



MICHELLE PEDROZA JORGE

**ATIVIDADE CICATRIZANTE DE MICROENCAPSULADOS DE
EXTRATO BRUTO ETANÓLICO OBTIDO DE *Arrabidaea chica*
(HUMB. & BONPL.) VERLOT.**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

MICHELLE PEDROZA JORGE

ATIVIDADE CICATRIZANTE DE MICROENCAPSULADOS DE EXTRATO BRUTO
ETANÓLICO OBTIDO DE *Arrabidaea chica* (HUMB. & BONPL.) VERLOT.

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de
título de Doutora em Clínica Médica na área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
MICHELLE PEDROZA JORGE, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

J768a Jorge, Michelle Pedroza, 1981-
Atividade cicatrizante de microencapsulados de extrato bruto etanólico de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot / Michelle Pedroza Jorge. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: João Ernesto de Carvalho.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Arrabidaea chica*. 2. Microencapsulação. 3. Cicatrização. 4. Diabetes. I. Carvalho, João Ernesto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Wound healing activity of microencapsulated of crude ethanolic extract obtained from *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot

Palavras-chave em inglês:

Arrabidaea chica

Microencapsulation

Healing

Diabetes

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

João Ernesto de Carvalho [Orientador]

Herve Louis Ghislain Rogez

Humberto Moreira Spindola

Luz María Sánches Perera

Andréa Aparecida de Aro

Data de defesa: 13-09-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MICHELLE PEDROZA JORGE

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO

MEMBROS:

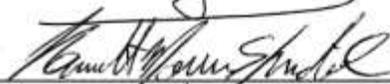
1. PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO



2. PROF. DR. HERVE LOUIS GHISLAIN ROGEZ



3. PROF. DR. HUMBERTO MOREIRA SPINDOLA



4. PROF. DR. LUZ MARÍA SÁNCHEZ PERERA



5. PROF. DR. ANDRÉA APARECIDA DE ARO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 13 de setembro de 2013

Dedicatória

Os sonhos mais lindos vocês sonharam e sonham pra mim, esta foi mais uma conquista. Vocês também são Doutor Claudio e Doutora Vitória, pai, mãe, companheiros, amigos, sempre prontos a dar colo, abraços e beijos. Amo muito vocês.

Felipe, meu grande amor, construímos ao longo desta jornada uma linda família, o Matheus e a Manu são nossa maior conquista. Obrigada pela paciência e companheirismo. Amo muito vocês.

As minhas vós Deolinda e Neiva que sempre olham por mim e me ensinaram que a maior riqueza de uma pessoa é a educação. Amo muito vocês.

A minha querida irmã Caroline, guerreira, companheira, amiga pra todas as horas.

A Isolina que há 27 anos cuida da nossa família com muito amor e carinho.

AMO MUITO VOCÊS

**“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade”**

Prelúdio

Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

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

A família DFT, uma família muito unida e também muito orçada! Em Especial a aqueles que sempre estiveram ao meu lado pro que der e vier: Vanessa, Gabi, Vivi, Matu, Betão, Ricardo, Sica e Karin.

As chicosas mais que especiais: Leila, Patricia e Ilza.

A Galera da DFito pelo carinho e em especial aos queridos Nubia e Rodney.

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

Um agradecimento mais que especial ao meu querido orientador João Ernesto de Carvalho, às co-orientadoras Ana Lucia, Mary Ann, por acreditarem, e desacreditarem, me deixando caminhar e aprendendo com os erros e acertos.

A FAPESP e ao CNPq e a, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa.

A cada um que eu possa ter esquecido, mas que tenha torceu e me deu um simples sorriso, ou por apenas não ter apurrinhado.

Muito obrigada a todos.

Resumo

A cicatrização é um processo fisiológico dinâmico e complexo que visa a restauração da função e da continuidade anatômica dos tecidos. A espécie *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot, encontrada em quase todo o Brasil e que faz parte da relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS (Rennisus), é popularmente utilizada para auxiliar a cicatrização de feridas. Tomando por base resultados de estudos farmacológicos anteriores, a presente tese teve por objetivo aperfeiçoar a qualidade e a estabilidade do extrato bruto de *A. chica* (EB) através da microencapsulação pelo processo de atomização, dando origem ao extrato bruto microencapsulado (EBM). Os estudos de estabilidade comparativa do EB e EBM, avaliados por análises fitoquímicas e farmacológicas, demonstraram que o processo de microencapsulamento foi capaz de evitar a degradação química das três antocianidinas empregadas como marcadores químicos e de manter a atividade antiulcerogênica após 180 dias. Estudos subsequentes de mecanismo de ação protetora gástrica demonstraram o efeito do EB (dose 125 mg/Kg) sobre a produção de muco e secreção ácida, comprovados em modelos de dosagem de muco e ligadura de piloro em ratos. A análise dos possíveis mecanismos de ação antissecretora do EB sugere uma ação antagonista sobre os receptores de gastrina e de acetilcolina agindo, possivelmente, sobre a via dos segundos mensageiros. A fim de elucidar a atividade angiogênica do EB, foram realizados estudos em membrana corioalantóide (CAM) de ovos e tegumento do dorso de camundongos cujos resultados indicaram ação pró-angiogênica. Além disso, avaliou-se a ação cicatrizante em modelo de úlcera dérmica em ratos portadores de diabetes induzida por estreptozotocina (60 mg/Kg). A redução da área ulcerada nos animais diabéticos tratados com EB e EBM por via tópica (85% e 86%, respectivamente) foi comparável àquela observada nos animais pertencentes ao grupo controle positivo do experimento, alantóina (85%). Finalmente, a avaliação de segurança do EB na dose de 300 mg/Kg foi realizada através do teste de toxicidade oral, em roedores, em doses repetidas, durante 28 dias ao final dos quais não foram evidenciados quaisquer sinais clínicos, anátomo-patológicos, hematológicos ou bioquímicos de toxicidade. Os resultados deste trabalho permitiram a definição de parâmetros de eficácia, segurança e reprodutibilidade, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de um novo medicamento fitoterápico a partir do extrato bruto de *Arrabidaea chica* para o tratamento de úlceras cutâneas e gástricas, derivadas ou não das complicações da diabetes.

Palavras-chave: *Arrabidaea chica*, microencapsulação, cicatrização, diabetes.

ABSTRACT

Wound healing is a dynamic and complex physiological process that aims restoring function and anatomical continuity of tissues. The species *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot, found throughout Brazil and part of the national list of medicinal plants of interest to the SUS (Rénisus), is popularly used to wound healing. Based on previous pharmacological studies, this thesis aimed to improve the quality and stability of *A. chica* crude extract (EB) through microencapsulation by atomization process affording microencapsulated crude extract (EBM). Stability study comparing EB and EBM phytochemical and pharmacological aspects showed that the microencapsulation process was able to avoid chemical decomposition of three anthocyanidins used as chemical markers as well as to keep the antiulcer activity. Further mechanism of action studies have demonstrated that the protective gastric effect of EB (dose 125 mg / kg) involves modulation of mucus and gastric acid production, evidenced by mucus dosage and pylorous ligation models in rats. Moreover, antisecretory mechanisms of action of EB could be related to an antagonistic action on gastrin and acetylcholine receptors probably acting on second messengers. In order to evidence angiogenic activity of EB, studies have been conducted on chorioallantoic membrane (CAM) of eggs and dorsum integument of mice showing that EB has pro-angiogenic effects. Furthermore, the wound healing effect of EB and EBM have been evaluated on dermal ulcer model in streptozotocin-induced diabetic rats affording that topical administration of EB or EBM had reduced the ulcerated area in 85 % and 86 %, respectively, in diabetic animals treated during 10 days been comparable to positive control group (allantoin, 85 % of reduction). Finally, safety assessment of EB at dose of 300 mg/kg has been performed using the 28-day repeated dose oral toxicity assay in rodents, presenting no clinical, pathological, biochemical or hematological toxicity signs. The results of this project stabilised some efficacy, safety and reproducibility parameters providing subsidies for the development of a new herbal medicine from *Arrabidaea chica* crude extract for skin and gastric ulcers treatment, whether not derived from diabetes complications.

Keywords: *Arrabidaea chica*, microencapsulation, healing, diabetes.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	39
OBJETIVOS	45
1. OBJETIVO	46
2. <i>Objetivos específicos</i>	46
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	47
1. <i>Pele</i>	48
1.1. <i>Epiderme</i>	48
1.2. <i>Junção Dermoepidérmica</i>	49
1.3. <i>Derme</i>	50
1.3.1 <i>Fibroblastos</i>	52
1.3.2 <i>Colágeno</i>	53
2. <i>CICATRIZAÇÃO</i>	57
2.1. <i>Fase Inflamatória</i>	58
2.2. <i>Fase Fibroblástica e Angiogênese</i>	59
2.2.1. <i>Angiogênese</i>	60
2.3. <i>Fase de Remodelamento</i>	61
3. <i>DIABETES X CICATRIZAÇÃO</i>	61
4. <i>ÚLCERA GÁSTRICA</i>	63
4.1. <i>Secreção Gástrica</i>	65
4.2. <i>Mediadores da Defesa Gástrica</i>	66
5. <i>FITOTERÁPICOS</i>	67
5.1. <i>Processo de secagem e microencapsulação por Spray Dryer de extratos brutos de plantas</i>	67
5.2. <i>Estabilidade dos Fitoterápicos</i>	68
6. <i>ARRABIDAEA CHICA (HUMB. & BONPL.) VERLOT</i>	70
MATERIAL E MÉTODOS	75
1. <i>ESTUDO FITOQUÍMICO</i>	76
1.1. <i>Obtenção do material vegetal</i>	76
1.2. <i>Preparação de Extratos Vegetais</i>	77
1.2.1. <i>Secagem e moagem do material vegetal</i>	77
1.3. <i>Extração de A. chica</i>	78
1.4. <i>Condições do Spray Dryer para processar os extratos brutos de Arrabidaea chica Verlot</i>	79
1.4.1. <i>Extrato Bruto (EB)</i>	79
1.4.2. <i>Extrato Bruto Microencapsulado (EBM) -Microencapsulação por Atomização</i>	80
1.4.3. <i>Eficiência da encapsulação</i>	82
1.5. <i>Teste de Estabilidade Acelerada</i>	82
1.6. <i>Avaliação de perdas por dessecação do EB</i>	83
1.7. <i>Análises Qualitativas e Quantitativas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)</i>	83

1.7.1. Preparo da Curva analítica	83
2. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	83
2.1. <i>Teste de Indução de Crescimento com Fibroblastos in vitro</i>	83
2.2. <i>Atividade Farmacológica In vivo</i>	85
2.2.1. <i>Atividade Anti-ulcerogênica</i>	86
2.2.1.1. <i>Úlcera Induzida por etanol/HCL, para avaliação da estabilidade dos extratos.</i>	86
2.2.1.2. <i>Mecanismo de ação da atividade antiulcerogênica</i>	87
2.2.1.2.1. <i>Atividade sobre a produção de muco gástrico</i>	87
2.2.1.2.2. <i>Atividade sobre a secreção gástrica</i>	88
2.2.2. <i>Atividade Cicatrizante</i>	89
2.2.2.1. <i>Indução da Diabetes</i>	89
2.2.2.2. <i>Procedimento cirúrgico e tratamento</i>	89
2.2.2.3. <i>Análise de Hidroxiprolina</i>	90
2.2.2.4. <i>Estudos Histopatológicos</i>	90
2.3. <i>Avaliação do EB sobre a neoformação vascular</i>	90
<i>Esses estudos foram realizados sob supervisão da Dra. Viviane Ferre.</i>	90
2.3.1. <i>Membrana corioalantóide (MCA)</i>	90
2.3.2. <i>Tegumento dorsal de camundongos</i>	92
2.3.2.1. <i>Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos do tegumento dorsal de camundongos</i>	94
2.3.2.1. <i>Análise histológica do tegumento dorsal de camundongos</i>	94
2.3.2.2. <i>Quantificação microscópica dos vasos sanguíneos do tegumento dorsal de camundongos</i>	95
2.4. <i>Estudo de toxicidade oral em doses repetidas de 28 dias em roedores</i>	95
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	96
RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTO (EB) E BRUTO MICROENCAPSULADO (EBM) DE <i>ARRABIDAEA CHICA</i> E SEUS COMPOSTOS ISOLADOS	100
2. AVALIAÇÃO DO TESTE DE ESTABILIDADE	104
2.1. <i>Análises Físico-Químicas</i>	104
3. <i>2. Análise de EB e EBM por Cromatografia</i>	106
2.3. <i>Análise Farmacológica - Úlcera Gástrica Induzida por Etanol/HCL</i>	111
3. MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA	112
4. TESTE DE TOXICIDADE 28 DIAS	116
4.1. <i>Evolução de Peso Corporal</i>	117
4.2. <i>Parâmetros Hematológicos</i>	118
4.3. <i>Parâmetros Bioquímicos</i>	119
4.3.1. <i>Metabolismo de lipídeos</i>	120
4.3.2. <i>Metabolismo de enzimas hepáticas</i>	120
4.3.3. <i>Indicadores enzimáticos de injúria renal</i>	122
5. ANGIOGÊNESE	123
5.1. <i>Teste para a avaliação da atividade sobre a angiogênese em Membrana Coreo Alantóide (MCA)</i>	123

5.1.1. Contagem macroscópica dos vasos sanguíneos em MCA e análise estatística dos dados.	124
5.2. Avaliação do EB sobre a angiogênese do tegumento do dorso de camundongos.	125
5.2.1. Contagem macroscópica dos vasos sanguíneos no tegumento do dorso de camundongos.	126
5.2.2. Contagem microscópica dos vasos sanguíneos nos cortes histológicos do tegumento do dorso de camundongos.	127
6. ATIVIDADE CICATRIZANTE.	129
6. 1. Teste de Indução de Crescimento de Fibroblastos Dérmicos in vitro.	129
CONCLUSÕES.	141
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	143
ANEXOS.	157

LISTA DE ABREVIATURAS

A. *chica* – *Arabidaea chica*

AH – Ácido hialurônico

ALT- Aminotransferase glutâmico-pirúvica

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST- Aspartate aminotransferase

CCD-Cromatografias em camada delgada

CCK2-Colecistocinina 2

CPQBA - Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DAD - Detector de arranjo de diodos

DAG- Diacilglicerol

DE- Dose efetiva

DMEM – Meio Dulbecco's Modified Eagle Médium

EB- extrato bruto etanólico

EBM- Extrato Bruto Microencapsulado

EGF – Fator de crescimento epitelial

FA- Fosfatase alcalina.

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

GGT- Gama-glutamil transferase

HBG – concentração de hemoglobina

HCT – Hematócrito

HE- Hematoxilina/Eosina

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

IL 1 – Interleucina 1

ILU- Índice de lesão ulcerativa

IP3- Trifosfato de inositol

IR- Receptor de insulina

IR/IRS- Substrato do Receptor de Insulina

Kg – Kilogramas

L-NAME-L-NG-Nitroarginine Methyl Ester

M₃- Receptores muscarínicos

MCA – Membrana corioalantóide

MCA- Membrana coriolantóide

MCH – hemoglobina celular média

MCHC – concentração de hemoglobina celular média

MCV – volume corpuscular médio

MEV – Microscópio eletrônico de varredura

MgCl- Cloreto de magnésio

NaCl- Cloreto de sódio

NEM - N-etilmaleimida

NO- Óxido nítrico principalmente

OMS- Organização Mundial de Saúde

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE₂ e PGI₂ - Prostaglandinas

PI3K/AKT- Serine Treonina Quinase

PLT – contagem total de plaquetas

RBC – contagem total de eritrócitos

Renisus- Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS

SFB – Soro fetal bovino

SHC / ERK- Proteína Quinase com Atividade Mitogênica

STZ- Estreptozotocina

SUS- Sistema Único de Saúde

TCA- Ácido tricloro acético

TGF- α - Fator de crescimento transformante α

TGF- β - Fator de crescimento transformante β

TM- Tricrômio de Masson

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

UR- umidade relativa

UV – Ultra violeta

UV- Ultra violeta

v/v – volume/volume

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

VEGF-Fator de Crescimento Endotelial vascular

WBC - contagem total de leucócitos

Lista de Figuras

Figura 1. Anatomia da Pele.	pg.48
Figura 2: Cortes de pele humana.	pg. 49
Figura 3: Esquema histológico do tecido conjuntivo e tecido epitelial de revestimento.	pg.51
Figura 4: Corte histológico de pele fina humana.	pg.51
Figura 5: Representação de alguns tipos de colágeno presente na membrana basal.	pg.55
Figura 6: Eventos intra e extracelulares envolvidos na formação da fibrila de colágeno.	pg.56
Figura 7. Processo de angiogênese.	pg.60
Figura 8: Efeitos da Insulina no mecanismo celular e molecular na cicatrização.	pg.63
Figura 9: Regiões do estômago e sua estrutura histológica.	pg.64
Figura 10: Folhas de <i>A. chica</i> .	pg.70
Figura 11: Estrutura química das 3-deoxi-antocianidinas isoladas de <i>A.chica</i> .	pg.71
Figura 12: Estrutura química das substâncias isoladas de <i>A.chica</i> .	pg.72
Figura 13: Exemplar de <i>Arrabidaea chica</i> , cultivado no campo experimental do CPQBA/UNICAMP.	pg.77
Figura 14: Embalagem contendo 1kg de planta moída empacotada à vácuo.	pg.78
Figura 15: Processamento de extração de <i>A.chica</i> em planta piloto.	pg.79
Figura 16: Esquema da disposição das amostras na placa de 96 poços.	pg.85
Figura 17: Esquema da metodologia em membrana corioalantóide.	pg.92
Figura 18: Representação da aplicação subcutânea e retirada do tegumento do dorso de camundongos.	pg.93
Figura 19: (A,B) EB em processo de secagem por <i>Spray Dryer</i> (Buchi B-290); EB após finalizado o processo de atomização.	pg.100
Figura 20: Imagem obtida por MEV com aumento de 1500X e 10kv das microcápsulas do EBM.	pg.101
Figura 21: Cromatograma do extrato bruto sem encapsular de <i>A.chica</i> .	pg.102

Figura 22: Espectro de absorvância na faixa de (200 a 600nm) observado para as 3-deoxiantocianidinas presentes no EB (6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-etoxiflavilio(5,88min), 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilio (7,9 min) e carajurina (15,8min.).	pg.102
Figura23: Curva analítica do marcador carajurina.	pg.103
Figura 24: Análise visual de EB e EBM ao término do teste de estabilidade acelerada.	pg.105
Figura 25: Cromatograma por CCD do EB após 90 dias do teste de estabilidade acelerada.	pg.107
Figura 26: Cromatograma por CCD do EBM após 90 dias do teste de estabilidade acelerada.	pg.107
Figura 27: Curva de calibração do 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavinium (m/z 301).	pg.108
Figura 28: Curva de calibração do 6,7trihidoxi-5-metoxiflavinium (m/z 285).	pg.108
Figura 29: Curva de calibração do carajurina (m/z 299).	pg.109
Figura 30: Avaliação do teor de carajiruna nas amostras de EBM do teste de estabilidade acelerada.	pg.110
Figura 31: Dosagem de muco em modelo de úlcera induzida por etanol	pg. 113
Figura 32: Regulação fisiológica e farmacológica da secreção gástrica.	pg.116
Figura 33: Efeito da administração de EB (v.o., 28 dias) sobre a evolução de peso corporal em ratos <i>Wistar</i> adultos fêmeas.	pg.117
Figura 34: Efeito da administração oral repetida (28 dias) do extrato bruto de <i>Arrabidaea chica</i> (EB) sobre a evolução de peso corporal animal em ratos <i>Wistar</i> adultos machos.	pg.118
Figura 35: Fotografias da membrana coriolantóide (MCA) mostrando a atividadeangiogênica das amostras avaliadas.	pg.124
Figura 36: Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos na membrana coriolantóide (MCA).	pg.125

Figura 37: Fotografias do tegumento do dorso de camundongos mostrando a atividade angiogênica das concentrações de <i>A. chica</i> .	pg.126
Figura 38: Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos no tegumento do dorso de camundongos dos grupos controles e dos animais tratados com oEB.	pg. 127
Figura 39: Cortes histológicos do tegumento do dorso de camundongos.	pg.128
Figura 40: Gráfico de crescimento celular de fibroblasto dérmico humano em função da concentração de EB e EBM.	pg.129
Figura 41: Gráfico de crescimento de fibroblastos dérmicos humanos em função da concentração de EB e de carajurina.	pg.130
Figura 42: Análise macroscópica da contração das feridas de ratos diabéticos por estreptozotocina, nos dias 1, 5 e 10.	pg.133
Figura 43: Efeito cicatrizante de EB e EBM após tratamento diário (10 dias) de úlceras cutâneas em animais diabéticos por STZ <i>in vivo</i> .	pg.134
Figura 44: Efeito estimulante sobre a síntese de colágeno do EB e EB <i>in vivo</i> avaliado pela quantidade de hidroxiprolina.	pg.135
Figura 45: Corte Histológico da pele dos ratos tratadas e coradas com HE (200X).	pg.136
Figura 46: Corte Histológico da pele dos ratos tratadas e coradas com TM (400X). Fibras de Colágeno coradas de azul.	pg.137
Figura 47: Efeito da administração oral única de <i>A. chica</i> em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos <i>Wistar</i> diabéticos.	pg.139

Lista de Tabela

Tabela 1: Tipos celulares da epiderme e suas funções.	pg.49
Tabela 2: Tipos celulares da derme e suas funções.	pg.52
Tabela 3: Principais fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial e suas funções.	pg.53
Tabela 4: Tipos de colágeno e suas funções.	pg.54
Tabela 5: Vencedores do Prêmio Nobel de Medicina na área da gastroenterologia.	pg.65
Tabela 6: Condições do processamento de secagem por <i>spray drying</i> do EB.	pg.80
Tabela 7: Proporção de EB incorporado em goma arábica.	pg.81
Tabela 8: Condições do processamento de microencapsulação por <i>spray drying</i> do EB.	pg.81
Tabela 9: Teste de estabilidade.	pg.82
Tabela 10: Avaliação das Lesões Úlcerativas em Estômago.	pg.87
Tabela 11: Avaliação de parâmetros físico-químicos do EB de <i>A.chica</i> após secagem por atomização.	pg.100
Tabela 12: Dados obtidos para confecção da curva analítica carajurina.	pg.103
Tabela 13: Teor de umidade do EBM no teste de estabilidade acelerada.	pg.106
Tabela 14: Valores de pH de EB e EBM no teste de estabilidade acelerada.	pg.106
Tabela 15: Teor relativo das três deoxiantocianidinas nas amostras de EB e EBM [#] no teste de estabilidade acelerada.	pg.109
Tabela 16: Valores de DE ₅₀ (mg/Kg) de EB e EBM do teste de estabilidade acelerada.	pg.111
Tabela 17: Avaliação da atividade antissecretora de EB.	pg.114

Tabela 18: Ação de EB sobre as vias da atividade secretora	pg.115
Tabela 19: Parâmetros hematológicos de ratos <i>Wistar</i> (machos e fêmeas) após 28 dias de tratamento com EB.	pg.119
Tabela 20: Parâmetros bioquímicos referentes ao metabolismo de lipídeos de ratos <i>Wistar</i> (machos e fêmeas) após 28 dias de tratamento com EB.	pg.120
Tabela 21: Parâmetros bioquímicos referentes ao metabolismo hepático de ratos <i>Wistar</i> (machos e fêmeas) após 28 dias de tratamento com EB.	pg.122
Tabela 22: Parâmetros bioquímicos referentes ao metabolismo renal de ratos <i>Wistar</i> (machos e fêmeas) após 28 dias de tratamento com EB.	pg.122
Tabela 23: Quantificação microscópica dos vasos sanguíneos nos cortes histológicos do tegumento do dorso de camundongos.	pg.128

Introdução

Newman e Cragg, em recente revisão, verificaram que entre os anos de 1981 e 2011 aproximadamente 75% das moléculas que revelaram potencial terapêutico eram de origem natural ou produtos de semissíntese de produtos naturais ou ainda moléculas sintéticas com grupos farmacóforos que mimetizam as moléculas naturais ou capazes de competir com produtos naturais pelo sítio de ação. (Newman e Cragg, 2012).

O Brasil, com seu vasto patrimônio genético e sua diversidade cultural, tem a oportunidade para estabelecer um modelo de desenvolvimento próprio e autônomo na área de plantas medicinais e fitoterápicos, que prime pelo uso sustentável da biodiversidade, respeite princípios éticos. Para tanto, é essencial que sejam implementadas medidas relacionadas ao vínculo entre o acesso ao patrimônio genético e o procedimento de pedido de patentes. (Brasil, 2006)

Neste contexto, a pesquisa de novos produtos oriundos da grande biodiversidade brasileira revela-se uma oportunidade impar para o desenvolvimento próprio soberano na área de saúde.

