Mensah et al, 2001). At high concentrations, ROS can induce severe tissue damage and even lead to neoplastic transformation decreasing the healing process by damages in cellular membranes, DNA, proteins and lipids as well (Martindale and Holbrook, 2002). Exposure to free radicals from a variety of sources has led organisms to develop a series of antioxidant defense mechanisms such superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT). Non-enzymatic antioxidants are represented by ascorbic acid (Vitamin C), α -tocopherol (Vitamin E), glutathione (GSH), carotenoids, flavonoids and other antioxidants (Valko et al, 2007). Hence, if a compound having antioxidant potentials and antimicrobial activity additionally, it can be a good therapeutic agent for accelerating the wound healing process (Houghton et al. 2005).

A. chica crude extract was submitted to microplate DPPH assay and reducing capacity assay with Folin-Ciocalteu (FC) reagent demonstrating moderate scavenger effect (DPPH) and also moderate reducing effect (FC) (Table 1). This way, the reputed wound healing properties of *A. chica* crude extract may be explained in part by the antioxidant activities of the anthocyanins present and by the stimulant effect, at low concentrations, on fibroblast growth and on collagen synthesis.

The objective in wound management is to heal the wound in the shortest time possible, with minimal pain, discomfort, and scarring to the patient. At the site of wound closure a flexible and fine scar with high tensile strength is desired (MacKay and Miller, 2003).

In order to confirm the *in vitro* observed results, *A. chica* crude extract were evaluated *in vivo* wound healing experimental model with rats. The results demonstrated that ulcer area decreased 13% (Figure 4) after the second day of topical *A. chica* crude extract treatment. The *A. chica* group demonstrated 96% of healed wounds after ten days treatment, while saline group only showed 36% wound healing (Figure 3).

Hystopathological injury analysis of animal groups treated with allantoin and *A. chica* crude extract demonstrated remarkably collagen deposit compared to the slight deposit observed for the saline group (Table 2). These results were corroborated by the

homogenates hydroxyproline quantification demonstrating once again the crude extracts efficiency that promoted high healing stimulus.

The results reported herein evidence the folk use of this plant species. The crude extract's efficiency seems to involve fibroblast growing stimulus and collagen synthesis both *in vitro* and *in vivo*, beyond the moderate scavenging activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank CPQBA/UNICAMP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

REFERENCES:

- Bajay, H. M., Jorge, S.A., Dantas, S.R.P.E. (coords.). 1999. Tratamento de feridas. Grupo de Estudo de Feridas, Hospital de Clínicas, Unicamp, Campinas, SP, 79pp.
- Balbino, C. A., Pereira, L. M., Curi, R. 2005. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 41: 27-51.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluated antioxidant activity. *Lebensm-Wiss u-Techol* 28: 25-30.
- Brem B, Seger C, Pacher T, Hartl M, Hadacek F, Hofer O, Vajrodaya S, Greger H. 2004. Antioxidant dehydrotocopherols as a new chemical character of *Stemona* species. *Phytochemistry* 65: 2719-2729.
- Cilli F., Khan M., Fu F., Wang J.H.C. 2004. Prostaglandin E₂ affects proliferation and collagen synthesis by human patellar tendon fibroblasts. *Clin J Sport Med*, 14: 232-236.
- Devia, B., Llabres, G., Wouters, J., Dupont, L., Escribano-Bailon, M. T., Pascual-Teresa, S., Angenot L., Tits M. 2002. New 3-Deoxyanthocyanidins from Leaves of *Arrabidaea chica*. *Phytochem. Anal.* 13: 114–120.
- Galvano F., Fauci L., Lazzarino G., Fogliano V., Ritieni A., Ciappellano S., Battistini N. C., Tavazzi B., Galvano G. 2004. Cyanidins: metabolism and biological properties. *Journal of Nutritional Biochemistry* 15: 2–11
- Gawronska-Kozak, B.; Bogacki, M.; Rim, J.-S.; Monroe, W. T.; Manuel, J. A. Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Rep Reg* 14: 265–276.
- Gutierrez, R.M.P., Vargas R. 2006. Evaluation of the wound healing properties of *Acalypha langiana* in diabetic rats. *Fitoterapia* 77: 286–289.