Dentre as patologias que acometem a humanidade, a preocupação com o tratamento de úlceras cutâneas está presente na história da humanidade desde a antiguidade. Partes de plantas e/ou seus extratos foram utilizados por muito tempo nos curativos até serem substituídas por produtos à base de iodo, cloro, enzimas e compostos isolados de plantas (e posteriormente sintetizados) como a alantoína (Ferreira *et al*, 2008).

Mesmo com essas alternativas, é muito comum o uso de extratos de plantas medicinais em vários países, para o tratamento de feridas e queimaduras. Vários estudos farmacológicos empregando plantas medicinais de uso tradicional relatam a cura em diferentes modelos de cicatrização, ressaltando a viabilidade para o desenvolvimento de um fitoterápico para uso em cicatrização e que seja aceito globalmente (Thakur *et al*, 2011).

Além disso, crescem também as investigações de extratos vegetais que auxiliem no processo cicatricial, principalmente de úlceras causadas pela complicação da diabetes e conhecida como pé diabético (Chan *et al*, 2009).

A ampliação das opções terapêuticas ofertadas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), com garantia de acesso às plantas medicinais e fitoterápicas, com segurança, eficácia e qualidade, nos diferentes níveis de complexidade do sistema, é uma importante

estratégia, com vistas à melhoria da atenção à saúde da população e à inclusão social. (Brasil, 2006).

Em Campinas, o tratamento de feridas com pomadas fitoterápicas, produzidas com extratos de plantas, tais como os extratos de calêndula, babosa, hamamelis, camomila, ou com pomadas a base das enzimas papaverina e/ou bromelina, se tornou prioritário, principalmente em pacientes com dificuldades no processo cicatrizante, tais como doenças metabólicas, que estão acamados e/ou cadeirantes (Pimentel, 2001). Fundada em setembro de 2004, a Botica da Família, atualmente, manipula mais de 7 mil fórmulas por mês, em média, para atender 74 unidades de saúde com medicamentos fitoterápicos. A farmácia trabalha com 13 plantas que compõem 31 formulações farmacêuticas que são dispensadas a mais de 10 mil pessoas que se utilizam da fitoterapia como opção terapêutica no Sistema Único de Saúde de Campinas (Ribeiro, 2012).

Em fevereiro de 2009 foi publicado a Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (Rennisus). A Rennisus é constituída por plantas nativas ou exóticas adaptadas, amplamente utilizadas pela população brasileira e que já apresentam alguma evidência para indicação na atenção básica de saúde. Ainda assim, muitas dessas espécies necessitam de estudos complementares para confirmação de eficácia e segurança. (Brasil, 2009)

Dentre as espécies incluídas nesta lista, encontra-se a espécie vegetal *Arrabiadaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot que é encontrada em todo território nacional. Várias populações indígenas que vivem na floresta Amzônica utilizam o pigmento vermelho extraído das folhas de *A. chica* para pintar a pele. Uma ampla revisão da bibliografia indicou que este gênero é fonte de antocianinas, flavonas e flavonoides. (Harborne, 1967; Takemura 1995; Zorn, *et al*, 2001; Devia, *et al*, 2002; Alcerito, 2002; Pauletti *et al*, 2003; Amaral *et al* 2012).

Vários efeitos biológicos e farmacológicos têm sido relatados para diferentes extratos e frações preparados a partir das folhas de *A. chica*, entre os quais encontram-se relatos de efeitos hepatoprotetor (extrato hidroetanólico) (Höfling *et al.*,2010); antimicrobianos (extrato diclorometano) (Oliveira *et al.*, 2009).; cicatrização de feridas de pele e tendão (extrato etanólico)(Jorge *et al.*,2008; Aro *et al.*,2012) e anti-inflamatórios (extrato aquoso) (Medeiros *et al.*,2011) e antioxidante (fração cloroformica) (Dos Santos *et al.*,2013).

Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo, no CPQBA-UNICAMP, comprovaram que o extrato bruto de *A. chica* induz a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno *in vitro*, além de apresentar moderada capacidade antioxidante. Modelos de cicatrização *in vivo*, utilizando Ratos Wistar machos, demonstrou que o extrato bruto de *A. chica* foi capaz de reduzir em 96% a área da ferida e as análises histológicas, deste grupo, demonstraram uma maior quantidade de colágeno depositado (Jorge *et al.*,2008). Além disso, quando incorporado à base semi-sólidas observou-se a manutenção da atividade cicatrizante (estímulo à proliferação de fibroblastos e à síntese de colágeno) do extrato bruto de *A. chica* em modelos de cicatrização *in vivo* (Sousa, 2013). Mais ainda, os estudos de mecanismo de citoproteção *in vivo*, utilizando Ratos Wistar, em modelos úlcera gástrica induzida por etanol comprovaram que esse extrato tem atividade antiulcerogênica (Jorge, 2008).

Por outro lado, a pesquisa e aplicação de polifenóis têm despertado grande interesse nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas devido aos seus potenciais benefícios para a saúde. No entanto, a eficácia dos polifenóis depende da preservação da estabilidade, bioatividade e biodisponibilidade das substâncias ativas. Uma das estratégias para atenuar essas deficiências tem sido a utilização de processos de microencapsulamento dos extratos e/ou frações ricos em polifenóis (Fang e Bhandari, 2010).

Em 2010, a ANVISA publicou a RDC Nº14/2010 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápico que difere da resolução anterior principalmente no controle de qualidade de cada etapa da produção desses medicamentos. Assim, a partir desta RDC, o registro só é permitido desde que seja apresentada comprovação de segurança e eficácia através de ensaios não clínicos e clínicos para a forma farmacêutica específica que se pretende registrar (Brasil, 2010).

Considerando o interesse para o SUS no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos à base de *Arrabidaea chica* (Brasil 2009), e tendo como base os resultados anteriores obtidos para esta espécie (Jorge *et al.*, 2008), a presente tese teve por objetivo a continuação dos estudos sobre *Arrabidaea chica* Verlot, visando a avaliação do extrato bruto etanólico (EB) em modelos de cicatrização, dérmica e gástrica, em ratos diabéticos, assim como o estudo da influência da técnica de microencapsulação na preservação da atividade cicatrizante, evidenciada através de estudos em cultura de fibroblastos e modelos *in vivo* de

úlceras gástricas. Finalmente, também foi avaliada a toxicidade oral em doses repetidas, durante 28 dias, do extrato EB em ratos machos e fêmeas.

Objetivos

1. Objetivo

Avaliar a capacidade cicatrizante dos extratos em modelo experimental de úlcera dérmica em ratos diabéticos.

2. Objetivos específicos

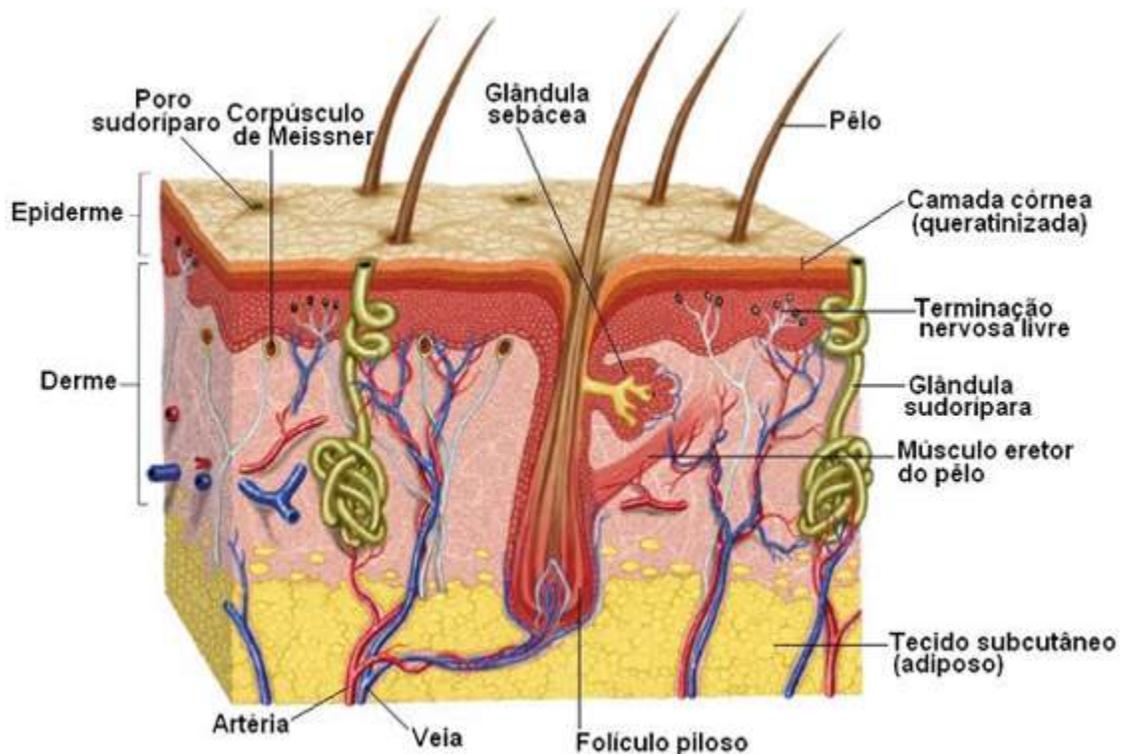
- ❖ Microencapsular o extrato bruto de *A. chica*;
- ❖ Avaliar a estabilidade química e farmacológica do produto de *A. chica* microencapsulado;
- ❖ Avaliar a capacidade antiulcerogênica dos extratos em animais diabéticos e normoglicêmicos;
- ❖ Avaliar a toxicidade oral em doses repetidas (28 dias) do extrato bruto em ratos machos e fêmeas.

Revisão
Bibliográfica

1. Pele

A pele é o maior órgão do corpo, correspondendo a 16 % do seu peso, sendo responsável por inúmeras funções vitais, tais como, proteção, termorregulação, absorção percutânea, bem como atividade secretora e sensorial. As secreções sebáceas ácidas e a estrutura de superfície da pele são agressivas para muitos agentes patógenos (Mabona e Van Vuuren, 2013). A pele é constituída por duas camadas denominadas epiderme e derme mantendo-se unida aos órgãos subjacentes através da hipoderme, que não faz parte da pele (Figura 1) (Junqueira e Carneiro, 2004).

Figura 1. Anatomia da Pele.



(Fonte: Sistema tegumentar, 2011, disponível em www.auladeanatomia.com)

1.1. Epiderme

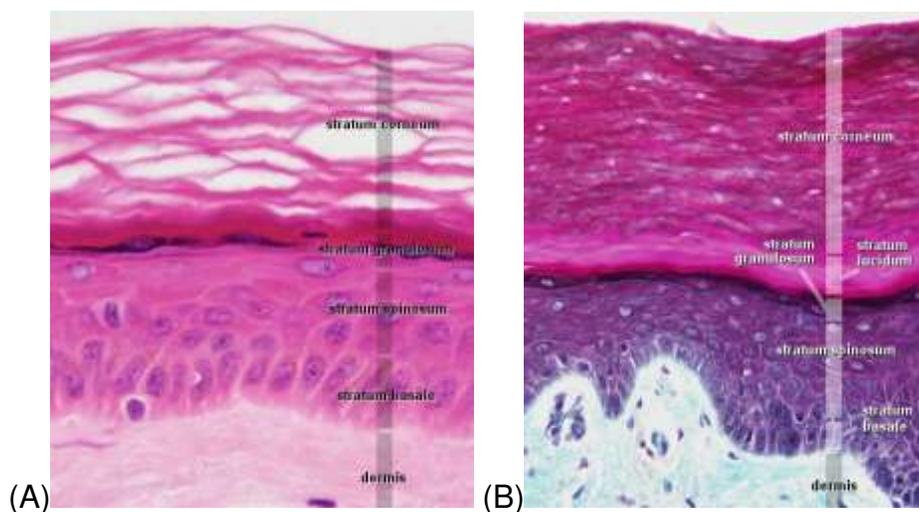
A epiderme é a camada mais externa constituída por tecido epitelial tendo como principais tipos celulares os melanócitos, as células de Langerhans, célula de Merkel e os queratinócitos, cujas funções são apresentadas na Tabela 2. Os queratinócitos formam a maior população e estão distribuídos em quatro camadas da pele fina (Figura 2 A) e em cinco camadas na pele espessa (Figura 2 B), os demais tipos celulares estão espalhados entre os queratinócitos em locais específicos (Junqueira e Carneiro, 2004).

Tabela 1: Tipos celulares da epiderme e suas funções.

Tipos Celulares	Funções
Queratinócito	Barreira mecânica, produção de citocinas e sinalização celular.
Melanócito	Síntese de pigmentos, proteção contra as ações nocivas dos raios UV.
Células de Langerhans	Apresentação de antígenos.
Células de Merkel	Síntese de catecolaminas e sensibilidade tátil.

(Fonte: adaptado de Junqueira e Carneiro, 2004).

Figura 2: Cortes de pele humana.



Legenda: Microscopia de Luz. Em (A) podem ser notadas as camadas histológicas da pele fina (coloração HE) Aumento 400x. Em (B) podem ser notadas as camadas histológicas de pele espessa, evidenciando em azul claro as fibras colágenas. (coloração tricrômio) Aumento de 400x (Fonte: Slomianka, 2009).

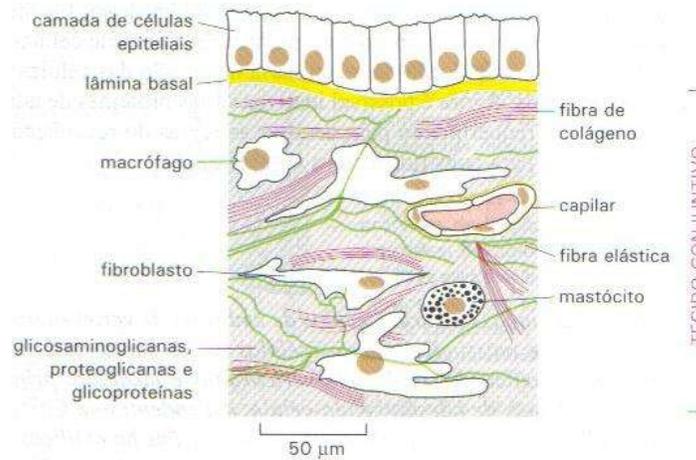
1.2. Junção Dermoepidérmica

A junção dermoepidérmica, é formada por uma delicada rede de delgadas fibrilas, denominadas lamina basais constituídas por colágeno do tipo IV, glicoproteínas e proteoglicanas. As lâminas basais participam do processo de reparo, proliferação e migração celular, mantêm a polaridade e diferenciação das camadas celulares da pele e servem como barreira às metastases tumorais (Oliveira *et al*, 2002), serve como suporte mecânico à epiderme, como estrutura de adesão dermoepidérmica, ligam-se a fatores de crescimento, influem no metabolismo celular e organizam as proteínas nas membranas plasmáticas de células adjacentes. (Junqueira e Carneiro, 2004)

1.3. Derme

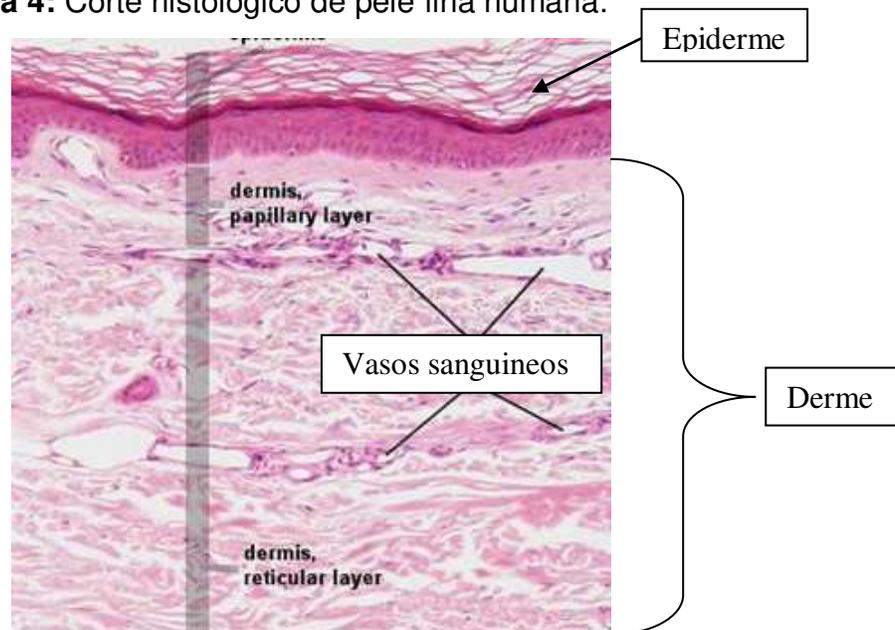
A derme é constituída por tecido conjuntivo denso, flexível e elástico, que, tem como funções nutrir e sustentar a epiderme devido à presença de vasos sanguíneos, terminações nervosas e vasos linfáticos. Apresenta apêndices dérmicos como unhas, cabelos e glândulas. (Junqueira e Carneiro, 2004). O tecido conjuntivo é composto por diversos tipos celulares residentes como os fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos e células adiposas (Figuras 3 e 4). Os leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e basófilos) são constituintes normais do tecido conjuntivo, vindos do sangue por migração através das paredes de capilares e vênulas (Alberts *et al*, 2010). O processo de migração aumenta com invasão de microrganismos, uma vez que os leucócitos são células de defesa. As funções de cada célula estão demonstradas na tabela 2.

Figura 3: Esquema histológico do tecido conjuntivo e tecido epitelial de revestimento.



(Fonte: Alberts *et al*, 2010)

Figura 4: Corte histológico de pele fina humana.



Legenda: Microscopia de Luz, podem ser notados as camadas histológicas da pele fina, evidenciando na derme os vasos sanguíneos (coloração HE) Aumento 400x.(Fonte: Slomianka, 2009).

Tabela 2: Tipos celulares da derme e suas funções.

Tipos Celulares	Atividade representativa	Função representativa
Fibroblastos	Produção de proteínas fibrosas e substância fundamental estrutural	
Macrófagos	Secreção de citocinas e outras moléculas para outras células	Defesa, fagocitose e apresentação de antígenos.
Mastócitos e Basófilos	Liberação de moléculas farmacologicamente ativas	Defesa (participação em reações alérgicas)
Plasmócito	Produção de anticorpos	Imunológica
Célula Adiposa	Estocagem de gordura neutra	Reserva de energia produção de calor
Neutrófilo	Fagocitose de antígenos	Defesa
Eosinófilo	Participação em reações alérgicas	Defesa Imunológica
Linfócitos	Produção de células imunocompetentes	Defesa Imunológica

(Fonte: adaptado de Junqueira e Carneiro, 2004)

A matriz extracelular da derme é composta por líquido tecidual, substância fundamental e fibras. A substância fundamental é formada por glicosaminoglicanas, proteinoglicanas, glicoproteínas multiadesivas que se ligam a proteínas receptores (integrinas) nas superfícies das células, fornecendo força tênsil e rigidez da matriz. As fibras do tecido conjuntivo são elásticas, reticulares e colágenas. (Junqueira e Carneiro e Carneiro, 2004)

1.3.1 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 (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 TNF- α , TGF- α , TGF- β , PDGF, VEGF e IL-1 (Tabela 3) (Campos *et al*, 2007).

Tabela 3: Principais fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial e suas funções.

Fator de Crescimento	Origem	Função
TNF- α	Monócitos e linfócitos	Proliferação de fibroblastos. Quimiotaxia para neutrófilos e macrófagos
TGF- α	Matriz extracelular da ferida cirúrgica	Proliferação celular Estimula a epitelização
TGF- β	Plaquetas, matriz extracelular da ferida cirúrgica	Mitogênicos para fibroblastos Formação de tecido de granulação
PDGF	Plaquetas	Quimiotaxia para neutrófilos, monócitos e fibroblastos. Proliferação de fibroblastos e a produção de matriz extracelular
VEGF	Queratinócitos e macrófagos	Angiogênese e a proliferação de células endoteliais
IL-1	Mononucleares	Proliferação de fibroblastos

(Fonte: Campos *et al*, 2007)

1.3.2 Colágeno

Os colágenos pertencem a 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, sendo o principal componente da pele e dos ossos responsável por 25% da massa proteica 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 4). Os colágenos mais frequentes na derme são os do tipo I, II, III, IV, V, VI, VII, XII e XIII (Figura 5). (Alberts *et al*, 2004; Pimentel, 2001)

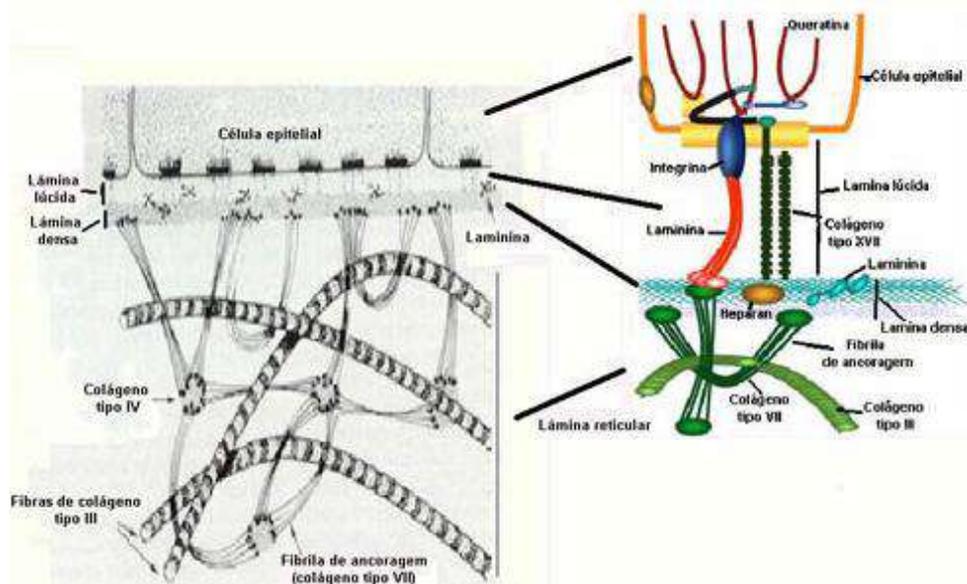
Tabela 4: Tipos de colágeno e suas funções.

	TIPO	FÓRMULA MOLECULAR	FORMA POLIMERICAS	DISTRIBUIÇÃO TISSUAL
Formação de fibras (fibras)	I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	Fibras	couro, pele, tendões, ligamentos, cartilagem, órgãos internos (coração), tipo de colágeno do corpo
	II	$[\alpha 1(II)]_2$	Fibras	cartilagem tipo intersticial, notocórdia, tumor vitreo do olho
	III	$[\alpha 1(III)]_2$	Fibras	pele, vasos sanguíneos, órgãos internos
	V	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ e $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	Fibras (tipo I)	mesmo que tipo I
	XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)$	esferas (tipo II)	mesmo que tipo II
Associadas a fibras	IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$ com fibras tipo I	esferas (tipo II) com fibras tipo I	cartilagem
	XII	$[\alpha 1(XII)]_2$ com fibras tipo I	esferas (tipo II)	tendões, ligamentos, cartilagem
Reguladores de rede	IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$	esferas (tipo I)	fibras base
	VII	$[\alpha 1(VII)]_2$	esferas (tipo II)	esqueleto do tecido conjuntivo extracelular
Epitelmobrânica	XVII	$[\alpha 1(XVII)]_2$	esferas (tipo II)	epitelmobrânica
Osso	XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_2$	esferas (tipo II)	fibras base do tecido dos vasos sanguíneos

Observe que os tipos I, IV e XI são compostos de 2 ou 3 tipos de cadeias, enquanto os tipos II, III, V, VII, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII e XIX são compostos apenas por um tipo de cadeia. Apesar de existirem 28 tipos de colágenos, mais de 15 tipos de colágenos e 28 tipos de outros colágenos derivados são importantes.

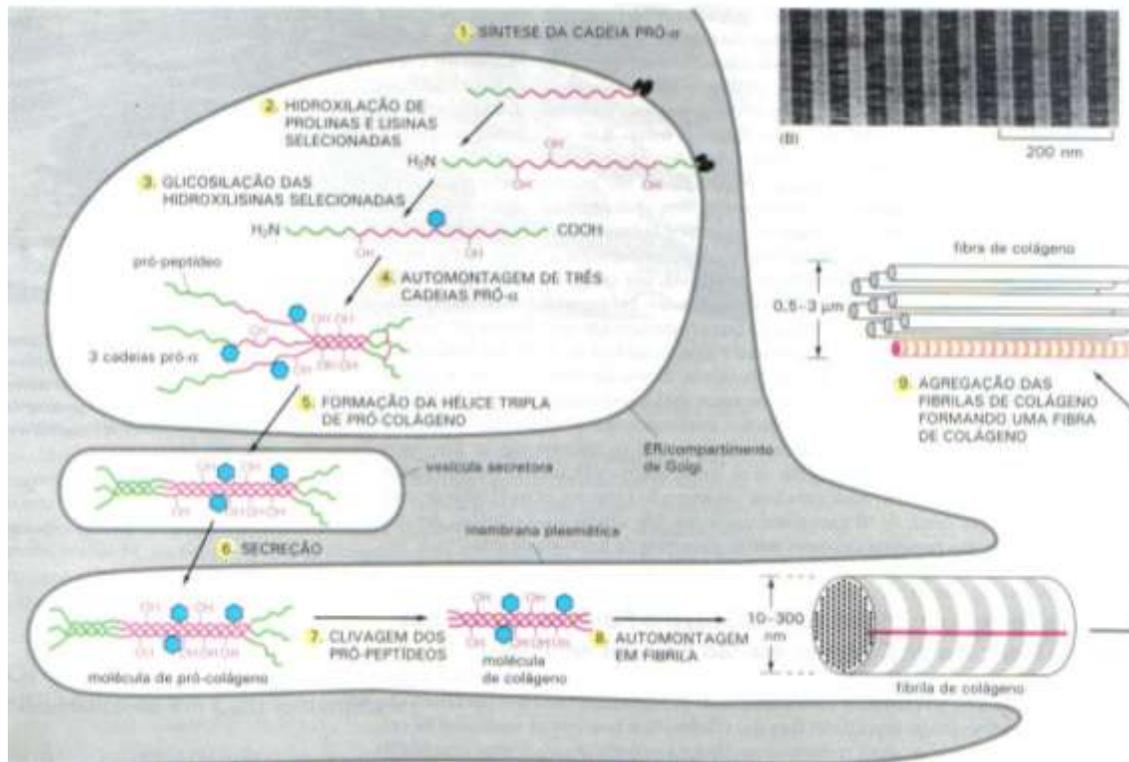
(Fonte: Pimentel, 2001)

As moléculas típicas de colágeno (Figura 5) são constituídas por três cadeias polipeptídicas α , arranjadas em fita tripla helicoidal resultando em uma estrutura longa e rígida. São moléculas glicosiladas, sendo a hidroxilação da prolina e da lisina essenciais para sua formação e desempenho de suas funções (Oliveira Junior *et al*, 2009).

Figura 5: Representação de alguns tipos de colágeno presente na membrana basal.

(Fonte: Oliveira Junior *et al*,2009)

A hidroxilação da prolina serve para a estabilidade da estrutura helicoidal e a da lisina para que ocorra a glicosilação, como parte 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 (Pimentel, 2001). Estas hidroxilações dependem da presença de O_2 , α -cetoglutarato e de cofatores, como ácido ascórbico e íon ferroso. A Figura 6 resume vários passos na síntese de colágeno (Alberts *et al*, 2010).

Figura 6: Eventos intra e extracelulares envolvidos na formação da fibrila de colágeno.

(Fonte: Alberts *et al*, 2010)

A deficiência de ácido ascórbico provoca diminuição da quantidade de ligações cruzadas intra e intermoleculares nas fibrilas de colágeno enfraquecendo os vasos sanguíneos, provocando hemorragias, fragilidade na inserção de dentes e cicatriz de baixa qualidade (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*, 2010). 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, aumentam a expressão da cadeia pro-alfa 1(I), da pró-alfa 1(III) e do procolágeno em cultura de fibroblastos da derme. (Balbino *et al*, 2005).

O colágeno tipo I forma fibras espessas, mecanicamente estáveis que são responsáveis pela resistência do tecido às forças de tensão. Essas fibras representam 80 a

90% do colágeno da derme. Já o colágeno tipo II forma apenas fibrilas, estruturas que não são visíveis à coloração por hematoxilina-eosina (HE). Essas fibrilas estão presentes logo abaixo da membrana basal (ou lâmina basal), aparentemente participando da fixação da epiderme à derme. O tipo III corresponde entre 8 a 12% do colágeno dérmico, concentrando-se na região papilar da derme e em contato com estruturas, tais como os vasos sanguíneos (Junqueira e Carneiro 2004; Gartner & Hiatt, 2007; Sampaio & Rivitti, 2007;). Esse tipo de colágeno forma fibras extremamente finas, também denominadas de fibras reticulares e que não são visíveis à coloração HE. Devido ao seu diâmetro reduzido e à disposição frouxa, essas fibras criam uma rede flexível em órgãos que são sujeitos a mudanças fisiológicas de forma ou volume, como as artérias, baço, útero e camadas musculares do intestino (Junqueira e Carneiro, 2004).

O colágeno tipo IV está presente nas membranas basais de todos os tecidos. Na pele, participa da estrutura da lâmina densa. O colágeno tipo V está presente na lâmina densa, em distribuição paralela ao colágeno tipo IV. Também está presente na pele, ao nível de fibras colágenas intersticiais e nas membranas basais dos vasos cutâneos (Junqueira e Carneiro, 2004).

Colágeno tipo VI é, também, abundante na pele, sob a forma de microfibrilas, enquanto o tipo VII é o maior componente das fibrilas de ancoragem, que se estendem da membrana basal à derme papilar. Os colágenos XII e XIII existem em pequenas quantidades na pele e suas funções não são conhecidas (Sampaio & Rivitti, 2007).

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. 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 (Balbino *et al* 2005).

2. Cicatrização

Cicatrização de feridas é um processo biológico extremamente dinâmico e interativo, que envolve interações complexas de matriz extra celular (MEC), moléculas extracelulares, de mediadores solúveis, várias células residentes (fibroblastos e queratinócitos) e subtipos de leucócitos infiltrantes que, em conjunto, atuam para restabelecer a integridade do tecido danificado e substituir os perdidos. As três fases que estão envolvidas na cicatrização de feridas são divididas em: (I) inflamatória, (II) fibroblástica e angiogênica e (III) remodelamento (Campos *et al*, 2007). Este processo é lento e raramente acompanhado por uma recuperação estrutural e funcional completa de funções da pele, o que tem repercussões na qualidade de vida de milhões de pessoas em todo o mundo. A pele geralmente precisa ser coberta por um curativo imediatamente após ter sido danificada de forma a melhorar as probabilidades de sobrevivência e minimizar a perda das suas funções. A aplicação de substitutos de pele tem como objetivos a inibição do sangramento, a prevenção de perda de proteína, prevenção de distúrbios eletrolíticos, bem como para melhorar a aparência estética do local da ferida. Uma compressa para feridas deve ser biocompatível e biodegradável, evitar a desidratação e possuir boas propriedades mecânicas para permitir o crescimento celular. Além disso, também deve ser porosa para permitir a difusão de nutrientes e resíduos. Os curativos modernos são classificados de acordo com os materiais utilizados na sua produção como os hidrocolóides, alginatos e hidrogéis. (Ferreira *et al*, 2008)

2.1. Fase Inflamatória

Após o trauma, são liberados mediadores celulares, que estimulam liberação de substâncias, que desenvolvem o fenômeno inflamatório (histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e tromboxanos, 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 *et al*, 2007).

As células de defesa mais abundantes no sangue são os neutrófilos que migram para formação de uma barreira protetora contra invasão de micro-organismos e desbridamento do tecido necrosado, liberando proteases e espécies reativas de oxigênio (ROS). Um processo inflamatório exacerbado leva a uma liberação exagerada de ROS que prolonga a fase inflamatória, dificultando o processo cicatricial (Mensah *et al*, 2001 e 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 cicatrizante da ferida, já que ativa a proliferação de fibroblastos (Balbino *et al*, 2005).

2.2. Fase Fibroblástica e Angiogênese

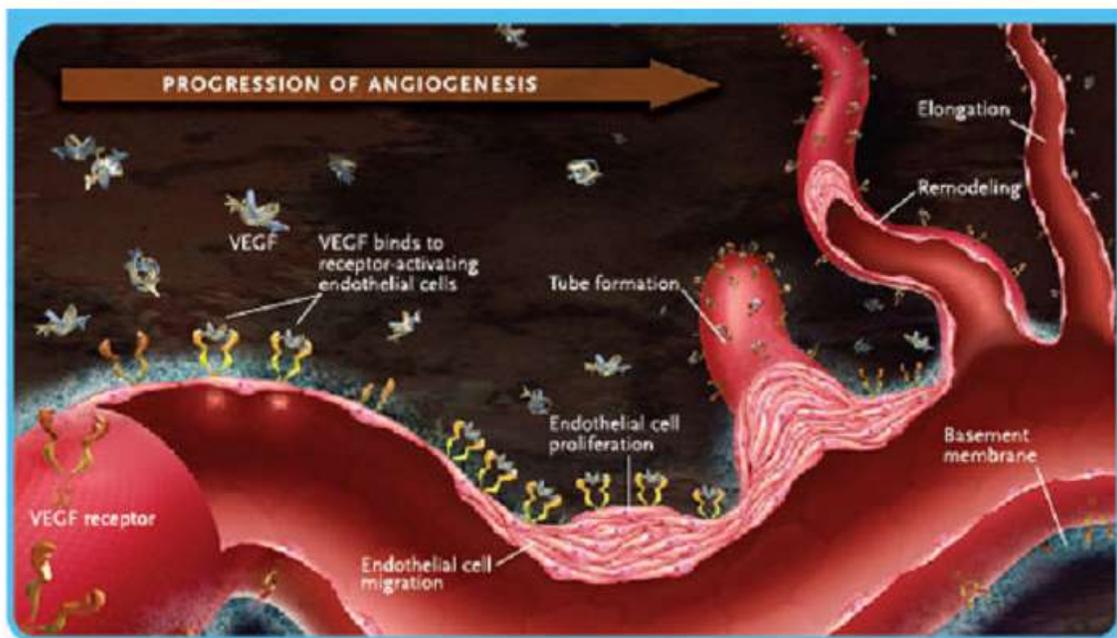
A ativação de fibroblastos é intensificada com a liberação de mediadores químicos pelos macrófagos. Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação juntamente com as células endoteliais fazendo a reparação do tecido conjuntivo. (Balbino *et al*, 2005).

A fibroplasia, que se inicia juntamente com a neovascularização, é a formação do tecido de granulação por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados 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 com a formação de retículo endoplasmático rugoso abundante, para síntese proteica e transformação final em miofibroblastos que auxiliam na contração da lesão. No final do processo, 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 (Alberts *et al*, 2004; Pimentel, 2001)

2.2.1. Angiogênese

Vasos sanguíneos surgiram ao longo da evolução para carregar oxigênio e nutrientes para os diversos órgãos e tecidos do corpo. A formação de vasos sanguíneos é um processo complexo que requer uma harmonia entre numerosos sinais estimulatórios e inibitórios, como integrinas, angiopoietinas, quimiocinas, moléculas juncionais, sensores de oxigênio, inibidores endógenos e muitos outros. Durante a fase de angiogênese, o plexo vascular expande-se progressivamente por meio do brotamento de vasos e remodelagem em uma cadeia vascular fortemente organizada e estereotipada de grandes vasos ramificados em outros menores (Figura 7) (Carmeliet, 2005).

Figura 7. Processo de angiogênese.



Legenda: Expansão do plexo com proliferação e migração de células, brotamento de vasos sanguíneos e remodelagem. (Fonte: disponível em www.lucentins.com).

Após nascimento, o processo angiogênico só ocorre em eventos específicos, como no desenvolvimento do corpo lúteo, no endométrio uterino da fêmea, preparando-a para a

reprodução, no desenvolvimento da placenta durante a gravidez, no processo cicatrizante e na regeneração óssea (Cai *et al*, 2005).

2.3. Fase de Remodelamento

A fase final do processo cicatrizante corresponde à 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, estimulando a deposição de colágeno para proporcionar o surgimento das 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 a fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Repetições sucessivas da 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 exercidas sobre o tecido durante a atividade normal. Este processo ocorre lentamente, levando meses ou anos, sendo que uma cicatriz madura tem 70% da resistência da pele normal (Balbino *et al*, 2005).

3. Diabetes X Cicatrização

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define o *Diabetes mellitus* como uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou incapacidade da insulina exercer adequadamente suas ações, caracterizada pela hipoglicemia crônica e alterações no metabolismo dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas. Os sintomas característicos são: polidipsia, poliúria, borramento da visão e perda de peso (Miranzzi *et al*, 2008).

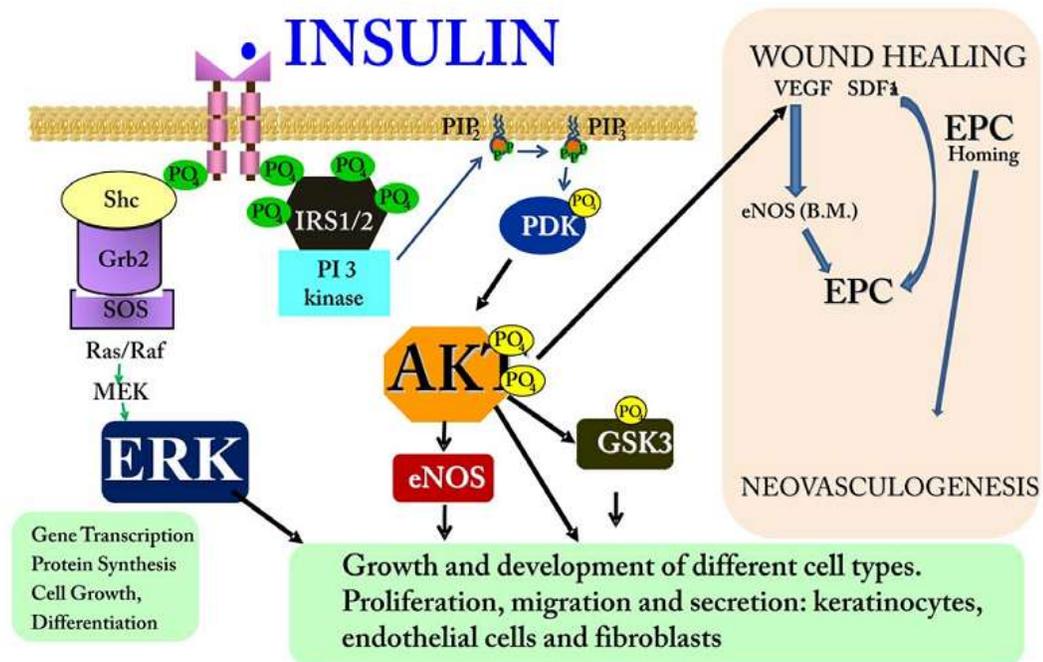
A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido e é essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Esse hormônio é secretado pelas células das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de

glicose e aminoácidos após as refeições. A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, assim como aumenta a síntese e inibe a degradação proteica (Cavalheira *et al*, 2002).

Em patologias como a diabetes, o aparecimento de neuropatia diabética pode levar a ocorrência de ulcerações nos pés (pé diabético) em consequência da disfunção endotelial que impede uma ação eficaz dos mediadores da inflamação. (Kakizawa *et al*, 2004).

Aproximadamente 15% de todos os pacientes com diabetes, em algum momento, têm feridas que não cicatrizam apesar do tratamento com insulina e dieta cuidadosamente controladas, sendo a principal causa de amputação de membros inferiores. É bem conhecido que os mecanismos celulares e moleculares que resultam na cicatrização de feridas envolvem a adesão celular, a migração, proliferação diferenciação e apoptose. Anormalidades como a diminuição da produção do fator de crescimento,, da resposta angiogênica, da função dos macrófagos, diminuição da síntese de colágeno, alterações da barreira epidérmica, e da proliferação e migração de fibroblastos e queratinócitos contribuem para a não cura da ferida, (Lima *et al*, 2012).

Falta de insulina ou ação da insulina absoluta ou relativa contribui para problemas de cicatrização das feridas no diabetes. Alguns estudos demonstraram que o uso de insulina tópica, acelera a cicatrização de feridas na pele de ratos diabéticos e seres humanos. Sabe-se que a insulina estimula o crescimento e desenvolvimento de diferentes tipos de células, afeta a proliferação, migração e secreção realizadas pelos queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos (Fígura 8) (Lima *et al*, 2012). Estudos recentes demonstraram que uso tópico de insulina, em feridas, aumentou a expressão de VEGF, demonstrando uma inter-relação da via de sinalização da insulina e os fatores de crescimento (Lima e Araujo, 2013).

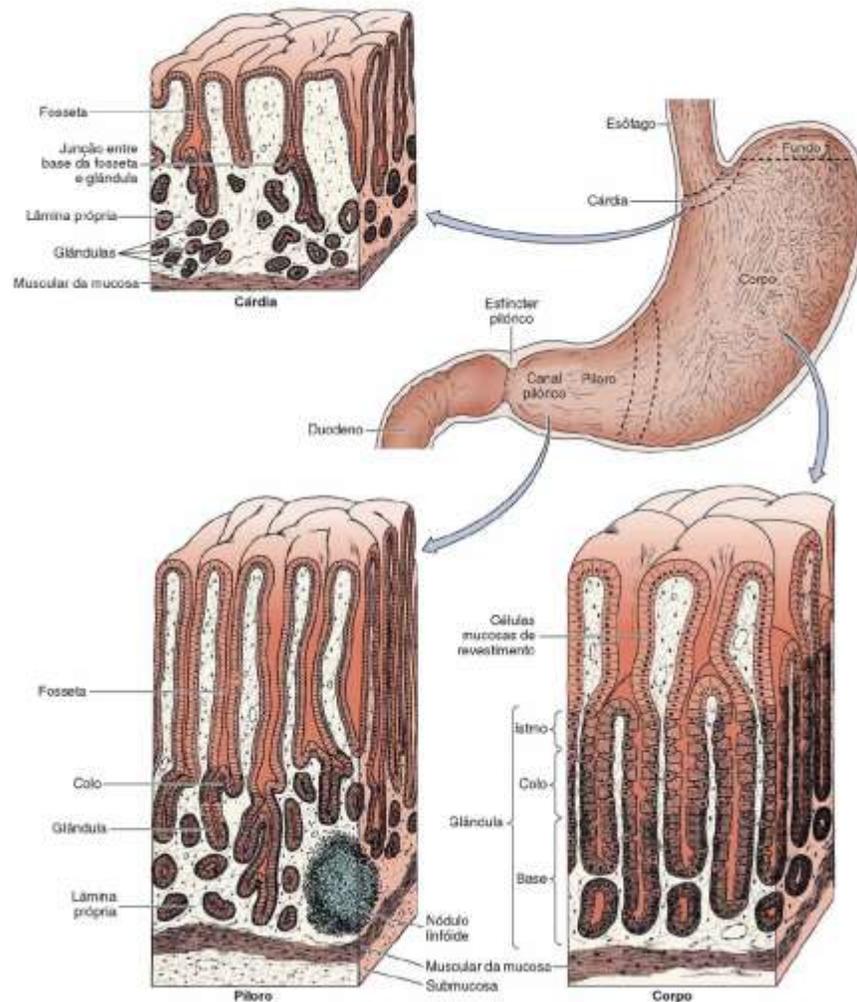
Figura 8: Efeitos da Insulina no mecanismo celular e molecular na cicatrização.

Legenda: a insulina sinaliza a ativação de receptores de proteínas envolvidas no processo cicatricial como receptor de insulina (IR) / SHC / ERK (Proteína Quinase com Atividade Mitogênica) e IR/IRS (Substrato do Receptor de Insulina) /PI3K/AKT (Serine Treonina Quinase). No lado superior direito, a ativação da AKT aumenta o Fator de Crescimento Endotelial vascular (VEGF) por meio de mecanismos pós-transcricionais em queratinócitos. (Fonte: Lima *et al*, 2012).

4. Úlcera Gástrica

O estômago é o órgão que possui o ambiente próprio principalmente pela quantidade elevada de ácido clorídrico, que mantém o pH entre 0,9 e 2,0. Essa acidez, além de participar da digestão, desempenha papel de extrema importância impedindo a entrada de muitos micro-organismos 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).

Úlceras pépticas são lesões do epitélio gastrointestinal que atingem a muscular da mucosa (Figura 9), são classificadas de acordo com sua localização em gástricas ou duodenais, sendo histologicamente semelhantes (Guyton, 2006).

Figura 9: Regiões do estômago e sua estrutura histológica.

(Fonte: Curi e Procopio, 2009).

Mesmo com a marcada redução em sua incidência nas últimas décadas, a doença ulcerosa péptica ainda permanece como uma das doenças com maior prevalência em todo mundo, sendo que algumas de suas complicações, como sangramento e perfuração, ainda são causa importante de morbimortalidade. O tratamento cirúrgico, mesmo substituído quase na sua totalidade pelas terapêuticas clínicas, ainda é empregado em número não desprezível de pacientes. Contudo, levantamentos recentes confirmam a percepção de que existe um despreparo na formação da nova geração de cirurgiões, a qual realiza em média menos de

um procedimento para o tratamento da úlcera péptica durante a residência médica nos Estados Unidos. Apesar de ser uma entidade clínica reconhecida desde a antiguidade, somente durante as últimas décadas do século passado ocorreram avanços que modificaram profundamente a compreensão e o melhor entendimento da doença e possibilitaram seu tratamento de uma maneira adequada. Após a elucidação dos efeitos do ácido clorídrico no estômago humano, a importância de seu controle foi mais estudada e os métodos de tratamento foram baseados para diminuir a exposição da mucosa gástrica ao ácido. Essa crença era validada pela elevada taxa de cura da doença após o tratamento cirúrgico e pela eficácia terapêutica com o uso de antiácidos isolados, bloqueadores H-2 e bloqueadores da bomba de prótons. A identificação e isolamento do *Helicobacter pylori* (HP) proporcionou um enorme desenvolvimento no conhecimento acerca da úlcera péptica. A infecção gástrica pelo HP é hoje responsável por mais de 95% dos casos de úlcera duodenal e 80% dos portadores de úlcera gástrica. O uso de anti-inflamatórios constitui a segunda causa, especialmente na população mais idosa e, mais raramente, outras etiologias podem estar associadas como gastrinoma (Síndrome de Zollinger-Ellisson) e forma duodenal da doença de Crohn (Federação Brasileira de Gastrenterologia, 2003; Motilva *et al*, 2005; Pajares & Gisbert, 2006;.Toneto *et al*, 2011).

A relevância do estudo desta doença pode ser representada pelos homenageados com o prêmio Nobel por pesquisas na área (Tabela 5).

Tabela 5: Vencedores do Prêmio Nobel de Medicina na área da gastroenterologia.

Ano	Trabalho
1904 – Ivan Pavlov	Contribuição para a compreensão da fisiologia da digestão.
1988 – Sir James Whyte Black	Identificação da presença de receptores da histamina nas células parietais e o desenvolvimento de substância bloqueadora desses receptores, inibindo a secreção ácida.
2005 – Barry Marshall e J. Robin Warren	Descoberta do <i>Helicobacter pylori</i> e seu papel na gastrite e úlcera péptica.

(Fonte: Toneto *et al*, 2011).

4.1. 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 consequente 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 (Goodman & Gilman, 2012).

4.2. Mediadores da Defesa Gástrica

Dentre os mediadores endógenos relacionados à defesa gástrica destacam-se as prostaglandinas (principalmente PGE_2 e PGI_2), o óxido nítrico, os neuropeptídeos (CGRP) e as taquicininas (substância P, neurocinina A-NKA). As prostaglandinas são eicosanoides sintetizados a partir do ácido araquidônico pela ação das cicloxigenases. 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 induzível (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. O NO participa nos processos fisiológicos desse órgão, na secreção de muco e bicarbonato, regulação do fluxo sanguíneo, modulação do tônus muscular e regulação da secreção ácida gástrica, porém altas concentrações de NO produzidas pela ação da NO sintase induzível são lesivas à mucosa gástrica. (Wallace, 2006).

No sistema digestivo a atuação de hormônios e neurotransmissores que atuam também em outras funções no organismo sendo que 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 (Carvalho, 2008).

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.

5. Fitoterápicos

5.1. Processo de secagem e microencapsulação por *Spray Dryer* de extratos brutos de plantas

A crescente utilização dos fitoterápicos despertou a preocupação quanto a sua eficácia, pois o processamento inadequado das plantas pode ocasionar perda de moléculas, implicando perda da atividade farmacológica. A vida útil do extrato também é limitada pela exposição ao oxigênio, umidade e luminosidade. Uma alternativa útil no prolongamento do tempo de estocagem de produtos alimentícios e farmacêuticos sem perdas de sua atividade é a microencapsulação por atomização que, apesar do aquecimento, não destrói seus componentes em razão do curto tempo de exposição ao calor (Rodrigues, 2004).

No Brasil há registrados de 512 medicamentos fitoterápicos, sendo mais de 70% formas farmacêuticas sólidas. Estes produtos são constituídos na maior parte por extratos secos, tendo como vantagens a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, facilitando a padronização, aumentando a concentração de compostos ativos propiciando maior quantidade de formas farmacêuticas sólidas. Entre os procedimentos de secagem, destaca-se a técnica de secagem por aspersão (*spray drying*) (Oliveira e Petrovick, 2010).