- Houghton, P.J., Hylands, P.J., Mensah, A.Y., Hensel, A., Deters A.M. 2005. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. *J Ethnopharmacol* 100: 100–107.
- Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jiménez I, Sánchez-Moreno C, Saura-Calixto F. 2000. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Sci Food Agric* 80: 1686-1690.
- MacKay, D., Miller, A. L.. 2003. Nutritional Support for Wound Healing. *Altern Med Rev* 8: 359-377.
- Maehata Y., Takamizawa S., Ozawa S., Izukuri k., Kato Y., Sato S., Lee M., Kimura A., Hata R. 2007. Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. *Matrix Biology* 26:371-381
- Mandelbaum, S.H., Di Santis, E.P., Mandelbaum, M.H.S.A., 2003. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources – Part I. *An Bras Dermatol*, 72: 393-410.
- Martindale JL, Holbrook NJ. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology* 192:1-15.
- Mavioso C., 2003. Noções Básicas sobre feridas e cicatrização. <http://www.gaif.net/feridasecicatriz.pdf>, acessado em 10/2007.
- Mensah A.Y., Sampson J., Houghton P.J., Hylands P.J., Westbrook J., Dunn M., Hughes M.A., Cherry G.W. 2001. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing *Journal of Ethnopharmacology* 77: 219–226.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Oliveira S.T., Leme M.C., Pippi N. L., Raiser A.G., Manfron M.P. 2001. Preparation of comfrey (*Symphytum officinale* L.) on cutaneous wound healing in rats. *Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro.* 7/8: 61-65.

- Ozgen, U., Ikbali M., Hacimuftuoglu A., Houghton P.J., Gocer F., Dogan H., Coskun M.. 2006. Fibroblast growth stimulation by extracts and compounds of *Onosma argentatum* roots. *Journal of Ethnopharmacology* 104: 100–103.
- Panchatcharam, M., Miriyala, S., Gayathri, V. S., Suguna, L. 2006. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biochemistry* 290: 87–96.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.
- Reddy, B.S., Reddy, R.K.K., Naidu, V.G.M., Madhusudhana, K., Agwane, S.B., Ramakrishna, S., Diwan, P.V. 2007. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and wound healing potentials of *Holoptelea integrifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* doi:10.1016/j.jep.2007.09.031, assessed in 11/2007.
- Roger, C. C., Hanaway, M., Alloway, R.R., Alexander, J.W., Boardman, R.E., Trofe, J., Gupta, M., Merchen, T., Buell, J. F., Cardi, M., Roy-Chaudhury, P., Succop, P., Woodle, E. S. 2005. Corticosteroids avoidance ameliorates lymphocele formation and wound healing complications associated with sirolimus therapy. *Transplantation Proceeding* 37: 795-797.
- Schwartz R.A, Centurion S. A., Solis C. S.. 2007. Cosmeceuticals. <http://www.emedicine.com/derm/topic509.htm>, assessed in 28/11/2007.
- Shestopalov A. V., Shkurat T. P., Mikashinovich Z. I., Kryzhanovskaya I. O., Bogacheva M. A., Lomteva S. V., Prokofev V. N., Gus'kov E. P. 2006. Biological Functions of Allantoin. *Biology Bulletin*, 33: 437–440.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44–84.

- Vidinsky, B., Gal P., Toporcer,T.,Longoauer, F., Lenhrdt, L., Bobrov,N., Sabo,J.
Histological study of the first seven days of skin wound healing in rats. Acta Vet.
Brno 75:197-2002
- Woessner Jr., J. F. 1961.The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples
containing small proportions of this imino acid. Archives of Biochemistry and
Biophysics 93: 440-447.
- Zorn B., Garcia-Piñeres A. J., Castro V., Murillo R., Mora G., Merfort I. 2001. 3-
Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. Phytochemistry 56: 831–835.