O *Spray drying* dentro do avanço das tecnologias de secagem, é responsável pelo crescimento fitofarmacêutico, pois facilita a manipulação e doseamento dos extratos secos. Além disso, facilita a microencapsulação de produtos, que dependendo do material polimérico utilizado favorece a liberação controlada de um fármaco, aumentando sua eficiência. Essa propriedade foi verificada por Haindong *et al.*(2012) no extrato

microencapsulado de folhas de *Ginkgo biloba*, utilizando como material de parede maltodextrina /goma arábica e proteínas de soja onde observou o aumento nas propriedades farmacológicas do produto.

O encapsulamento por atomização é um método econômico para preservação dos pigmentos antociânicos. O material de revestimento mais empregado para o encapsulamento para essa classe de compostos, para uso em alimentos são as gomas (Cavalcanti *et al.* 2011).

A goma-arábica é uma substância de cor amarelado a cinza claro, com boa solubilidade em água (aproximadamente 500 g/l) A composição química da goma-arábica é um polissacarídeo com quantidades variáveis de D-galactose, L-arabinose, L-ramnose e alguns ácidos derivados, como o ácido D-glucorónico e o 4-O-metil-D-ácido glucorónico e múltiplas glicoproteínas (Robbers *et al.* 1997).

As gomas mais utilizadas industrialmente são: amido, derivados de celulose, goma guar, goma arábica (*Acacia sp*), goma ghati (*Anogeissus latifolia*), caraia (*Sterculia urens*), tragacanto (*Astragalus sp*), gelana e ágar. Entretanto a busca de novas gomas com propriedades especiais tem despertado interesse da comunidade científica como a de exsudatos de árvores de clima tropical, como a goma de cajueiro. (Cunha *et al.* 2009).

5.2. Estabilidade dos Fitoterápicos

Testes de estabilidade de formulações fitoterápicas são de extrema importância para determinar as condições de estocagem de extratos ou fitoterápicos, garantir o tempo de validade dos mesmos, pois devido a multiplicidade das moléculas, as formulações fitoterápicas possuem uma maior tendência para alterações físico-químicas (Kopleman e Ausgsburger, 2001).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define medicamento como sendo um produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. O medicamento pode ser a associação de um ou mais princípios ativos, com um ou mais excipientes e/ou veículos, que apresentam energia interna reagindo entre si, mediados ou não por fatores intrínsecos, relativos a

formulação (hidrólise, oxidação, fotólise, pH, tamanho da partícula e incompatibilidade) e extrínsecos, relativos a fatores ambientais (temperatura, umidade, gases atmosféricos e radiações) (Rodrigues, 2007).

No estudo de estabilidade de fitoterápicos, devem ser cuidadosamente avaliadas alterações nas colorações, odores e sabores. (Veiga, 2005).

A estabilidade é um parâmetro essencial para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de um produto farmacêutico ao longo do seu prazo de validade. A estabilidade de fármacos e medicamentos é a extensão em estes retêm, dentro do prazo de validade, as mesmas propriedades e características que possuem na ocasião em que foram fabricados (Ansel, 2000).

As diretrizes do ICH (Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de produtos Farmacêuticos para Uso Humano), e normas publicadas pela ANVISA, exigem que o planejamento do estudo de estabilidade contemple avaliações de parâmetros químicos (através de doseamento do teor, impureza e produtos de degradação.), física e físico- químicas (aspecto, cor, odor, valor de pH e viscosidade), microbiológicos e biológicos (garantir a esterilidade ao crescimento microbiológico e a eficácia dos agentes antimicrobianos, quando presentes) e manter o efeito terapêutico inalterado. (ICH, 2003; Brasil, 2005)

Para o procedimento dos ensaios de estabilidade realizados no Brasil, de zona climática IV, as indústrias farmacêuticas seguem a RE nº 1/2005 da ANVISA, que devem ser realizados em câmara climática com controle rigoroso de umidade e temperatura, são definidos em três tipos de estudos: Estudo de Estabilidade Acelerada armazenamento durante 180 dias a temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$, Estudo de Estabilidade de Longa Duração 12 meses: Estudo de Estabilidade de Acompanhamento: estudo é realizado $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$ ((Brasil, 2005).

Produtos fitoterápicos como óleos vegetais, folhas e ou extratos, por exemplo, podem não resistir às condições de armazenamento definidas para o estudo de estabilidade acelerado da ANVISA. Formulações que contenham como veículo água, permite que o fármaco fique mais vulnerável a diversas reações químicas de degradação, incluindo hidrólise, oxidação, complexação e polimerização (Ferreira, 2008).

Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte, assim como cada componente da formulação seja ativo ou não, podem influenciar na estabilidade do produto (Isaac *et al*, 2008).

6. *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot

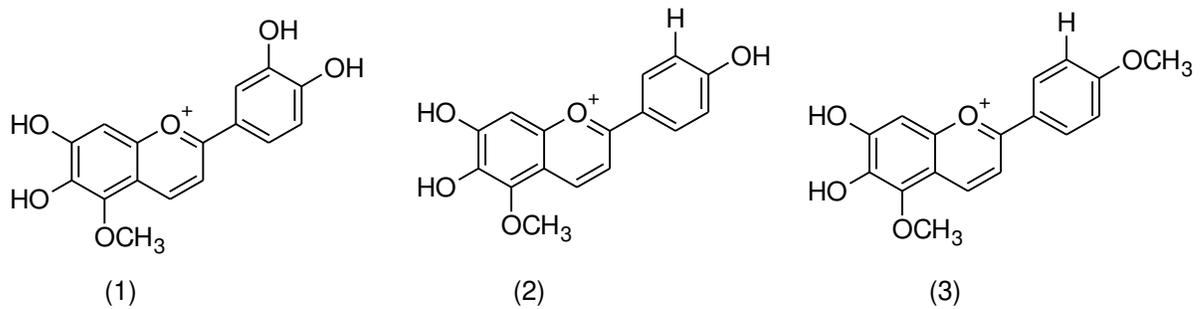
A espécie *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot, conhecida popularmente como pariri, crajiru, puca-panga, coapiranga, chica ou cipó-cruz é nativa em todo território brasileiro e muito comum na Floresta Amazônica. Pertence à família Bignoniaceae, que compreende 120 gêneros com cerca de 800 espécies, distribuídas pelas regiões tropicais da América do Sul e da África (Jorge, 2008). No norte do Brasil, *A. chica* é usada em tatuagens pelos índios devido aos pigmentos vermelhos extraídos de suas folhas (Figura 10) 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. Há ainda relatos populares das atividades anti-inflamatória, antimicrobiano, cicatrizante, antifúngica e para anemia e diarreia sanguinolenta (Taffarello *et al*, 2013).

Figura 10: Folhas de *A. chica*.



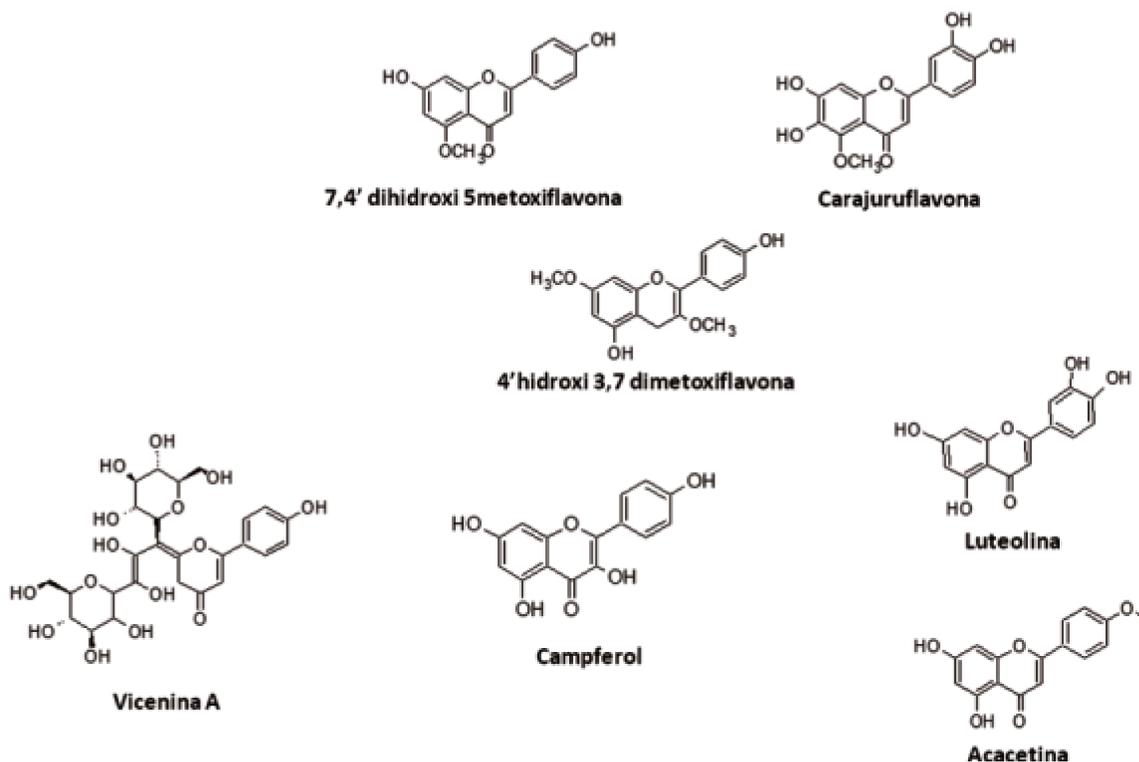
Fonte: Campo experimental CPQBA/UNICAMP Monteiro, K.M.

Chapman *et al*, 1927, descreveu a presença das 3-deoxi-antocianidinas (Figura 11), responsáveis pela coloração vermelha do extrato, isoladas posteriormente por Zorn *et al*, 2001.

Figura 11: Estrutura química das 3-deoxi-antocianidinas isoladas de *A.chica*.

Legenda: 1.(6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavílio), 2. (6,7,4'-trihidroxi-metoxiflavílio) e 3.carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio). (Fonte: Taffarello *et al*, 2013).

Estudos posteriores resultaram no isolamento de antocianinas, fito-esteróis, 7,4'-dihidroxi-5-metoxiflavona e 6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavona (carajuruflavona) (Takemura *et al*,1995), Zorn *et al*, 2001 identificou a presença de Acetina; a atividade antifúngica e tripanocida em *A. chica* foi verificada por Barbosa *et al* (2008), que também identificou os seguintes compostos: campferol , vicnina A e 4'hidroxi 3,7 dimetoxiflavona. Em 2012 o isolamento e caracterização de luteolina foram realizados por do Amaral *et al* verificando atividade antimicrobiana, diurética e antioxidante (Figura 12).

Figura 12: Estrutura química das substâncias isoladas de *A. chica*.

(Fonte: Takemura *et al*, 1995; Zorn *et al*, 2001; Barbosa *et al*, 2008; Amaral *et al*, 2012)

As 3-Deoxiantocianinas é uma classe considerada rara de pigmentos vegetais cuja as agliconas, ao contrário de antocianinas, falta um grupo OH na posição C-3. Esta diferença estrutural simples, no entanto, concede a elas diferentes propriedades bioquímicas. Por exemplo, esses compostos são conhecidos por serem altamente estáveis a variação do pH quando comparados com as antocianinas (Awika *et al*, 2004). Esses compostos foram também recentemente demonstrados ser mais citotóxicos para as células cancerosas do que os seus análogos de antocianidina (Shih *et al.*, 2007). Assim, estes pigmentos raros apresentam uma excelente oportunidade para o uso como corantes naturais (Awika, 2008).

Hou *et al.* 2004, estabeleceu uma relação entre atividade biológica e estrutura química de antocianidinas. Estes autores relataram que a substituição no anel B da antocianidinas afetava sua habilidade de suprimir a carcinogênese. Tais relatos sugeriram que as 3- deoxi-antocianidinas poderiam possuir propriedades biológicas únicas, devido à sua estrutura.

Entretanto, ainda é necessário mais estudos que evidencie melhor a relação das 3-deoxi-antocianidinas e sua atividade farmacológica. (Awika *et al.* 2004)

Visando a padronização da matéria prima e exploração sustentável da espécie *A. chica*, foi realizado estudo no CPQBA-UNICAMP (Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas) identificando marcadores microssatélites para caracterização genética de exemplares dessa espécie disponível no banco de germoplasma (Figueira *et al.*, 2010).

As espécies pertencentes ao gênero *Arrabidaea* são usadas na medicina tradicional para assepsia de feridas e tratamento de desordens 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*.

Estudos desenvolvidos pela nossa equipe, no CPQBA-UNICAMP, comprovaram que o extrato bruto de *A. chica* induz a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno *in vitro*, além de apresentar moderada capacidade antioxidante. Modelos de cicatrização *in vivo*, utilizando Ratos Wistar machos, demonstrou que o extrato bruto de *A. chica* foi capaz de reduzir em 96% a área da ferida e as análises histológicas, deste grupo, demonstraram uma maior quantidade de colágeno depositado (Jorge *et al.*, 2008). Os estudos de mecanismo de citoproteção *in vivo*, utilizando Ratos Wistar, em modelos úlcera gástrica induzida por etanol comprovaram que o extrato tem atividade antiulcerogênica (Jorge, 2008).

Recentemente, dentro da nossa equipe de trabalho foi verificado que o extrato bruto de *A. chica*, seco por atomização, favoreceu a cicatrização de tendões calcâneos em modelo animal (Aro *et al.*, 2012). Também observamos a atividade da extração enzimática sobre a proliferação de fibroblastos e células tumorais humanas (Taffarello *et al.*, 2013), bem como a manutenção da atividade cicatrizante do extrato bruto de *A. chica* quando incorporado à bases semi-sólidas (Sousa, 2013).

Material e

Métodos

1. Estudo Fitoquímico

Estes estudos foram realizados na divisão de fitoquímica, do CPQBA-UNICAMP, juntamente com a doutoranda Ilza Maria de Oliveira Sousa, sob supervisão da Profa. Dra. Mary Ann Foglio.

Foram utilizados solventes grau analítico e grau cromatográfico. O adsorvente utilizado foi celulose microcristalina (Avicel[®]) para cromatografia Merck102330-0500, cartucho C18 *stract Phenomenex*. As análises por cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolha de alumínio, sílica gel 60 F₂₄₅, marca Merck 10005554. A detecção dos compostos foi feita sob lâmpada UV a 254 e 366nm. Foram realizadas análises por cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) marca *Shimadzu*.

As embalagens utilizadas para os testes de estabilidade foram potes brancos de boca larga de polietileno com tampas do tipo rosca.

1.1. Obtenção do material vegetal

O material vegetal de *A. chica* utilizado neste estudo foi coletado no Banco de Germoplasma CPQBA/ UNICAMP localizados no município de Paulínia (22° 45' 00" Sul e 47°10'21" Oeste), estado de São Paulo. Espécimes de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.). Verlot foram introduzidas no campo experimental do CPQBA/Unicamp em 2005, exsicatas das espécies estão depositadas no Herbário do CPQBA/Unicamp, identificadas pela Dra. Glyn Mara Figueira.

Foram coletadas folhas das partes inferior, média e superior ao redor da trepadeira, procurando-se obter uma quantidade equivalente de folhas das diferentes partes da planta (Figura 13). Para este estudo foram coletadas folhas da exsicata1865 de *A. chica*.

Figura 13: Exemplar de *Arrabidaea chica*, cultivado no campo experimental do CPQBA/UNICAMP.



Fonte: Campo experimental CPQBA/UNICAMP Monteiro, K.M.

1.2. Preparação de Extratos Vegetais

1.2.1. Secagem e moagem do material vegetal

As folhas foram secas durante 48 horas em estufa a 40°C, com ventilação forçada, marca Fabbe, e posteriormente moídas no moinho tipo martelo marca Stephen, modelo UM 40 com peneira de 40 mesh. O material seco e moído foi embalado (figura 14) em laminado composto por filme interno de polipropileno, revestido por uma camada alumínio opaca, com a finalidade de proteger da ação deteriorante proveniente da luminosidade externa luz, oxigênio e umidade. esse processo foi realizado no Instituto de Tecnologia em Alimentos ITAL Campinas.

Figura 14: Embalagem contendo 1kg de planta moída empacotada à vácuo.



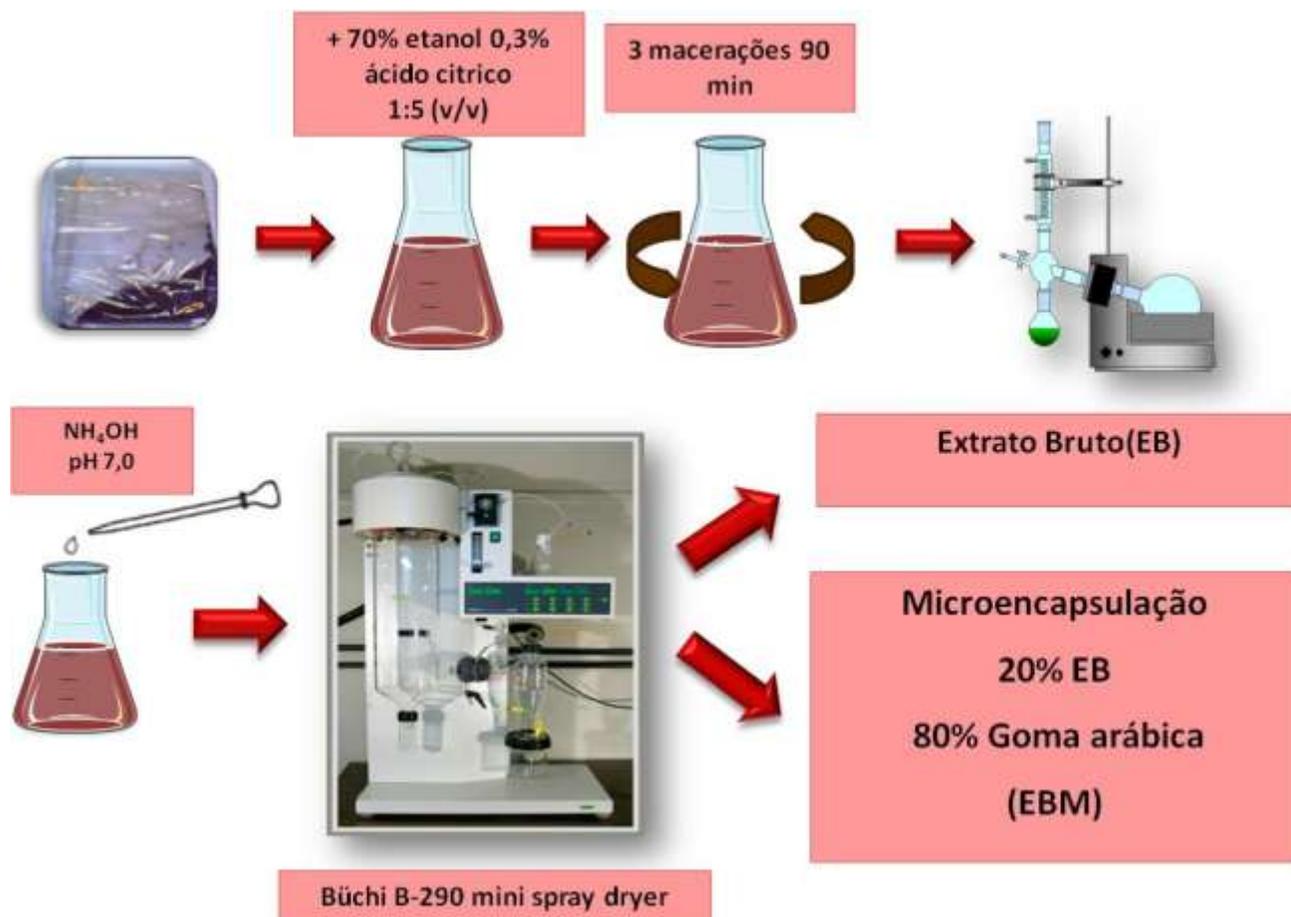
(Fonte: Acervo laboratório de Fitoquímica CPQBA)

1.3. Extração de *A. chica*

A extração de *A. chica* foi realizada com folhas coletadas em abril 2010, moídas e embaladas a vácuo. A metodologia do processo de extração seguiu o protocolo descrito por Oliveira *et al*, 2001.

Três quilogramas do material vegetal seco e moído foi transferido para um tanque com capacidade de 50 L, juntamente com solução etanol/H₂O 70/30, (etanol comercial CHEMCO), acidificada com 0,3% de ácido cítrico (marca *Synth*), na proporção de 1:5. Esse processo, com duração de 90 minutos, foi repetido por 3 vezes. Após filtração, sob vácuo e com proteção da luz, o extrato bruto foi concentrado sob vácuo até redução de 80% do volume final e a seguir, neutralizado com hidróxido de amônio marca Merck para um pH entre 6,5 e 7,0. O extrato concentrado e neutro foi dividido em duas alíquotas, sendo uma seca em *spray dryer* e a outra microencapsulada com goma arábica em *spray dryer* (Figura 15).

Figura 15: Processamento de extração de *A.chica* em planta piloto.



1.4. Condições do *Spray Dryer* para processar os extratos brutos de *Arrabidaea chica* Verlot.

Estes estudos foram realizados na Divisão de Fitoquímica do CPQBA, sob supervisão do prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

1.4.1. Extrato Bruto (EB)

As condições operacionais utilizadas estão descritas na Tabela 6. O processamento foi realizado com nitrogênio líquido e o material obtido foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (UV) (HPLC-DAD) para a determinação da

influencia desse processamento na concentração das três deoxiantocianinas. Para a atomização, foi empregado um mini *spray drying* modelo B-290 de com *loop* inerte B-295, fabricado pela Büchi, Suíça.

Tabela 6: Condições do processamento de secagem por *spray drying* do EB.

Variáveis	Valores pré determinados
Solvente do extrato	Etanol:H₂O
Proporção Etanol: H₂O	70:30
Temperatura do ar de entrada (°C)	90
Temperatura de unidade de refrigeração (°C)	10
Vazão de bombeamento do líquido (mL/min)	20
Vazão de nitrogênio (L/h)	600
Bico injetor (mm)	2,2
Excipiente	sem excipiente

1.4.2. Extrato Bruto Microencapsulado (EBM) -Microencapsulação por Atomização

Inicialmente foi determinado o resíduo seco do EB, em estufa. Esse valor foi utilizado para o cálculo da quantidade necessária de agente encapsulante, respeitando a condição ideal a proporção 4:1 (p/p) de agente encapsulante e extrato respectivamente (Tabela 7). O agente encapsulante utilizado foi a goma arábica (marca Synth) (Rodrigues, 2004).

O EB foi adicionado ao agente encapsulante (goma arábica em água) na proporção descrita na tabela 7, esta solução foi homogeneizada no dispersor marca Quimis modelo Q-252-28 por aproximadamente 3 minutos na rotação 14000 rpm. Para o microencapsulamento, a solução processada em *spray drier* em condições descritas na Tabela 8.

Tabela 7: Proporção de EB incorporado em goma arábica.

EB	Volume	Polímero	Massa de polímero
38,6 (g)	1,2 (L)	Goma arábica	193,2 (g)

Tabela 8: Condições do processamento de microencapsulação por *spray drying* do EB.

Variáveis	Valores pré-determinado
Extrato bruto seco: matriz encapsulante (p/p)	20:80
Solvente	H₂O
Temperatura do ar de entrada (°C)	160
Temperatura de unidade de refrigeração (°C)	10
Vazão de bombeamento do líquido (mL/min)	20
Vazão de nitrogênio (L/h)	600
Bico injetor (mm)	2,2

Os pesa-filtros foram mantidos em estufa (Precision modelo 28), a 105°C por 1 hora, transferidos para um dessecador a temperatura ambiente até observar peso constante. Em seguida foram pesados em balança analítica (Mettler AB204). Nestes pesa filtros foram pesados 1,0 g de EB e de EBM, as quais foram transferidos para uma estufa a 105°C, onde permaneceram por 4 horas. Após resfriamento em dessecador, até atingir a temperatura ambiente, os pesa filtros foram novamente pesados em balança analítica até obtenção de valores constantes.

As amostras EB e EBM foram pesadas em balança analítica a fim de se preparar uma solução com concentração de 1% p/v dissolvidas em H₂O ultrapura. A medida do pH da solução resultante foi realizada em pHmetro (Micronal), calibrado em pH 4 e 7 à temperatura ambiente.

1.4.3. Eficiência da encapsulação

A eficiência da microencapsulação foi verificada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

1.5. Teste de Estabilidade Acelerada

As amostras processadas em spray dryer, EB e EBM, foram pesadas e separadas em embalagens plásticas brancas, com tampas rosqueáveis e submetidas a teste de estabilidade acelerada em câmara climatizada a 40°C e 75% de umidade (Tabela 9). O teste de estabilidade foi realizado seguindo a RE-01 de 2005 da ANVISA na temperatura de 40°C e umidade de 75% em câmara climática (Tecnal modelo TE-4003).

As amostras foram analisadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 180 dias através da determinação de pH, do teor de umidade e de carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio). Também foi avaliada a influência do tempo de armazenamento sobre a atividade farmacológica *in vivo*.