Table 1**Antioxidant effect of *Arrabidaea chica* extract in DPPH and FCR assay**

	DPPH *			FCR *
	EC ₅₀	TEC ₅₀	EA	mg _{AcG} /g _{extract}
<i>Arrabidaea chica</i>	15.98 ± 0.78	0.1	0.44 ± 0.17	67.69 ± 0.68
Trolox	2.73 ± 0.10	0.1	3.68 ± 0.14	116.70 ± 21.01

* Results expressed as mean ± SEM

Table 2. Histopathological studies.

	Macroscopic*	Microscopic
	Lesion area	Collagen
Saline	1.0 cm ²	+
Allantoin	0.8 cm ²	+++
<i>A. chica</i>	0.3 cm ²	+++

* Initial lesion area = 1.5 cm²

Fig. 1. Growth stimulation effect of *Arrabidaea chica* extract on fibroblasts

Fig. 2. Effect of *Arrabidaea chica* extract on *in vitro* Collagen Synthesis measured by Hydroxyproline analyses

Fig. 3. Wound healing effect of *Arrabidaea chica* treatment

Fig. 4. Visual observation of wound healing experiment at 10th days. A) Saline group, B) *A. chica* group, C) Allantoin group.

Fig. 5. Effect of *Arrabidaea chica* extract on *in vivo* Collagen Synthesis measured by Hydroxyproline analyses

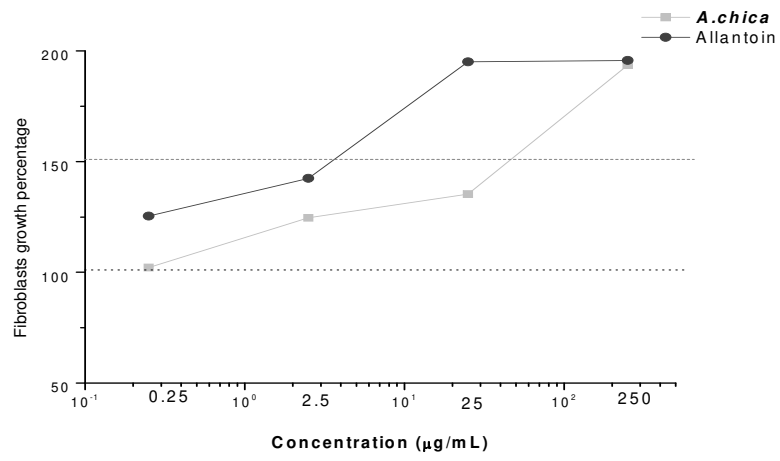
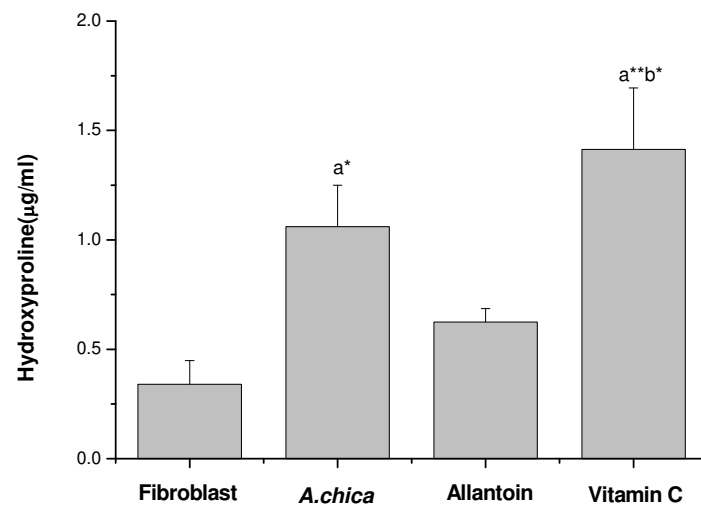