Tabela 9: Teste de estabilidade.

Data retirada para análise	Massa de amostra EB(g)	Massa de amostra EBM(g)	Tempo de exposição(dias)
27/01/2011	4,33	25,14	0
14/02/2011	4	25	15
28/02/2011	4	25	30
28/03/2011	4	25	60
28/04/2011	4	25	90
18/05/2011	4	25	120
28/04/2011	4	25	150
28/07/2011	4	25	180

1.6. Avaliação de perdas por dessecação do EB.

Os pesa-filtros vazios foram mantidos em estufa a 105°C, por 1 hora, em seguida foram pesados em balança analítica (PF-VAZ). As amostras de EB foram pesadas nos pesa-filtro (PF+AM), mantidas em estufa a 105°C, por 4 horas, sendo retiradas e mantidas em dessecador até atingir a temperatura ambiente e novamente pesadas em balança analítica (PF+RS).

1.7. Análises Qualitativas e Quantitativas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Foram monitorados as 3-deoxi-antocianidinas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (UV) (HPLC-DAD) a 470 nm, identificadas pelo método de avaliação de massa carga, como m/z 301 (6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-flavilium) m/z 285 (6,7,4'-trihidroxi-5-dimetoxiflavilium) e m/z 299 carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

As frações e substâncias puras foram dissolvidas em solvente apropriado, grau HPLC, e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos (UV), nas condições baseadas em Devia *et al* (2005).

1.7.1. Preparo da Curva analítica

Para a obtenção da curva analítica, 2,7mg do padrão analítico com 92% de pureza, foram dissolvidos em metanol (grau cromatográfico marca JT BAKER) em balão volumétrico de 5,00mL, obtendo uma solução estoque de 497µg/mL. As diluições foram realizadas com pipeta automática em balões volumétricos obtendo concentrações de 9,94; 19,9; 49,7; 74,6; 124,3 e 149,1µg/mL.

2. Atividade Farmacológica

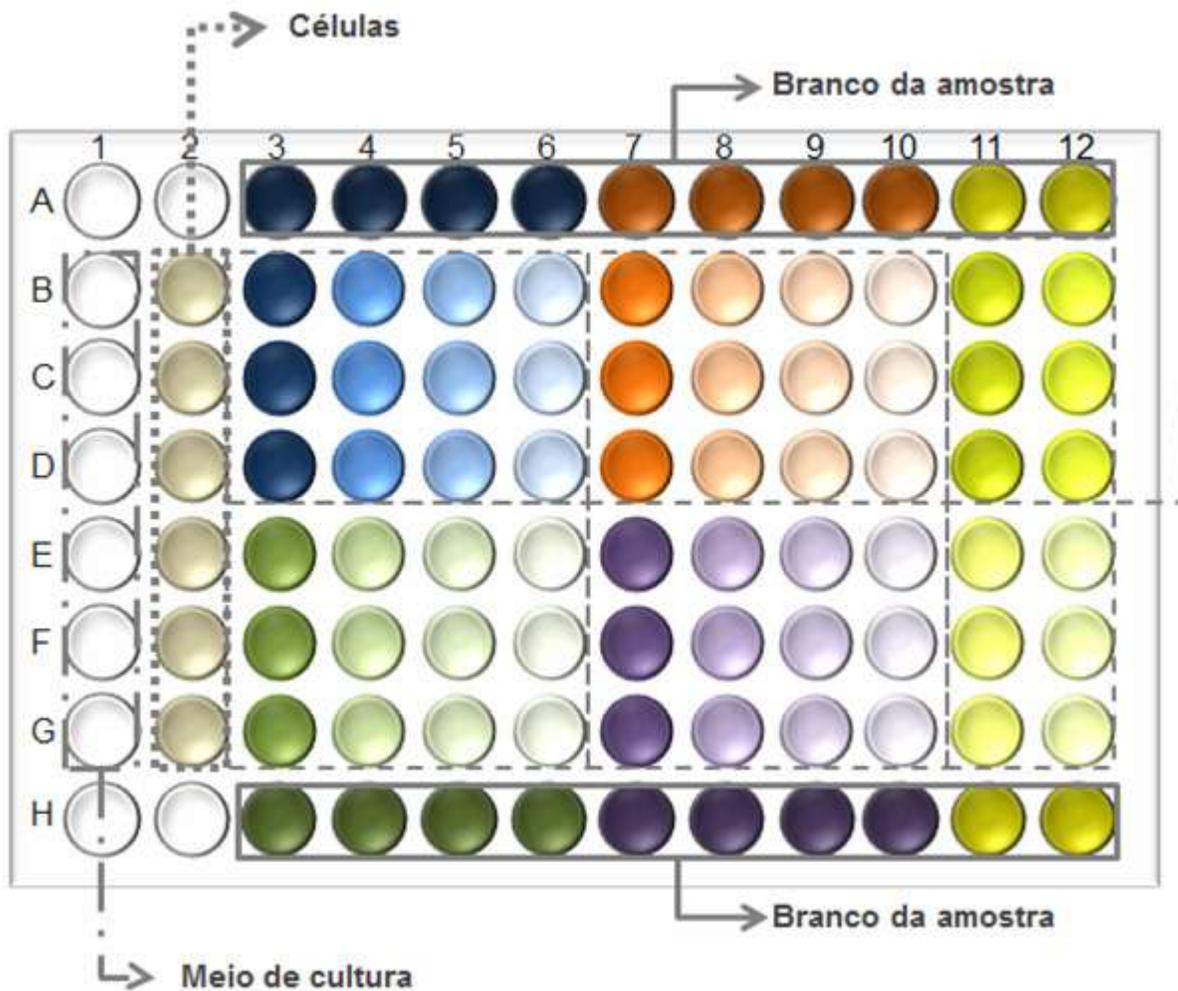
2.1. Teste de Indução de Crescimento com Fibroblastos *in vitro*

A atividade sobre a proliferação de fibroblastos foi realizada através de modificações da metodologia utilizada em trabalhos anteriores (Jorge *et al.* 2008). A linhagem de fibroblasto humano utilizada foi doada pela *Allergisa Pesquisa Dermato-Cosmética Ltda, Campinas – Brazil*.

Os fibroblastos foram tripsinizados e ressuspensos em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)/10 % soro fetal bovino (SFB) / penicilina:estreptomicina (1:1) 0,1 % na densidade de 3×10^4 células/mL. As células foram semeadas (100 μ L/compartimento) em uma placa de 96 compartimentos e mantidas a 37°C, em incubadora com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após 24h, todo meio foi substituído por DMEM/0,3% SFB/penicilina:estreptomicina (1:1) 0,1% e depois de 48h, diluições seriadas (0,25; 2,5; 25 e 250 μ g/mL) das amostras e do controle (alantoína) em DMEM/0,3% SFB/penicilina:estreptomicina (1:1) 0,1% (Figura 16). Uma placa T0 fixada no dia de adição das amostras também foi preparada como controle da quantidade total de células no momento de adição das amostras. Ao final de 72h de incubação, as células foram fixadas com 50 μ L/compartimento de ácido tricloroacético (TCA a 50%) e as placas foram incubadas por 1h a 4°C; a seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, o conteúdo proteico fixado foi corado com 50 μ L/compartimento de sulforrodamina B (SRB) 0,4% (p/v), dissolvida em ácido acético 1%. Após 20min da aplicação da solução corante, as placas foram lavadas quatro vezes com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma[®]), 10 μ M e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540nm em leitor de microplacas.

A partir das leituras espectrofotométricas, foi calculado o crescimento celular para cada concentração de amostra testada. Esses resultados foram expressos em curvas de crescimento celular em função da concentração da amostra, empregando-se software ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation) para construção dos gráficos.

Esta metodologia empregada na cultura de células constitui metodologia de rotina no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA-Unicamp.

Figura 16: Esquema da disposição das amostras na placa de 96 poços.

Legenda: Branco das amostras (margens superiores e inferiores da placa); controle de células (segunda fileira de B a G); meio de cultura (primeira fileira e letras A e H da segunda fileira); colocação das amostras: 1 (cor azul - B a D – fileiras 3 a 6); 2 (cor laranja - B a D – fileiras 7 a 10); 3 (cor verde - E a G – fileiras 3 a 6); 4 (cor roxa - E a G – fileiras 7 a 10) e 5 (cor amarela - B a G – fileiras 11 e 12). A intensidade de cada coloração (mais escuro ao mais claro) corresponde às diluições das amostras (250; 25; 2,5 e 0,25µg/mL).

2.2. 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 (150-300 g), aclimatados às condições do laboratório por 7 dias.

Os protocolos foram elaborados em concordância com os Princípios Éticos utilizados na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de laboratório (SBCAL). Esses protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal no Uso de Animais CEUA/UNICAMP (Protocolo número 2407-1), em anexo.

2.2.1. Atividade Anti-ulcerogênica

2.2.1.1. Úlcera Induzida por etanol/HCL, para avaliação da estabilidade dos extratos.

Após um período de 12 horas em jejum, com acesso livre à água, Ratos Wistar fêmeas pesando em média 250 g, foram separados em 8 grupos de 7 animais sendo que um grupo foi tratado com solução salina 0,9% (10mL/kg, v.o., controle negativo), outro com carbenoxolona (200mg/kg, v.o., controle positivo), três com o EB (100, 300 e 1000mg/kg, v.o.) e outros três com EBM (100, 300 e 1000mg/kg, v.o.). Após 60 minutos do tratamento, foi administrado pela via oral 1mL de etanol 60%/HCl 150mM, de acordo com a metodologia descrita por Donatini *et al* (2009). 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 os parâmetros (Tabela 10) (Monteiro, 2006).

Tabela 10: Avaliação das Lesões Úlcerativas em Estômago.

Tipo de Lesão	Pontuação	
Perda de pregas da mucosa	1 PONTO	
Descoloração da mucosa	1 PONTO	
Edema	1 PONTO	
Hemorragias	1 PONTO	
Petéquias	≤ 10 petéquias	2 PONTOS
	> 10 petéquias	3 PONTOS
Úlceras até um milímetro	n x 2 PONTOS	
Úlceras maiores que um milímetro	n x 3 PONTOS	
Úlceras perfuradas	n x 4 PONTOS	

*n refere-se ao número de lesões observadas.

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

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

2.2.1.2. Mecanismo de ação da atividade antiulcerogênica

Para avaliação do mecanismo de ação foi utilizada a dose efetiva do extrato bruto de *A. chica* (DE₅₀), foi obtida de uma curva dose versus resposta em modelo de úlcera induzida por etanol, onde os animais foram tratados nas doses de 100, 300 e 1000 mg/Kg.

2.2.1.2.1. Atividade sobre a produção de muco gástrico

Após período de 12 horas de jejum, com acesso livre a água, um grupo de animais (n=6) foi tratado com solução salina 0,9% (10mL/kg), como controle negativo, outro com carbenoxolona (200mg/kg, n=6)), como controle positivo e outros dois (n=6) com o EB nas doses de 125 e 500 mg/kg. Uma hora após o tratamento oral, todos os animais receberam 1mL de etanol absoluto. Após uma hora desta administração, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram retirados, abertos ao longo da maior

curvatura e lavados em solução salina 0,9% para posterior determinação quantitativa do muco gastroprotetor. A região fúndica do estômago foi retirada e o corpo glandular pesado e mergulhado em 10mL de solução de Alcian Blue 0,1% por um período de duas horas. Em seguida, os estômagos foram submetidos à lavagem com 10mL de solução de sacarose 0,25M por duas vezes, sendo a primeira por 15 segundos e a segunda por 45 minutos. A seguir, os estômagos foram transferidos para 10mL de solução de MgCl 0,5M por duas horas para a extração do corante complexado com o muco gástrico. Com a solução obtida foi feita uma emulsão com 10mL de éter etílico, que a seguir foi centrifugada por 15 minutos a 3600rpm. A fase etérea desprezada e a fase aquosa submetida à leitura espectrofotométrica em 598nm, conforme metodologia descrita em Possenti *et al* (2012).

2.2.1.2.2. Atividade sobre a secreção gástrica

Para o estudo da atividade dos extratos de *A. chica* sobre a secreção gástrica, foi utilizado teste de Ligadura de Píloro de acordo com metodologia desenvolvida por Monteiro *et al.* (2012).

Após 12 horas em jejum, com acesso livre à água, Ratos Wistar fêmeas pesando em média 250 g, foram separados em 5 grupos de 7 animais, anestesiados pela administração de tiopental sódico (50mg/Kg, i.p.) para realização da tricotomia, incisão abdominal e a ligadura do píloro com linha cirúrgica de algodão.

Logo após a ligadura, cada grupo de animais recebeu por via intraduodenal o tratamento correspondente: o primeiro recebeu solução de NaCl 0,9% na dose de 2,5 ml/Kg como controle negativo, o segundo grupo recebeu cimetidina na dose de 100 mg/Kg, como controle positivo e os três últimos grupos receberam o extrato bruto de *A. chica* nas doses de 125, 250 e 500 mg/Kg respectivamente, diluídos em solução de NaCl 0,9%. O abdômen foi então suturado com linha para sutura estéril, não absorvível (Brasuture NPA345 monofilamento de nylon 2.0). Durante o pós operatório, os animais foram mantidos anestesiados e observados em relação aos sinais de dor e consciência. Quando necessário uma segunda dose de tiopental foi administrada. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia, o abdômen foi aberto e o estômago retirado para

determinação do volume do conteúdo estomacal. Após adição de 2mL de água destilada o conteúdo estomacal foi centrifugado a 2000 rpm por 10 min. O pH foi determinado através de pHmetro e a concentração de íons H⁺ (mEq/L/4h), através de titulação com solução de NaOH 0,05N, utilizando-se solução de fenolftaleína (1%) como indicador. A concentração de ácido total em mEq/L/4h foi calculada através da equação 2:

Equação 2:

$$(\text{Volume do ácido}) \times (\text{Molaridade do ácido}) = (\text{Volume da base}) \times (\text{Molaridade da base})$$

2.2.2. Atividade Cicatrizante

2.2.2.1. Indução da Diabetes

Este estudo foi desenvolvido de acordo com Chithra *et al* (1998), quando ratos Wistar, pesando entre 190-210g, receberam injeção única (via intraperitoneal) de estreptozotocina SIGMA[®] (60mg/kg), em 0,1 M de tampão citrato, pH 4.0. Os níveis de glicose no sangue foram checados três dias após a injeção de estreptozotocina (STZ) para seleção dos animais com nível glicêmico ≥ 200 mg/dL.

2.2.2.2. Procedimento cirúrgico e tratamento.

Ratos Wistar pesando entre 250-300g foram divididos em 4 grupos de 7 animais cada, denominados grupos I (salina, 0,9%), II (alantoína, 100mg/mL), III (EB, 100mg/mL) e IV (EBM, 100mg/mL). Após a anestesia por tiopental 50 mg/Kg, o dorso dos animais foi tricotomizado e esterilizado com 70% EtOH. Úlceras cutâneas medindo, em média, 1.5 cm² foram produzidas 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 para cálculo da porcentagem de redução (contração) 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 histopatológica e para determinação do

colágeno total, através da determinação do conteúdo de hidroxiprolina. Oito milímetros foram puncionados da área cicatrizada e homogeneizados em 2 ml 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 hidrolisadas foram congeladas para posterior avaliação determinação da hidroxiprolina (Jorge *et al*, 2008).

2.2.2.3. Análise de Hidroxiprolina

Vinte µL de cada amostra hidrolisada foram adicionados em uma placa de 96 compartimentos e incubados por 20 minutos, a temperatura ambiente, após a adição de 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. A absorbância em 550nm foi determinada por leitor de microplaca (VERSA Max, Molecular Devices). Uma curva de calibração de hidroxiprolina (0 a 10 µg/mL) foi preparada e os resultados foram expressos em µg/mL de hidroxiprolina (Woessner, 1961; Jorge *et al* 2008).

2.2.2.4. Estudos Histopatológicos

As análises histológicas foram realizadas na Faculdade de medicina da Universidade São Francisco de Bragança Paulista, pela Professora Dra. Denise Priolli.

2.3. Avaliação do EB sobre a neoformação vascular

Esses estudos foram realizados sob supervisão da Dra. Viviane Ferre.

2.3.1. Membrana corioalantóide (MCA)

O material, previamente liofilizado, obtido da reticulação química do ácido hialurônico 0,5% e o EB, foi dissolvido em salina estéril e filtrado em membrana com poro de 0,22 µm

(filtros Millex[®]). Esta solução foi armazenada em recipientes estéreis à -20°C, até o momento de sua utilização. Papel de filtro Whatmman (cortado na forma de discos circulares com 0,5 cm de diâmetro e esterilizado) foi utilizado como veículo para a deposição do material de estudo. Para se estudar a atividade angiogênica apresentada pelo material foi utilizado o teste na MCA de embriões de galinha conforme descrito por Ferre, 2012.

Os ovos de galinha (*Gallus domesticus*) linhagem Rhoss, adquiridos da Jikkenti Yamaguishismo Agropecuária Ltda (Jaguariúna) foram incubados em estufa automática produzida pela Brasmatic Ind. e Com. LTDA, com controle de temperatura (38 °C) e umidade (65%), deslocados lateralmente a cada 15 minutos, durante os 5 primeiros dias de incubação, conforme esquematizado na Figura 17. Ao final deste prazo, os ovos foram submetidos à abertura circular (1,0 cm de diâmetro) em sua base maior, onde está localizada a câmara de ar, com auxílio de uma microretífica marca Dremel. Após a realização da abertura, utilizando-se de seringa e salina estéreis, depositou-se uma gota de salina (NaCl 0,9% p/v) para auxiliar na retirada da membrana da casca, expondo a MCA já vascularizada. A abertura, foi vedada com fita adesiva transparente e o ovo novamente incubado, porém, sem agitação periódica e com a base furada voltada para cima. Ao final do 13° dia de incubação, os discos de papel de filtro, veiculando 3 µL da solução teste em cada grupo, ou água destilada (controle negativo), foram depositados diretamente sobre a membrana de forma cuidadosa e estéril.

Os ovos voltaram à incubação até o 16° dia, quando foram retirados da incubadora. Em seguida, as MCAs (membrana transparente, vascularizada, que separa o embrião do meio externo) foram fixadas em solução de formol a 10 % por 5 min, retiradas do embrião e fotografadas com auxílio de uma vídeo câmera CCD-Iris Sony modelo DXC-107 A, adaptada a um microestereoscópio da marca Taylor Hobson com um aumento de 10 X e conectada a um computador equipado com uma placa de aquisição de imagens marca PIXEL VIEW, utilizando-se do software “Pixel View Station v4.29 TV” para captura da imagem.

Figura 17: Esquema da metodologia em membrana corioalantóide.



Legenda: **A.** Incubação dos ovos em estufa automática; **B.** abertura do ovo em sua base maior; **C.** exposição da membrana corioalantóide com salina; **D.** vedação da câmara de ar com fita adesiva transparente; **E.** disco de papel de filtro veículando o material a ser testado; **F.** retirada da membrana corioalantóide do ovo; **G.** aspecto da MCA no 16º dia de incubação após retirada do ovo.

Grupos de estudo:

Controle Negativo – 3 μ L salina estéril (8 ovos).

Controle Positivo- Ácido Hialurônico (AH) 0,5% (8 ovos).

Experimental A – 3 μ L suspensão do EB; 1 mg /ml salina estéril (8 ovos).

Experimental B – 3 μ L suspensão do EB; 5 mg /ml salina estéril (8 ovos).

Experimental C – 3 μ L suspensão do EB; 10 mg /ml salina estéril (8 ovos).

Experimental D – 3 μ L suspensão do EB; 25 mg /ml salina estéril (8 ovos).

Experimental E – 3 μ L suspensão do EB; 50 mg /ml salina estéril (8 ovos).

Experimental F – 3 μ L suspensão do EB; 100 mg /ml salina estéril (8 ovos).

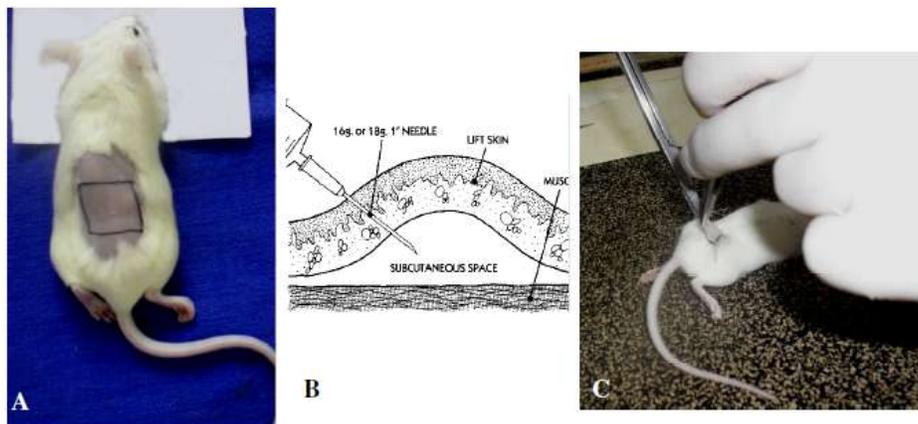
Experimental G – 3 μ L suspensão do EB; 500 mg /ml salina estéril (8 ovos).

2.3.2. Tegumento dorsal de camundongos.

O método avalia o processo de angiogênese, pela injeção subcutânea das amostras no tegumento dorsal de camundongos previamente anestesiados e tricotomizados, segundo Ferre (2008) e por análise histológica. Os animais, camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*

(4-6 semanas de idade) adquiridos no Biotério Central da Universidade de Campinas – CEMIB, previamente anestesiados (Ketamina [3,5 g/mL]: 400 μ L/20 g de peso – administração subcutânea) foram tricotomizados na região dorsal onde foi realizada a marcação de um quadrante com tinta Nanquim. Nesse quadrante foram injetados 40 μ L de cada amostra e de seu respectivo grupo controle (Figura 18 A e B). Após uma semana, os animais foram sacrificados, por aprofundamento da anestesia; retirada do tegumento dorsal (Figura 18 C) para análise macroscópica através da obtenção de fotografias sobre um fundo branco, em tamanho 640X480 pixels e formato de RGB 24 bites, com auxílio de uma vídeo câmera CCD-Iris Sony modelo DXC-107 A. Após fixação em formol a 10%, o material foi processado para análise histológica e quantificação dos vasos sanguíneos.

Figura 18: Representação da aplicação subcutânea e retirada do tegumento do dorso de camundongos.



Legenda: **A:** Delimitação do local de aplicação das amostras; **B.** região subcutânea de aplicação das amostras no dorso de camundongos; **C:** retirada do tegumento do dorso. *Fonte: B.* (Fonte: disponível em: www.medaille.edu.br).

Grupos de estudo:

Controle Negativo – 40 μ L salina estéril (10 camundongos).

Controle Positivo – 40 μ L AH 0,5% (10 camundongos).

Experimental A – 40 μ L suspensão do EB; 1 mg /ml salina estéril (10 camundongos).

Experimental B – 40 μ L suspensão do EB; 5 mg /ml salina estéril (10 camundongos).

Experimental C – 40 μ L suspensão do EB; 10 mg /ml salina estéril (10 camundongos).

Experimental D – 40 µL suspensão do EB; 25 mg /ml salina estéril (10 camundongos).

Experimental E – 40µL suspensão do EB; 50 mg /ml salina estéril (10 camundongos).

Experimental F – 40 µL suspensão de EB; 100 mg /ml salina estéril (10 camundongos).

Experimental G – 40 µL suspensão do EB; 500 mg /ml salina estéril (10 camundongos).

Experimental H – 40 µL suspensão do EB; 1000 mg /ml salina estéril (10 camundongos).

2.3.2.1. Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos do tegumento dorsal de camundongos

As imagens digitalizadas das peles retiradas do dorso dos camundongos foram processadas pelo programa *Corel Photo Paint 11* de forma que a saturação, brilho e contraste permitissem uma melhor resolução dos vasos sanguíneos. A análise das imagens foi realizada por dois observadores através da contagem visual de vasos sanguíneos totais.

2.3.2.1. Análise histológica do tegumento dorsal de camundongos.

As regiões do tegumento dorsal dos camundongos, onde foram realizadas as injeções subcutâneas das amostras, foram retiradas por dissecação, fixadas em formol a 10 % e fotografadas contra um fundo branco. Em seguida foram desidratadas (n= 4 animais), incluídas em historesina e seccionadas a 5 µm de espessura em micrótomo rotatório Spencer.

Os cortes histológicos obtidos foram corados com Hematoxilina/Eosina (HE), segundo técnica clássica padronizada, e observados em microscópio de luz Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) onde 10 campos visuais dos cortes histológicos de cada animal foram quantificados. A aquisição das imagens foi realizada através de uma câmera digital

Nikon DXM1200 (Nikon Instruments Inc.), acoplada ao microscópio. O tratamento, inclusão, corte, coloração e análise dos tecidos foram realizados no laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Unicamp, pela Dra. Viviane Ferre sob supervisão do prof. Dr. Hernandez F. Carvalho.

2.3.2.2. Quantificação microscópica dos vasos sanguíneos do tegumento dorsal de camundongos.

As lâminas histológicas obtidas como descrito no item anterior, foram também utilizadas para a realização da contagem dos vasos sanguíneos do tegumento dos camundongos dos diversos grupos estudados. As contagens do número de vasos sanguíneos totais foram realizadas visualmente com o auxílio de um microscópio de luz modelo BR044 (*Carl Zeiss*), com objetiva de 40 x e ocular de grande campo de 8 x, equipada com um retículo quadriculado onde 10 campos foram quantificados. As contagens foram realizadas pela Dra. Viviane Ferre.

2.4. Estudo de toxicidade oral em doses repetidas de 28 dias em roedores

Este estudo foi supervisionado pela Veterinária Msc. Karin Maia Monteiro da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP.

Foram utilizados ratos albinos adultos da linhagem Wistar fêmeas nulíparas e machos, identificados individualmente através da colocação de brinco de aço inoxidável. Após jejum de 12 horas, vinte animais foram submetidos à administração oral diária por gavagem da substância-teste (EB) na dose de 300mg/Kg (10 fêmeas e 10 machos), outros vinte animais, grupo controle receberam o veículo (NaCl 0,9%) 10mL/Kg (10 fêmeas e 10 machos) e 20 animais adicionais (10 fêmeas e 10 machos) foram incluídos no experimento como grupo controle “satélite”, não sendo submetidos a qualquer tratamento oral.

Todos os animais do estudo foram observados individualmente após a administração da substância-teste e do veículo salina 0,9%, por pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos, periodicamente durante as primeiras 24 horas, com atenção especial dada nas primeiras 4 horas. Diariamente, os animais foram observados após a administração oral e, semanalmente, foram submetidos à avaliação clínica para registro de possíveis alterações por 28 dias. A avaliação clínica dos animais, incluindo a descrição dos possíveis sinais de toxicidade e sua reversibilidade, bem como ocorrência de óbito para cada um dos animais foi registrada na ficha de avaliação clínica individual, bem como os pesos individuais dos

animais durante o estudo (ambos com frequência semanal). Os parâmetros observados e pontuados nas fichas de avaliação clínica individual incluem: evolução de peso corporal (percentuais de ganho ou perda de peso), sinais clínicos (temperatura corporal, frequências cardíaca e respiratória), aparência geral (pilo-ereção, secreções, alterações na pele, pêlos, olhos e mucosas), comportamento espontâneo e resposta a estímulos. Atenção especial foi dirigida a possíveis observações de tremores, de convulsões, de salivação, presença de diarreia e letargia, alterações do sono e evidência de coma. As manifestações de ordem qualitativa foram pontuadas com base na intensidade dos sintomas, previamente estabelecido: score 0 para nenhum sinal (avaliação normal), score 1 para efeitos leves, score 2 para efeitos moderados, score 3 para efeitos intensos e score 4 é considerado efeito severo (Wolfensohn, 2003). Caso os animais apresentassem sinais contínuos de dor severa em qualquer estágio do ensaio seriam submetidos à eutanásia. A decisão para a realização da eutanásia tem sempre como base os princípios e critérios resumidos no “Human Endpoints Guidance Document”;

Durante todo o período experimental, com frequência semanal, foi realizada a pesagem individual dos animais, bem como pesagem da ração residual e registro do consumo, por gaiola.

Ao término do período experimental, todos os animais foram anestesiados com tiopental (50 mg/kg) por via intraperitoneal, realizada coleta de sangue periférico para posterior análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, os valores obtidos foram comparados com valores de referência, sem descartar os valores obtidos nas análises dos animais do grupo satélite. As faixas de valores distribuídos em curva gaussiana incluem dois valores de desvio padrão abaixo e acima da média (Evans, 2009).

Em seguida, foram submetidos à eutanásia (aprofundamento da anestesia) e imediata análise anatomopatológica (necropsia), sendo os órgãos vitais coletados pesados e enviados para posterior análise histopatológica.

3. Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando estatística descritiva básica e análise de variância (ANOVA), e avaliados pelo método de Duncan e Turkey, com a finalidade de

caracterizar as variáveis estudadas. O nível de significância escolhido foi igual ou inferior a 5 %. As análises foram realizadas com o auxílio do Software *StatSoft Electronic Statistics Textbook* (Software Basic Statistic, Inc.).

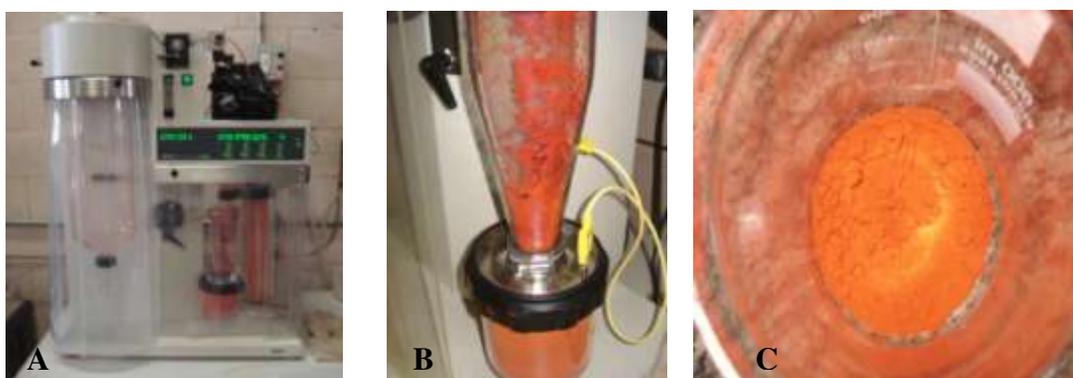
Resultados E

Discussão

1. Obtenção dos Extratos Bruto (EB) e Bruto Microencapsulado (EBM) de *Arrabidaea chica* e seus compostos isolados

A secagem por processo de *Spray Dryer* do extrato bruto de folhas secas e moídas de *A. chica* forneceu um rendimento de 15% (Figura 19). Na Tabela 11 são apresentadas as avaliações química e físico químicas, avaliando-se pH, umidade e teor de carajurina do extrato.

Figura 19: (A,B) EB) em processo de secagem por *Spray Dryer* (Buchi B-290); (C) EB após finalizado o processo de atomização.



(Fonte: Laboratório Fitoquímica CPQBA)

Tabela 11: Avaliação de parâmetros físico-químicos do EB de *A.chica* após secagem por atomização.

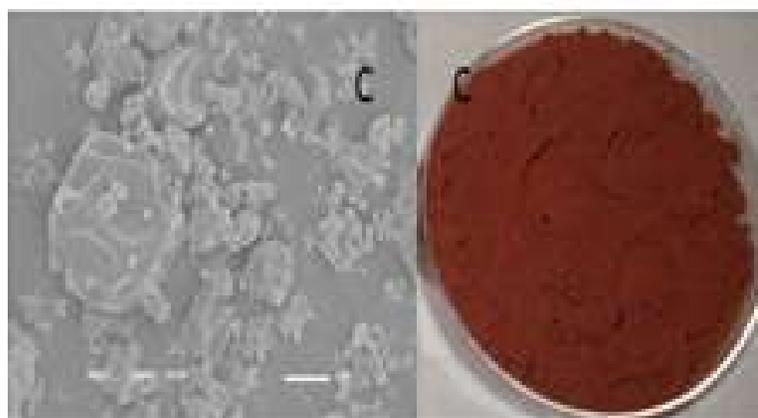
Análise	Resultados (media \pm desvio padrão)	CV* (%)
Teor de Umidade (%)	11,61 \pm 0,09	0,78
pH	4,88 \pm 0,02	0,41
Teor de carajurina (%)	6,51 \pm 0,07	1,09

*Coeficiente de variação < 5%

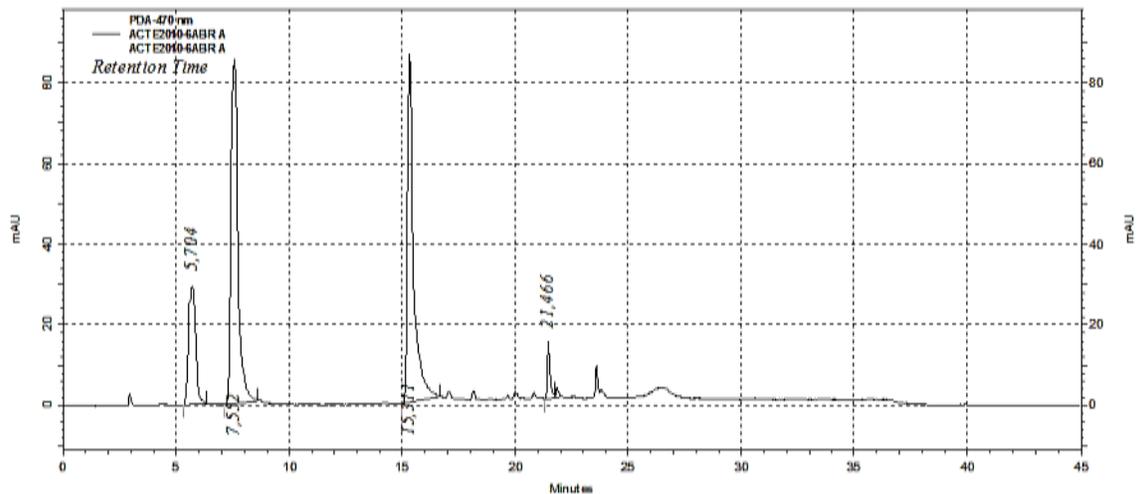
Ainda em solução Inicialmente foi determinado o resíduo seco do EB em estufa, para adicionar o agente microencapsulante goma arábica (20% de EB e 80% de goma). O processo de microencapsulação, em spray drier, forneceu um rendimento do EBM de 82%. A fim de verificar a formação das microcapsulas, o EBM foi submetido a Microscopia Eletrônica

de Varredura (MEV) sendo possível observar microcápsulas de paredes contínuas, arredondadas, sem fissuras, rachaduras ou rompimentos, o que é fundamental para garantir uma menor permeabilidade a gases e maior proteção e retenção do recheio. Observou-se ainda a presença de concavidades, ou achatamentos na superfície, que são características das microcápsulas produzidas por atomização com goma arábica como agente encapsulante e que já foram constatadas também por Trindade & Grosso (2000) (Figura 20).

Figura 20: Imagem obtida por MEV com aumento de 1500X e 10kv das microcápsulas do EBM.



Para as análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC), previamente à análise, as clorofilas e graxas do EB foram eliminadas utilizando-se cartucho C-18 previamente acondicionado com água acidificada com ácido fosfórico a $\text{pH} = 2$ e eluído com metanol. Nas condições de HPLC empregadas, as 3 deoxiantocianidinas foram observadas respectivamente nos tempo de retenção $\text{TR}=5,8\text{min}$ (6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavílio, pigmento 1), $\text{TR}=7,9\text{min}$ (6,7-trihidoxi-5-metoxiflavílio, pigmento 2) e $\text{TR}=15,8$ (6,7-dihidoxi-5,4'-dimetoxiflavílio, carajurina) sendo os cromatogramas registrados a 470 nm (Figuras 21 e 22). Além disso, foi realizada uma curva analítica de calibração da carajurina (marcador analítico) para determinação do teor de carajurina em EB (Tabelas 12 e 13 e Figura 23).

Figura 21: Cromatograma do extrato bruto sem encapsular de *A. chica*.

Amostra: EB de *A. chica*; cromatógrafo *Shimadzu*, coluna *C18 Gemini*, $\lambda=470\text{nm}$, fluxo 1 mL/min , forno 35°C e *Software Class VP-5*; TR = 5,8 min (6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavilio); TR = 7,9 min (6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilio) e TR=15,8 min (6,7-dihidoxi-5,4'-dimetoxiflavilio carajurina).

Figura 22: Espectro de absorvância na faixa de (200 a 600nm) observado para as 3-deoxiantocianidinas presentes no EB (6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavilio(5,88min), 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilio (7,9 min) e carajurina (15,8min.).

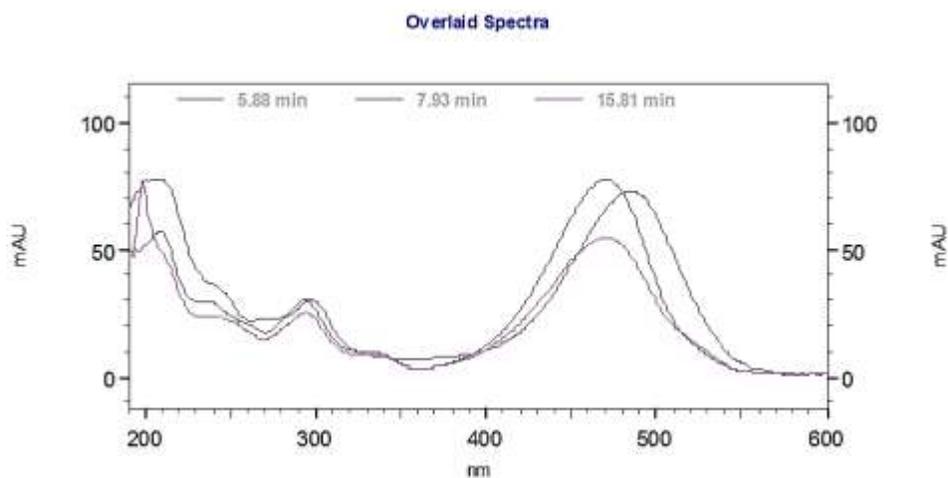
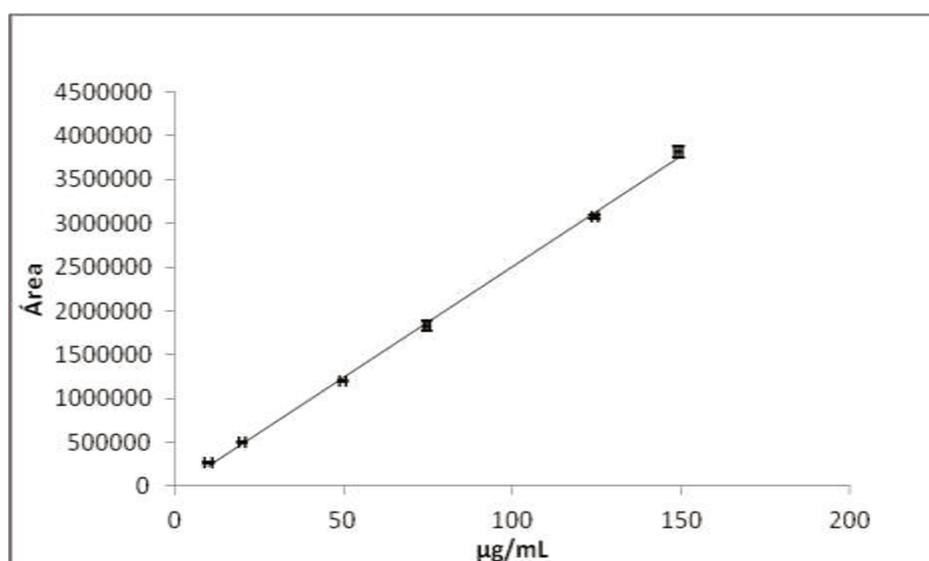


Tabela 12: Dados obtidos para confecção da curva analítica carajurina.

Concentração (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média Área	Dvp*	CV (%)**
9,94	265052	247060	253696	255269	9098,6	3,56
19,9	496142	488425	499905	494824	5852,4	1,18
49,7	1200332	1188052	1193062	1193815	6174,6	0,52
74,6	1826550	1938315	1845508	1870124	59810,8	3,20
124,3	3072762	3072032	3103528	3082774	17977,2	0,58
149,1	3818296	3713887	3834134	3788772	65334,3	1,72

*Desvio padrão 3 da área obtida de 3 curvas analíticas

Figura23: Curva analítica do marcador carajurina.

Equação da reta: $y=25321x-24461$; R^2 0,9989.

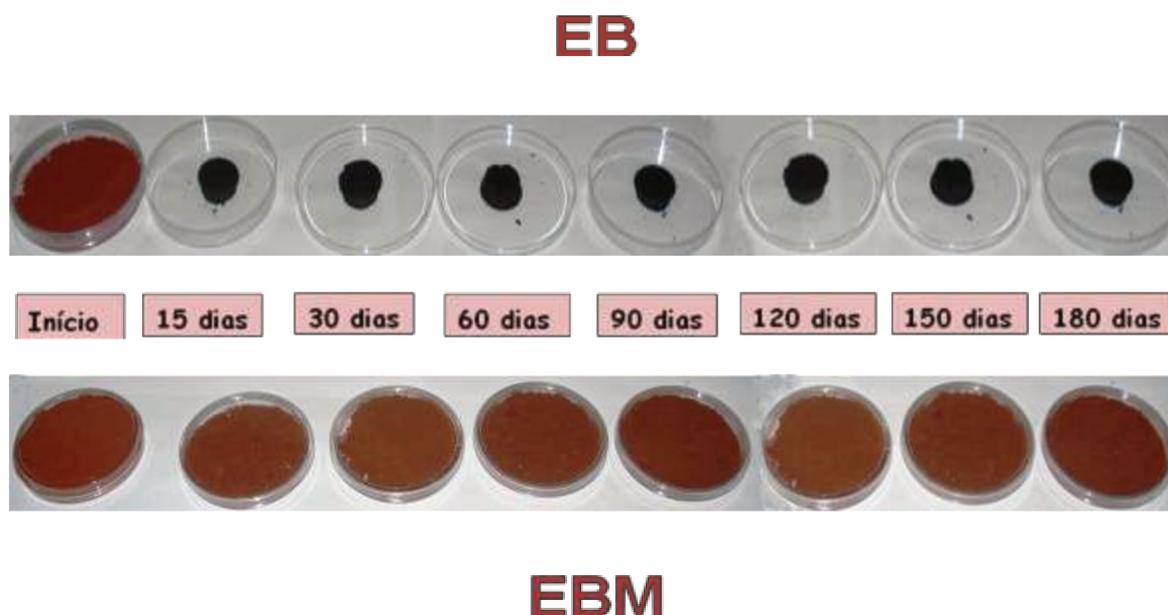
Através desse estudo analítico, realizado através de três curvas analíticas de carajurina (m/z 299), com 6 níveis de concentração, foi determinado que a faixa analítica de linearidade foi de 9,94 a 149,1 µg.mL⁻¹. Além disso, o coeficiente de correlação linear obtido ($R^2 = 0,9989$) correspondeu a um valor de coeficiente de correlação (R) igual a 0,9994; estes valores atendem o critério mínimo para aceitação de valor de R ($R \geq 0,99$) estabelecido pela Resolução nº899 da ANVISA (Brasil, 2003).

2. Avaliação do teste de estabilidade

Alíquotas dos EB e EBM foram colocadas na câmara climática, a 40°C e 75% de umidade, por um período de 180 dias. Amostras foram retiradas aos 15, 30, 60, 90, 150 e 180 dias para realização das análises físico-químicas, quantificação por HPLC das antocianidinas e nos testes farmacológicos, sendo que para estes, as amostras foram armazenadas em freezer por no máximo uma semana.

2.1. Análises Físico-Químicas:

Após 3 horas de exposição na câmara, já foram observadas alterações na coloração do EB. Na Figura 24 pode-se observar o comportamento de EB e EBM após 180 dias de exposição em câmara, a 40°C e 75% umidade. Foi bastante evidente a alteração de coloração assim como a contração do material nas amostras de EB a partir do 15º dia.

Figura 24: Análise visual de EB e EBM ao término do teste de estabilidade acelerada.

Legenda: EB e EBM mantidos em câmara climatizada por 180 dias a 40°C e 75% de umidade, as amostras foram retiradas para análises em 15, 30, 60 e 90, 120, 150 e 180 dias.

(Fonte: Fitoquímica/CPQBA)

Por se tratar de um teste de estabilidade acelerado foi necessário avaliar também como pH e o teor de umidade variou em função do tempo de armazenamento em condições de estabilidade acelerada.

No tempo 0, o teor de umidade do EB foi determinado como $11,61 \pm 0,09\%$. Para os demais tempos, não foi possível analisar teor de umidade por causa da petrificação das amostras. Por outro lado, foi possível analisar todas as amostras de EBM (Tabela 13) os quais apresentaram um aumento gradativo do teor de umidade chegando a um incremento de aproximadamente 69% no tempo 120 dias, que se manteve constante nos tempos 150 e 180 dias.

Tabela 13: Teor de umidade do EBM no teste de estabilidade acelerada.

Tempo (dias)	Umidade (%) *
0	6,55 ± 0,12
15	6,29 ± 0,16
30	6,98 ± 0,18
60	9,89 ± 0,17
90	9,48 ± 0,05
120	11,31 ± 0,26
150	11,85 ± 0,54
180	11,07 ± 0,55

* resultados expressos como média ± desvio padrão.

Após 90 dias foi observado, um aumento da acidez de EB enquanto o EBM manteve-se constante até o tempo 180, no qual foi observado um aumento da acidez (tabela 14).

Tabela 14: Valores de pH de EB e EBM no teste de estabilidade acelerada.

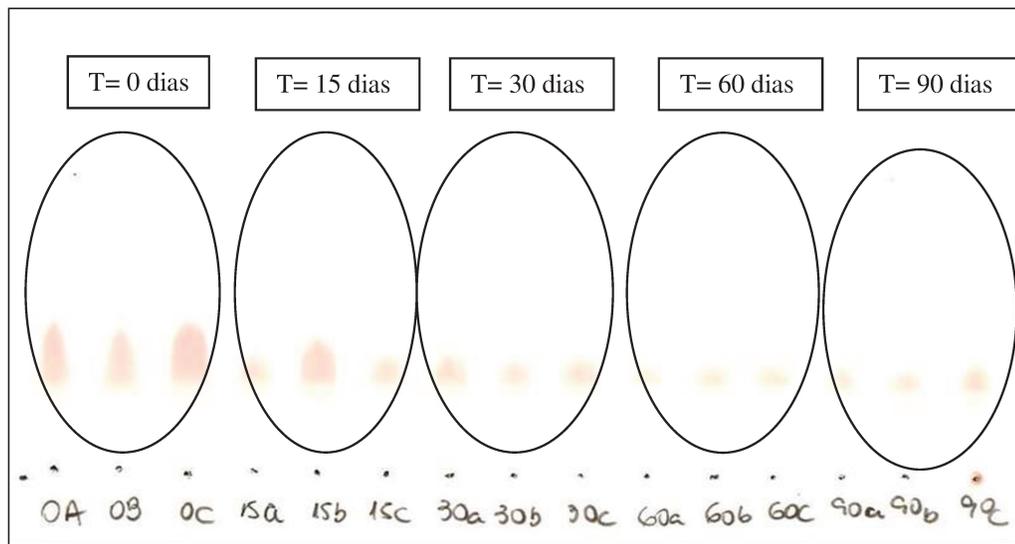
Amostras	pH Inicial	pH 90	pH 180
EB	6,5	4,80	n.d.*
EBM	5,88	5,80	4,95

*n.d.= não determinado

3. 2. Análise de EB e EBM por Cromatografia

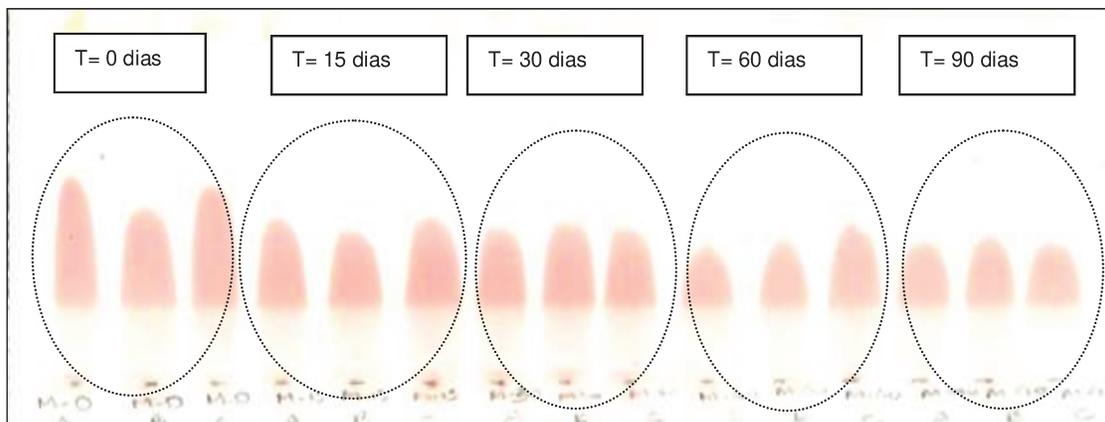
A análise qualitativa por CCD (Figura 25) das amostras de EB e EBM corrobora com o resultado visual (Figura 24), através da observação da diminuição da intensidade da coloração vermelha com o aumento do tempo de exposição.

Figura 25: Cromatograma por CCD do EB após 90 dias do teste de estabilidade acelerada.



Legenda: EB mantido em câmara climatizada a 40°C e 75% de umidade, por 90 dias. O material submetido ao processo de limpeza em EFS usando cartucho C-18, avolumado para 10mL em balão volumétrico. Aplicação de 10 μ L, com micro-seringa. Fase móvel: BAW (5:4:1, Butanol:H₂O:Ác. acético), sem revelação.

Figura 26: Cromatograma por CCD do EBM após 90 dias do teste de estabilidade acelerada.



O material submetido ao processo de limpeza em EFS usando cartucho C-18, avolumado para 10mL em balão volumétrico. Aplicação de 10 μ L, com micro-seringa. Fase móvel: BAW (5:4:1, Butanol:H₂O:Ác. acético), sem revelação.

Para evidenciar quantitativamente essa variação nos compostos responsáveis pela coloração vermelha de EB e EBM, evidenciada pela análise por CCD, foi realizada a quantificação das 3- deoxi-antocianidinas nas amostras de EB e EBM submetidas ao teste de estabilidade acelerada por HPLC-DAD, através do método de padrão secundário (carajurina) (Figuras 27, 28 e 29).

Figura 27: Curva de calibração do 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavínio (m/z 301).

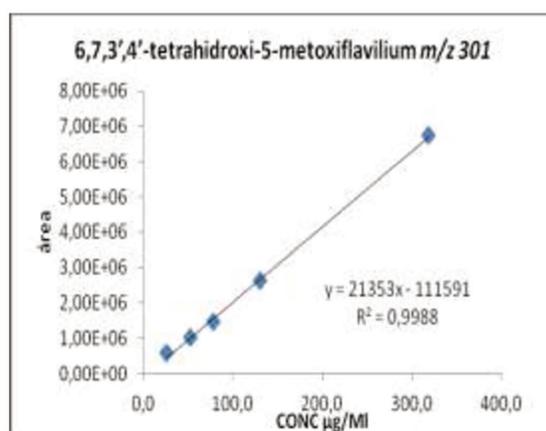


Figura 28: Curva de calibração do 6,7trihidroxi-5-metoxiflavínio (m/z 285).

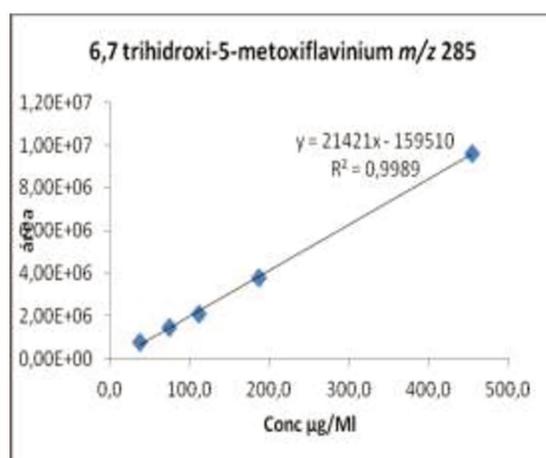
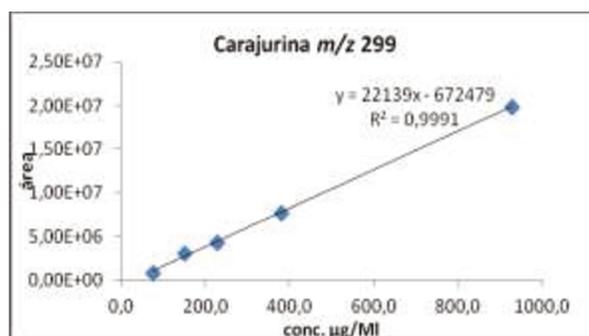


Figura 29: Curva de calibração do carajurina (*m/z* 299).

Os resultados obtidos nas análises por HPLC-DAD para as amostras de EB e EBM (estudo de estabilidade do tempo 0 ao 90 dias) estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Teor relativo das três deoxiantocianidinas nas amostras de EB e EBM[#] no teste de estabilidade acelerada.

Tempo (dias)	EB (%p/p) *			EBM (%p/p) *		
	<i>m/z</i> 301	<i>m/z</i> 285	<i>m/z</i> 299	<i>m/z</i> 301	<i>m/z</i> 285	<i>m/z</i> 299
0	5,6 ±1,1	15,1±2,8	22,9±3,7	5,10±0,12	12,70±0,32	19,2±0,4
15	2,5±0,7	7,4±2,3	15,9±4,3	5,00±0,02	11,60±0,07	17,4±0,1
30	2,0 ±0,2	5,8±0,6	13,5±1,2	4,30±0,03	10,00±0,08	14,40±0,05
60	1,50±0,08	4,3±0,3	11,3±0,5	3,45±0,03	8,00±0,07	12,50±0,06
90	1,30±0,07	3,7±0,4	11,5±0,9	2,85±0,02	6,40±0,06	12,42±0,09
180	n.d.	n.d.	n.d.	n.q.	n.q.	6,72±0,03

* resultados expressos como média ± desvio padrão; # (20% aproximadamente do extrato bruto); n.d. = não determinado por insolubilidade da amostra; n.q. = concentração abaixo do limite de quantificação.

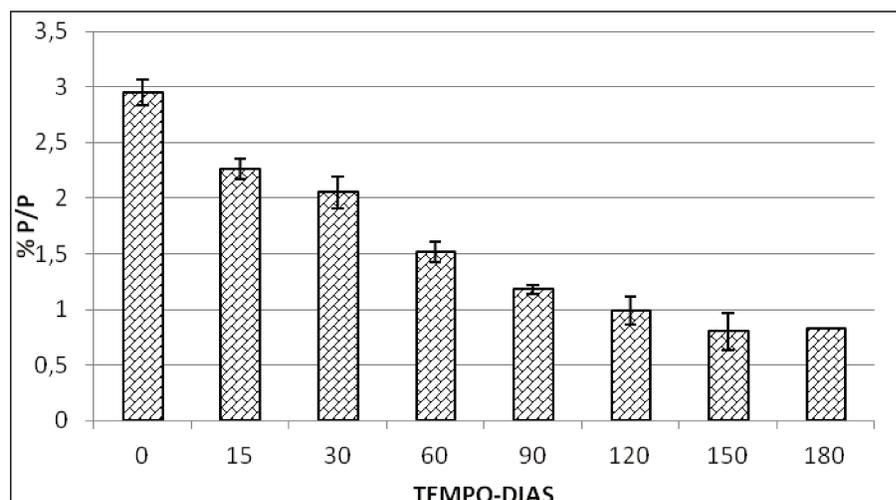
A amostra de EB, após 90 dias na câmara, apresentou redução do teor de 6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavilium *m/z* 301 em aproximadamente **77%**, de 6,7-trihidroxi-5-metoxiflavilium *m/z* 285 em **75,5%** e de carajurina *m/z* 299 em **50%**. Ou seja, houve uma maior queda na concentração dos compostos *m/z* 301 e 285. Em contra partida, a amostra

de EBM, após o mesmo período na câmara, apresentou redução do teor de 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium m/z 301 em aproximadamente **46%**, 6,7-trihidroxi-5-metoxiflavilium m/z 285 em **50%** e de carajiruna m/z 299 em **35%**.

Estes resultados demonstraram que o processo de microencapsulamento foi capaz de proteger, ainda que parcialmente, a degradação das três deoxiantocianidinas identificadas. Foi interessante observar também, que das três, a carajiruna foi a que sofreu menor redução de teor, quando exposta às condições drásticas de temperatura e umidade. Aliada a uma perda menor no teor das deoxiantocianidinas, o EBM apresentava um aspecto físico melhor ao final dos 90 dias, como descrito no item 2.1. (Análises Físico-químicas).

Até o tempo 90 dias de exposição em câmara climática, a 40°C e 75% de umidade, foi possível realizar a análise das deoxiantocianidinas do EB por HPLC-DAD. Porém nos tempos 120, 150 e 180 dias, a contração do extrato foi intensificada, impossibilitando a diluição do mesmo para tal análise. Por outro lado, foi possível realizar esta análise para o EBM nos tempos 120, 150 e 180 dias e os resultados obtidos indicaram que as deoxiantocianidinas 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium m/z 301 e 6,7-trihidroxi-5-metoxiflavilium m/z 285 estavam em concentração do limite de quantificação do protocolo desenvolvido. Desta forma, apenas o teor de carajiruna no EBM foi determinado nesses tempos (Tabela 15, Figura 30).

Figura 30: Avaliação do teor de carajiruna nas amostras de EBM do teste de estabilidade acelerada.



Observou-se que após 4 meses de exposição (120 dias) às condições de 40°C e 75% de umidade, houve perda de 65% do teor de carajiruna presente no EBM, e que este teor se manteve constante (35%) no EBM até o final do experimento (tempos 150 e 180 dias) (Figura 30).

Estes resultados demonstraram que o processo de microencapsulamento foi capaz de proteger, ainda que parcialmente, a degradação da carajiruna em análise. Assim, a fim de aumentar ainda mais a estabilidade desse extrato, seria importante também averiguar a influência de outras formas de embalagem, incluindo a aplicação de vácuo.

2.3. Análise Farmacológica - Úlcera Gástrica Induzida por Etanol/HCL

Para garantir a reprodutibilidade do teste, optou-se pela alteração do agente ulcerogênico Etanol absoluto por Etanol 60%/HCl 150 mMOL (Donatini *et al*, 2009). Por se tratar de um teste rápido, optou-se por esta análise *in vivo* a fim de avaliar como a exposição em câmara climática influenciaria na atividade biológica de EB e EBM. Assim, as alíquotas de EB e EBM retiradas da câmara climática, e armazenadas em freezer -20°C, nos tempos 0, 30, 90, 120, 150 e 180 dias, foram avaliadas quanto à sua capacidade antiulcerogênica, nas doses de 100, 300 e 1000 mg/Kg. Após o cálculo do Índice de Lesão Ulcerativa (ILU) para cada grupo experimental, fez-se uma análise comparativa da Dose Efetiva, de cada amostra, necessária para reduzir em 50 % o ILU (DE₅₀). A Tabela 16 apresenta os valores de DE₅₀ obtidos para as amostras EB e EBM nos tempos 0, 30, 90, 120, 150 e 180 dias.

Tabela 16: Valores de DE₅₀ (mg/Kg) de EB e EBM do teste de estabilidade acelerada.

Tempo (dias)	DE ₅₀	
	EB (mg/Kg)	EBM (mg/Kg)
0	170	104
30	886	114*
90	>1000	220*
120	>1000	221*
150	>1000	220*
180	>1000	221*

Teste de Duncan (*p<0,01)

A variação da DE₅₀ ao longo dos tempos revelou uma diferença significativa na quantidade de EB necessário para inibir em 50% o ILU, com o EB tornando-se inativo a partir do tempo 90 dias. Por outro lado, a atividade antiulcerogênica do EBM foi oito vezes mais potente que o EB após 30 dias na câmara. A partir de 90 dias, o EBM precisou do dobro da dose inicial para reduzir em 50% a incidência de lesões ulcerativas e esse efeito foi mantido até o tempo final de 180 dias na câmara climática (Tabela 16).

A análise dos dados de atividade antiulcerogênica, juntamente com os dados analíticos, demonstrou que o processo de microencapsulamento foi capaz de proteger não apenas as três antocianidinas empregadas como marcadores químicos, mas também os demais componentes do extrato, preservando a ação farmacológica.

3. Mecanismo de ação da atividade antiulcerogênica.

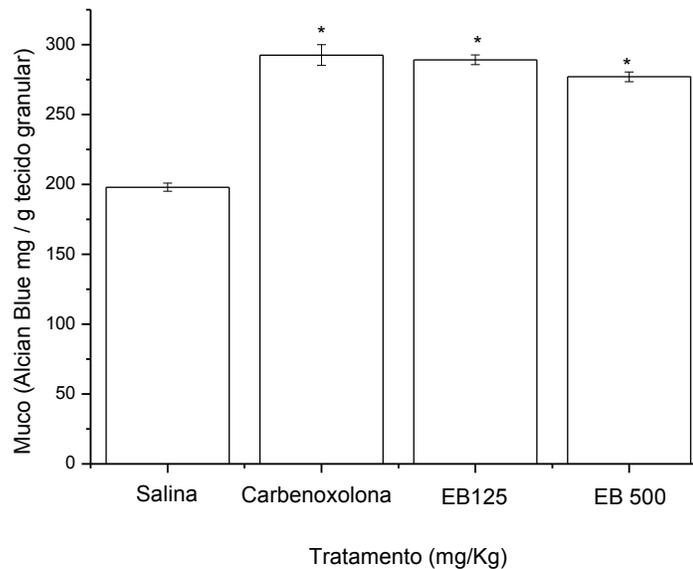
Em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos, o EB nas doses de 100, 300 e 1000 mg/Kg reduziu o índice de lesões ulcerativas, apresentando DE₅₀ de 125 mg/Kg. A fim de elucidar os mecanismos de ação antiulcerogênica, foram realizados estudos envolvendo algumas vias de citoproteção gástrica. Primeiramente foi avaliada a participação do óxido nítrico, substância endógena que aumenta a resistência da mucosa por promover vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo local (Arrieta *et al*, 2003). Verificou-se também a interferência dos grupos sulfidril não proteicos da mucosa, que promovem diminuição do aumento da permeabilidade vascular e impedem a ação de radicais livres sobre a mucosa. (Popovic, 2009). 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).

Assim, em modelo de úlcera induzida por etanol, em ratos tratados previamente com L-NAME (inibidor inespecífico de NO-sintase), N-etilmaleimida (NEM, agente alquilante de grupos sulfidril) e indometacina (anti-inflamatório não esteroide, que inibe a ciclooxigenase e conseqüentemente a síntese de prostaglandinas), o EB manteve a ação antiulcerogênica, sugerindo que o seu mecanismo não está relacionado com a liberação de óxido nítrico, aumento de radicais sulfidrilas ou de prostaglandinas (Jorge, 2008).

O muco produzido pelo estômago é outro processo de citoproteção contra o ácido clorídrico ambiente estomacal, pois forma uma barreira física que impede o contato do suco digestivo com a superfície mucosa. Essa barreira recebe ainda a colaboração do bicarbonato secretado pelo epitélio, neutralizando o ácido presente nas proximidades da mucosa, aumentando essa barreira contra a autodigestão (Allen & Flemström, 2005). A importância do muco como fator protetor da mucosa gástrica se deve também à presença de glicoproteínas, que atuam como antioxidantes reduzindo os danos à mucosa provocados por radicais livres (Repetto & Llesuy, 2002).

Em modelo experimental para quantificação de muco em ratos, o EB, na dose de 125mg /Kg, foi capaz de elevar a produção de muco em 46% quando comparado com o controle negativo (NaCl 0,9%), apresentando atividade semelhante ao controle positivo (carbenoxolona, 47,75%) (Figura 31).

Figura 31: Dosagem de muco em modelo de úlcera induzida por etanol



Tratamento: EB (125 e 500 mg/Kg), Carbenoxolona (200 mg/Kg), Salina (Na Cl 0.9%). Teste de Duncant

* $p < 0,01$.

Nos estudos sobre atividade antiulcerogênica, uma possível inibição da secreção de ácido é fator importante, pois níveis elevados de ácido podem sobrecarregar os mecanismos de defesa da mucosa, propiciando a formação de úlceras (Shubert, 2011). Em modelo

experimental de ligadura de piloro em ratos, o EB, administrado nas doses de 125, 250 e 500mg/Kg, reduziram o volume e a acidez (total e livre) do conteúdo gástrico, de forma não dependente da dose (Tabela 17). Estes resultados sugeriram uma potencial atividade antissecretória do EB.

Tabela 17: Avaliação da atividade antissecretora de EB.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Volume (mL)	pH	[H ⁺] (mEqg/L/4h)
Salina		9,32±2,10	1,85±0,18	0,010±0,004
Cimetidina	100	3,76±0,15***	4,56±0,37***	0,0012±0**
EB	125	3,50±0,50***	3,2±0,55*	0,0044±0,002*
EB	250	4,80±0,43***	2,6±0,17	0,00262±0**
EB	500	3,60±0,20***	3,0±0,23*	0,00204±0**

A secreção ácida gástrica é regulada pelas vias fisiológicas da célula parietal, que incluem o envolvimento do sistema nervoso central, o sistema nervoso entérico e células neuroendócrinas e imunes, que atuam na modulação parácrina e hormonal (Figura 28). A interação da histamina, gastrina e acetilcolina com seus receptores nas células parietais são os principais responsáveis pela ativação da bomba de prótons, que secreta H⁺ diminuindo o pH ácido do suco gástrico. Assim, uma ação inibidora do EB em qualquer nível da estimulação da secreção ácida, poderia atuar como redutor dos fatores agressores da mucosa, resultando em maior proteção gástrica. Na tentativa de compreender a atividade antissecretória apresentada pelo EB, foi realizada a mesma técnica de determinação da secreção ácida gástrica, em ratos com piloro ligado por quatro horas, porém na presença dos secretagogos histamina (ação sobre receptores H₂), pentagastrina (ação sobre receptores CCK₂ de gastrina) e betanecol (ação em receptores M₃ de acetilcolina) (Twardowschya *et al*, 2008, Monteiro *et al*, 2013).

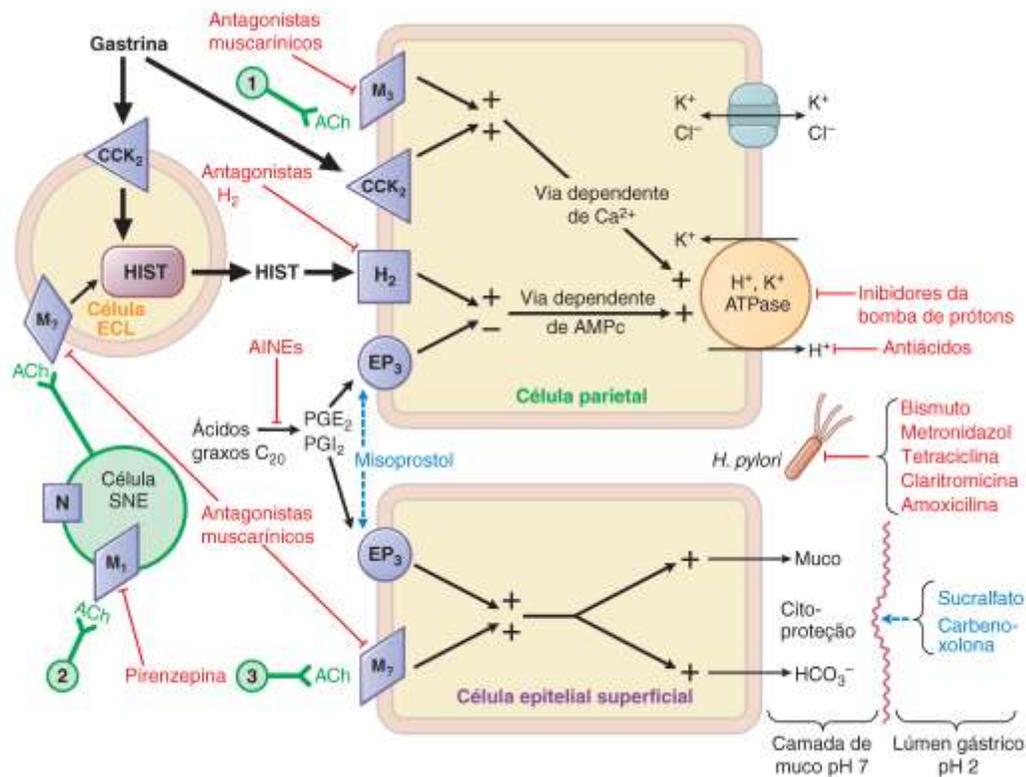
O pré-tratamento intraduodenal com EB (125mg/Kg) não foi capaz de impedir o efeito estimulante da histamina com relação ao volume de secreção gástrica e acidez (total e livre). Entretanto, nos testes com estimulação por betanecol e pentagastrina, o EB (125 mg/Kg) foi capaz de bloquear o aumento do volume de secreção e acidez (total e livre) produzido por estes secretagogos (Tabela 18).

Tabela 18: Ação de EB sobre as vias da atividade secretora.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Volume (mL)	pH	[H ⁺] (mEqg/L/4h)
Salina		9,32±2,10	1,85±0,18	0,010±0,004
Cimetidina	100	3,76±0,15***	4,56±0,37***	0,0012±0**
EB	125	3,50±0,50***	3,2±0,55*	0,0044±0,002*
EB	250	4,80±0,43***	2,6±0,17	0,00262±0**
EB	500	3,60±0,20***	3,0±0,23*	0,00204±0**

Ao analisar a regulação fisiológica e farmacológica da célula parietal (Fígura 32) observamos que quando ativadas a via dos receptores muscarínicos (M₃) e colecistocinina 2 (CCK2), ambos atuam na mesma via de ação ativando fosfolipase C que sinaliza os segundos mensageiros IP3 e DAG que atuam na via dependente de Ca²⁺.

Os resultados obtidos nesses estudos sugerem que a ação protetora gástrica em ratos do EB é consequência do estímulo à produção de muco, aliado à redução da secreção ácida gástrica. Entretanto, outros modelos experimentais, tais como a influência sobre a atividade da bomba de próton, são necessários a fim de melhor elucidar a participação dos receptores muscarínicos e colecistocinina 2 (CCK2) na atividade farmacológica observada.

Figura 32: Regulação fisiológica e farmacológica da secreção gástrica.

(Fonte: Goodman & Gilman, 2012)

4. Teste de toxicidade 28 dias

Estudos pré-clínicos para avaliar a segurança dos produtos de origem vegetal são geralmente realizada em animais de laboratório. Há uma forte correlação entre os efeitos toxicológicos em ratos e seres humanos. (Mafioleti *et al*, 2013)

Neste teste de toxicidade, em doses repetidas durante 28 dias, em roedores, foram avaliados os efeitos sistêmicos após administração oral diária do EB na dose de 300mg/Kg (10 fêmeas e 10 machos); comparativamente ao grupo controle que recebeu o veículo (NaCl 0,9%, 10mL/Kg, 10 fêmeas e 10 machos) e ao grupo satélite (sem tratamento, 10 fêmeas e 10 machos).

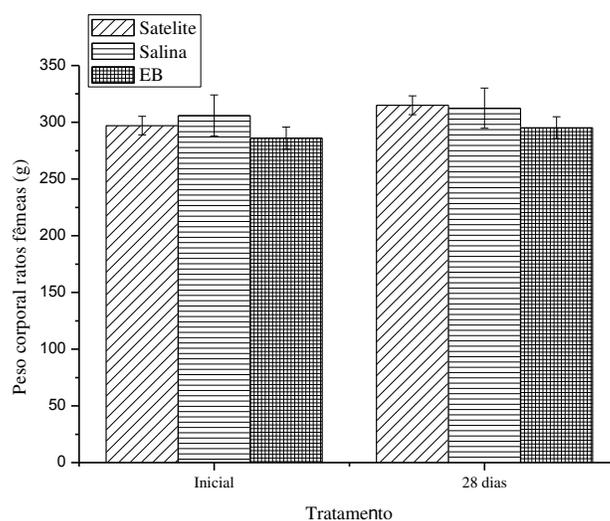
O grupo satélite é importante, pois os animais experimentais podem se comportar de modo diferente, dependendo das condições a que são submetidos, sendo também passíveis de sofrerem influência de fatores ecológicos, característicos de cada região do planeta. Neste contexto, é necessário que cada laboratório ou biotério estabeleça um conjunto próprio

de valores de referências dos animais, de acordo com linhagem, sexo, e idade. O conhecimento destes parâmetros é importante na pré-seleção de animais, na avaliação e observação dos resultados, nos procedimentos experimentais e na análise das modificações induzidas por processos patológicos (Castello Branco *et al*, 2011).

4.1. Evolução de Peso Corporal

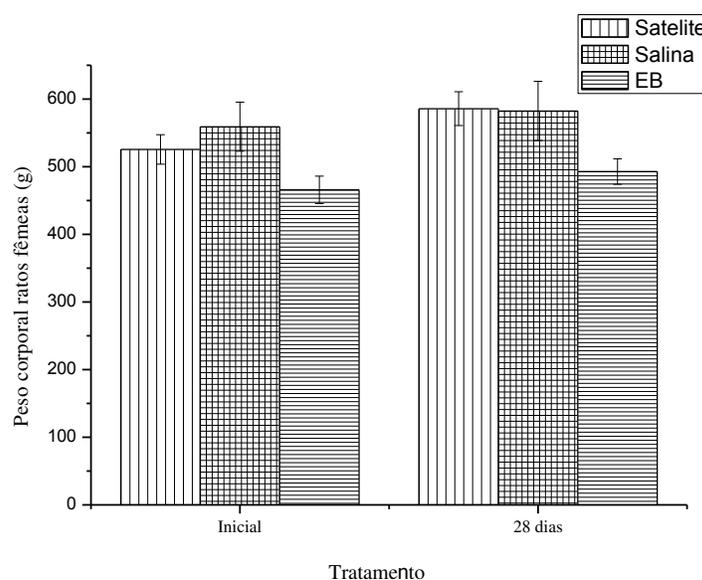
A avaliação da evolução de peso corporal das e fêmeas e dos machos não revelou quaisquer diferenças entre os grupos experimentais (Figuras 33 e 34).

Figura 33: Efeito da administração de EB (v.o., 28 dias) sobre a evolução de peso corporal em ratos *Wistar* adultos fêmeas.



Tratamento: EB (300mg/Kg), Salina (NaCl 0.9%) e Satélite (sem tratamento). Teste de Duncan (Inicial: $p > 0.05$ e 28 dias: $p > 0.05$).

Figura 34: Efeito da administração oral repetida (28 dias) do extrato bruto de *Arrabidaea chica* (EB) sobre a evolução de peso corporal animal em ratos *Wistar* adultos machos.



Tratamento: EB (300mg/Kg), Salina (NaCl 0.9%) e Satélite (sem tratamento). Teste de Duncan (Inicial: $p > 0.05$ e 28 dias: $p > 0.05$).

4.2. Parâmetros Hematológicos

Os valores normais e os possíveis desvios do número de células e as taxas dos componentes não celulares do sangue são critérios importantes para avaliar a extensão da homeostase, as alterações resultantes de processos patológicos e da singularidade dos dados obtidos a partir de procedimentos experimentais.

No grupo “Satélite”, os parâmetros hematológicos mantiveram-se dentro de faixas aceitáveis para todos os animais pertencentes ao grupo “satélite”, com valores dentro da faixa de “normalidade” descrita para ratos *Wistar* adultos (Evans, 2009). Nos animais dos grupos “Veículo” e machos tratados com EB não foram observadas alterações relevantes enquanto no grupo de fêmeas tratadas com EB foi observado leucopenia em 4 animais (40% do total), entretanto na análise comparativa entre os grupos, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 19).

Ribeiro *et al* (2012), ao avaliarem os efeitos dos extratos aquoso e etanólico das folhas de *A. chica*, coletada em Maringá, Paraná, em tumor sólido de Ehrlich, em camundongos

Swiss fêmeas, relataram que o tratamento com dose de 30 mg/kg, via oral, durante 10 dias, não provocou leucopenia. Porém, além da dose empregada ter sido menor com tempo de tratamento mais curto, Ribeiro *et al* (2012) utilizaram uma técnica de extração diferente daquela utilizada neste trabalho. Por outro lado, Mafioletti *et al* (2013) avaliaram os parâmetros hematológicos do extrato bruto hidroalcoólico de *A. chica*, após tratamento diário, via oral, durante 30 dias, nas doses de 200 mg/kg e 500 mg/kg. Estes autores observaram leucocitose na dose de 200 mg/kg ($p < 0,05$) sem especificar se eram animais machos ou fêmeas. Desta forma, estudos complementares de toxicidade hematológica serão necessários para avaliação da contagem diferencial de leucócitos.

Tabela 19: Parâmetros hematológicos de ratos *Wistar* (machos e fêmeas) após 28 dias de tratamento com EB.

Grupo	Tratamento	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Machos	Satélite	8,5 ± 0,4	8,7 ± 0,1	16,2 ± 0,3	46,1 ± 0,4	52,6 ± 0,3	18,5 ± 0,4	35,1 ± 0,6	825 ± 33
	Veículo	7,7 ± 0,5	9,2 ± 0,2	17 ± 2	45,7 ± 4,6	54,0 ± 0,3	18,1 ± 0,1	33,5 ± 0,2	873 ± 38
	EB	8,3 ± 0,5	9,0 ± 0,1	16,0 ± 1,3	47,2 ± 0,4	52,73 ± 0,25	18,12 ± 0,21	34,00 ± 0,11	884 ± 25,2
Fêmeas	Satélite	5,5 ± 0,5	8,0 ± 0,1	15 ± 2	44,1 ± 0,5	55,42 ± 0,31	19,50 ± 0,12	35,1 ± 0,12	771,6 ± 27,3
	Veículo	5,5 ± 0,4	8,2 ± 0,1	15,3 ± 1,8	44,9 ± 0,6	54,33 ± 0,22	18,60 ± 0,14	34,22 ± 0,14	900,50 ± 37,6
	EB	4,4 ± 0,7	8,0 ± 0,1	15 ± 2	44,0 ± 0,6	54,84 ± 0,27	18,83 ± 0,14	34,36 ± 0,13	884,30 ± 25,2

Valores considerados a média ± erro padrão médio.

Legenda: WBC - contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RBC – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados; PLT – contagem total de plaquetas.

4. 3. Parâmetros Bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos (enzimas, lipídeos e hormônios) avaliam a funcionalidade e a integralidade de órgãos e tecidos, podendo indiciar patologias relacionadas a toxicidade de uma amostra (Mafioleti *et al*, 2013)

4.3.1. Metabolismo de lipídeos

Todos os animais dos grupos Satélite, Veículo e EB apresentaram valores plasmáticos de triglicérides e colesterol total dentro da normalidade sugerindo que o EB não interfere no metabolismo lipídico (Tabela 20).

Tabela 20: Parâmetros bioquímicos referentes ao metabolismo de lipídeos de ratos *Wistar* (machos e fêmeas) após 28 dias de tratamento com EB.

Grupo	Tratamento	Triglicérides (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)
Machos	Satélite	92,4±8,13	<100
	Veículo	174±12,9	105±1,45
	EB	161±8,6	104±1,5
Fêmeas	Satélite	<70	<100
	Veículo	112±6,2	107±2,25
	EB	97,50±6,3	104±1,26

Valores de referência: Triglicérides (20-200 mg/dL) e Colesterol (100-240 mg/kg) (Evans 2009).
Valores considerados a média ± erro padrão médio.

1.3.2. Metabolismo de enzimas hepáticas:

Os animais (machos e fêmeas) do grupo Satélite apresentaram significativa elevação dos níveis plasmáticos de AST, enquanto os animais (machos e fêmeas) dos grupos Salina e EB apresentaram valores AST semelhantes entre si e mais baixos do que os observados para o grupo Satélite (Tabela 21). Além disso, os valores de AST para os grupos Salina e EB foram próximos aos valores da literatura (Evans, 2009).

A elevação dos níveis sérico-enzimáticos atribuídos à disfunção hepática pode ser decorrente da ruptura dos hepatócitos, resultantes de necrose, ou das alterações na permeabilidade da membrana celular (ALT, AST e LDH) ou do processo de colestase (FA e GGT) (Kaneko, 1989).

O fato de receber cerca de 80% do seu aporte sanguíneo da veia porta, que drena o tubo digestivo, torna o fígado o órgão mais comum da agressão tóxica. Outra razão da susceptibilidade hepática a agentes tóxicos encontra-se na sua função de biotransformação, ou seja, alterar substâncias exógenas e metabolizar substâncias endógenas (Maclachlan & Cullen, 1998). Existe, ainda, maior propensão hepática a sofrer lesões por exposições crônicas, porque, frequentemente, a exposição tóxica aguda geralmente causa óbito, antes mesmo de haver destruição hepática (Pearson, 1993). Lesões dos hepatócitos podem resultar na liberação de enzimas para a circulação, ou na incapacidade de sua produção ou excreção (Pearson, 1993). Tal liberação, entretanto, não é, necessariamente, consequência da morte do hepatócito; um curto período de hipóxia é suficiente para alterar a integridade da membrana celular, permitindo a liberação das enzimas para o plasma (Kaneko, 1997). Já a diminuição da atividade enzimática não representa significado clínico (Bush, 1991), exceto em casos de degeneração celular grave, quando ocorre perda da função celular.

No estudo realizado por Mafioleti *et al* (2013), estes autores não observaram diferença nas enzimas hepáticas entre os grupos veículo e tratados com extrato hidroalcoólico de *Achica*, nas doses de 200 mg/kg e 500 mg/kg. As variações nos níveis séricos das enzimas utilizadas para avaliação de atividade hepática entre diferentes autores podem estar relacionadas com diferenças metodológicas tais como kits comerciais, aparelhagem usada para as dosagens e métodos de coleta de sangue e obtenção do soro, que são consideradas variáveis pré-análise (Borsa *et al*, 2006).

Tabela 21: Parâmetros bioquímicos referentes ao metabolismo hepático de ratos Wistar (machos e fêmeas) após 28 dias de tratamento com EB.

Grupo	Tratamento	AST (UI/L)	ALT (UI/L)	GGT (UI/L)	FA (UI/L)
Machos	Satélite	310,9 ± 17,5	32,40±1,65	<5	61,10±1,86
	Veículo	94,4 ± 9,8*	42,95±3,51	<5	133,64±10,1
	EB	111,3 ± 6,5*	40,77±3,45	<5	87±14,7
Fêmeas	Satélite	202,2 ± 9,7	25,00±1,77	<5	30,10±3,15
	Veículo	111,3 ± 6,5*	40,78±3,46	<5	86,88±14,7
	EB	96,8 ± 7,2*	42,32±2,65	<5	83,48±14,8

*P<0,001 em relação ao grupo satélite. Valores de referência: AST (20-108 UI/L), ALT (16-56 UI/L), GGT(0,5-5,25 UI/L), FA (95-611 UI/L) (Evans 2009). Valores considerados a média ± erro padrão médio.

Legenda: Transaminase oxalacética (*AST-aspartate aminotransferase*); Aminotransferase glutâmico-pirúvica (*ALT-alanine aminotransferase*); Gama-glutamil transferase (*GGT-gamma glutamyl transpeptidase*) FA-fosfatase alcalina.

1.3.3. Indicadores enzimáticos de injúria renal

Não foram observadas alterações significativas nos parâmetros relacionados à função renal (creatinina e ácido úrico sérico) após o tratamento com EB quando comparado aos grupos “satélite” e “veículo” (Tabela 22). Além disso, os animais utilizados neste estudo apresentaram valores basais de ácido úrico acima dos relatados na literatura (Evans, 2009), o que pode provavelmente estar relacionada com teores elevados de proteína na ração.

Tabela 22: Parâmetros bioquímicos referentes ao metabolismo renal de ratos Wistar (machos e fêmeas) após 28 dias de tratamento com EB.

Grupo	Animal	Creatinina (mg/dL)	Ácido úrico (mg/dL)
Machos	Satélite	0,51±0,008	4,24±1,81
	Veículo	0,53±0,006	2,00±0
	EB	0,52±0,027	2,46±0,11
Fêmeas	Satélite	0,54±0,19	2,10±0,05
	Veículo	<0,5	<2,0
	EB	0,59±0,035	2,47±0,12

Valores de referência: Creatinina (0,22-84 mg/dL), Ácido úrico (0,89-1,82 mg/dL) (Evans 2009). Valores considerados a média ± erro padrão médio.

Mais ainda, observações clínicas semanais realizadas sob a supervisão da veterinária do laboratório Msc. Karin Maia Monteiro demonstraram que a administração repetida do extrato bruto de *Arrabidaea chica* (dose de 300 mg/kg), por vinte e oito dias, não causou efeitos aparentes sobre o sistema nervoso autônomo e sistema motor e tônus muscular. Ao final do tratamento, foi realizada uma análise macroscópica dos órgãos internos na qual não foram observadas alterações que pudessem estar relacionadas com toxicidade. Para finalizar a análise sobre a toxicidade de doses repetidas de 28 dias, os resultados descritos acima serão comparados com os de análise histopatológica, em andamento, para verificar se as poucas alterações bioquímicas observadas são significativas.

Estas observações associadas à ausência de influencia no ganho de peso dos animais tratados em relação aos grupos-controles (“veículo” e “satélite”) e a não alteração da maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos não foi alterada com a administração repetida da substância-teste sugerem uma baixa toxicidade do EB.

Santos *et al*, 2013, investigou os possíveis efeitos mutagênicos e de genotoxicidade, *in vitro* e *in vivo*, do extrato de *Arrabidaea chica*. O extrato não apresentou mutagenicidade nem genotoxicidade quando avaliado nos testes de micronúcleo, cometa, testes de hipoxantina e xantina oxidase, DPPH e salmonela/microsomo mutagenicidade.

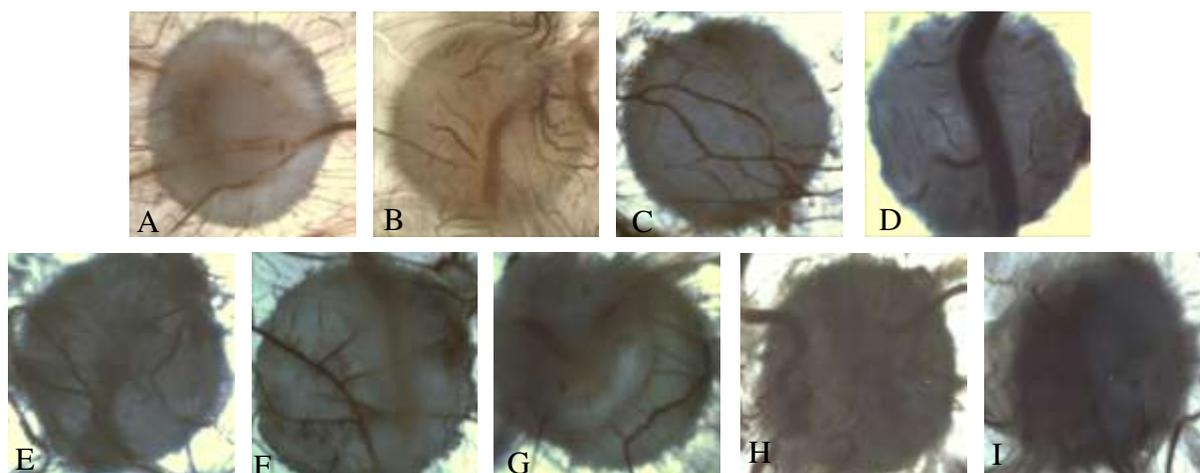
5. Angiogênese

5.1. Teste para a avaliação da atividade sobre a angiogênese em Membrana Coreo Alantóide (MCA).

O EB foi diluído em solução salina atingindo as concentrações de 1, 5, 10, 25, 50, 100 e 500 mg/mL. Desta forma, 3 µL de cada solução foram aplicados sobre a MCA, através dos discos de papel de filtro (n = 8) e os resultados são apresentados nas fotografias obtidas da MCA (Figura 35). Os resultados revelam aumento na vascularização, tanto no grupo controle positivo com o AH 0,5% quanto nas diversas concentrações de EB, quando comparados ao controle negativo (salina estéril). Além do aumento na vascularização, é possível visualizar o

aumento no calibre dos vasos sanguíneos ou expansão do plexo vascular (Carmeliet, 2005), evento que acontece para o brotamento de novos vasos a partir dos mais calibrosos.

Figura 35: Fotografias da membrana coriolantóide (MCA) mostrando a atividadeangiogênica das amostras avaliadas.

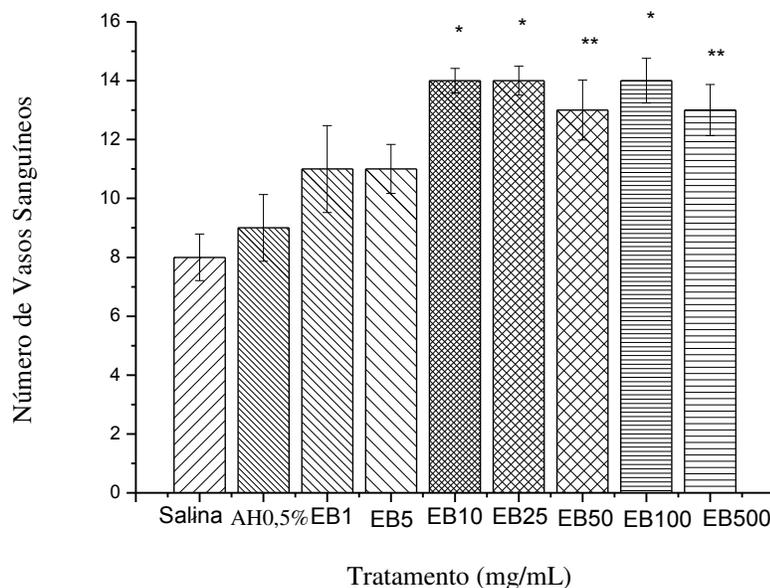


A: Controle negativo absoluto (salina NaCl 0,9%); **B:** AH a 0,5 %; **C:** Atividade da solução 1mg *A. chica* / mL salina; **D:** Atividade da solução 5 mg *A. chica* / mL salina; **E:** Atividade da solução 10 mg *A. chica* / mL salina; **F:** Atividade da solução 25 mg *A. chica* / mL salina; **G:** Atividade da solução 50 mg *A. chica* / mL salina **H:** Atividade da solução 100 mg *A. chica* / mL salina e **I:** Atividade da solução 500 mg *A. chica* / mL salina. Em cada ensaio foram utilizados 40 μ L de cada solução (n = 8). Observa-se a formação de vasos sanguíneos calibrosos.

5.1.1. Contagem macroscópica dos vasos sanguíneos em MCA e análise estatística dos dados.

Através da contagem macroscópica dos vasos sanguíneos, a capacidade de indução da angiogênese pelo ácido hialurônico e pelo EB foi avaliada quantitativamente, onde o aumento no número de vasos sanguíneos foi significativo, exceto nas mais diluídas 1 e 5 mg/mL (Figura 36).

Figura 36: Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos na membrana coriolantóide (MCA).

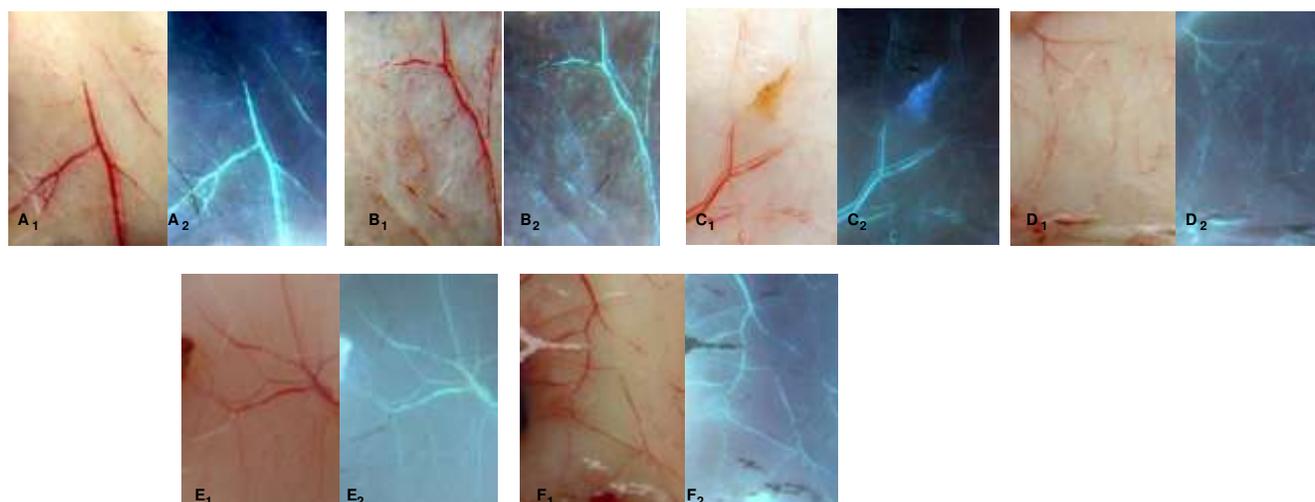


Tratamentos: Controle negativo (salina NaCl 0,9%); controle positivo (AH 0,5 %); EB 1 mg/mL, 5 mg/mL; 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL; 100 mg/mL e 500 mg/mL . * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,05$.

5.2. Avaliação do EB sobre a angiogênese do tegumento do dorso de camundongos.

Quarenta microlitros das diversas soluções de EB (1, 5, 10, 25,mg/mL de salina). foram injetados no tecido subcutâneo do dorso dos camundongos ($n = 10$) e avaliados após 10 dias. Os resultados apresentados nas fotografias obtidas do tegumento do dorso de camundongos demontstram um aumento na vascularização, nas concentrações de EB (Figura 37) quando comparadas ao controle negativo (salina NaCl 0,9%). Ao contrário do encontrado em CAM, apenas as menores concentrações do extrato bruto (1, 5, 10, 25 mg/mL salina) apresentaram aumento na vascularização.

Figura 37: Fotografias do tegumento do dorso de camundongos mostrando a atividade angiogênica das concentrações de *A. chica*.

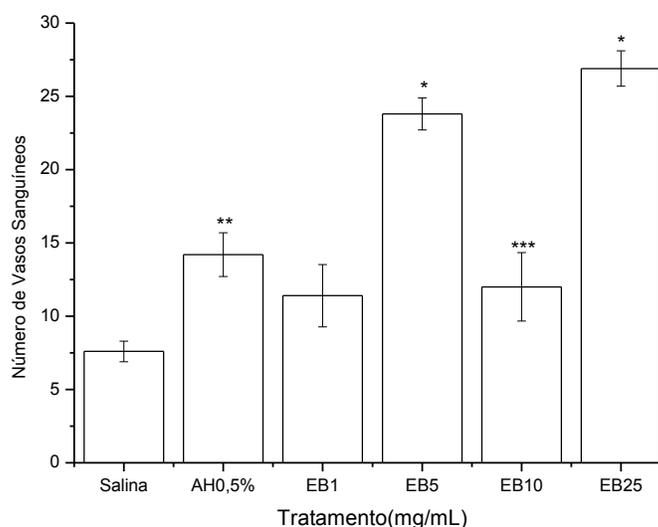


A1 e A2: Controle negativo absoluto (salina NaCl 0,9%); **B1 e B 2:** AH livre a 0,5 %; **C1 e C2:** extrato bruto de *A. chica* 1 mg/mL; **D1 e D2:** extrato bruto de *A. chica* 5 mg/mL; **E1 e E2:** extrato bruto de *A. chica* 10 mg/mL; **F1 e F2:** extrato bruto de *A. chica* 25 mg/mL..Em cada grupo experimental foi aplicada 40 μ L de cada solução (n = 10). Os números 1 e 2 que acompanham as figuras correspondem ao tipo de tratamento realizado nas fotografias para auxiliar a contagem de vasos sanguíneos: brilho e contraste, e negativo (respectivamente). Os números correspondem ao tipo de tratamento nas fotografias: 1 brilho e contraste, e 2 negativo.

5.2.1. Contagem macroscópica dos vasos sanguíneos no tegumento do dorso de camundongos

Quando avaliada quantitativamente a capacidade de indução da angiogênese, caracterizada pelo aumento no número de vasos, foi significativa para o tratamento com ácido hialurônico. Já o tratamento com o EB, o aumento foi significativo em apenas três das diluições avaliadas (Figura 38).

Figura 38: Quantificação macroscópica dos vasos sanguíneos no tegumento do dorso de camundongos dos grupos controles e dos animais tratados com oEB.



Tratamentos: Controle negativo (salina NaCl 0,9%); EB,1, 5, 10 e 25 mg/mL,. * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,05$.

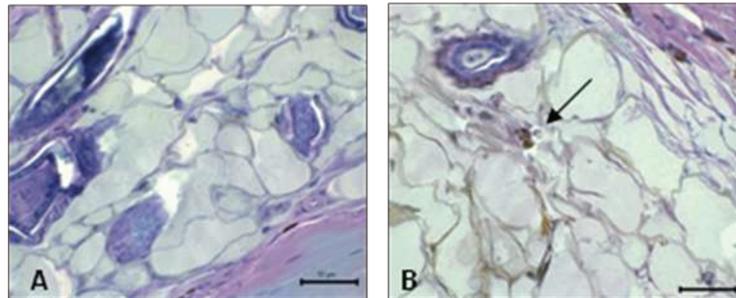
Foi observada diferença entre os dois testes de avaliação da capacidade indutora da angiogênese pelo EB (CAM e tegumento), provavelmente pelo mecanismo de liberação do extrato. No modelo de CAM, como as amostras foram aplicadas sobre um papel filtro, provavelmente houve maior dificuldade para liberação da amostra para a membrana, favorecendo a atividade de extratos mais concentrados, em um curto período de tempo. Já no modelo do tegumento de camundongos, as amostras foram administradas diretamente no tecido subcutâneo, que constitui uma camada de tecido conjuntivo frouxo (Junqueira e Carneiro, 2004) facilitando a atuação de concentrações menores do extrato.

5.2.2. Contagem microscópica dos vasos sanguíneos nos cortes histológicos do tegumento do dorso de camundongos.

Para avaliar o desempenho da atividade angiogênica no modelo do dorso do camundongo, fragmentos do tegumento dos animais tratados com EB 5mg/mL, incluídos em historresina para a confecção das lâminas histológicas, foram avaliados microscopicamente (Figura 39).

Desta forma foi observado um aumento significativo no número de vasos sanguíneos (Tabela 23) quando comparados ao controle veículo (NaCl 0,