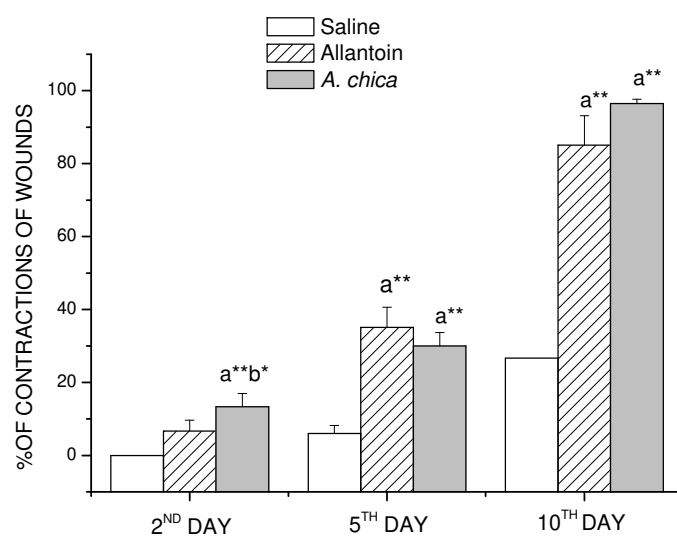
Fig. 1.



^a different from fibroblast; ^b different from allantoin, ** p<0,001, *p< 0,01

Treatment: *A. chica* extract (250 µg/mL), Allantoin (250 µg/mL), Ascorbic acid (25 µg/mL).

Fig.2.

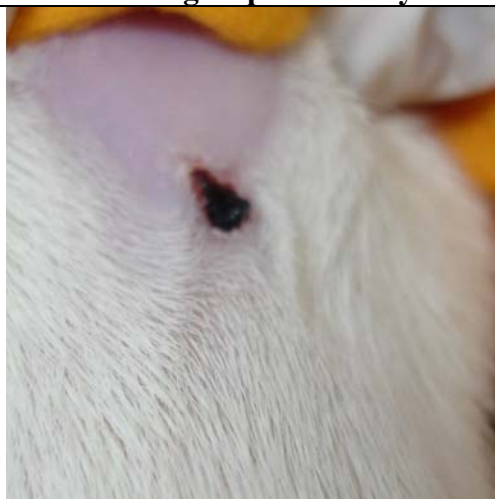


^a different from saline; ^b different from allantoin, ** p<0,001, *p< 0,01
 Treatment: *A. chica* extract (100mg/mL), Allantoin (100mg/mL), Saline (0,9%).

Fig. 3.



Saline group – 10th day

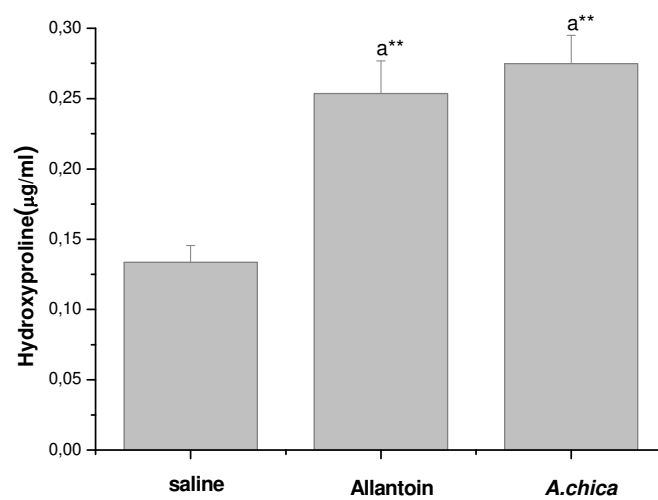


Allantoin group – 10th day



***A. chica* group – 10th day**

Fig. 4.



^a different from saline; ** p<0,001

Treatment: *A. chica* extract (100mg/mL), Allantoin (100mg/mL), Saline (0.9%).

Fig. 5.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

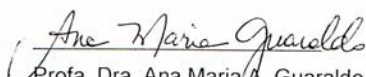
CERTIFICADO

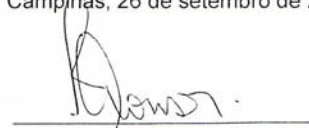
Certificamos que o Protocolo nº 1346-1, sobre "Atividade cicatrizante e antioxidante dos extratos brutos de *Arrabidaea chica* e *Plathymenia reticulata*", sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Alik Teixeira Fernandes dos Santos / Michelle Pedroza Jorge, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 26 de setembro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1346-1, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 26, 2007.

Campinas, 26 de setembro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva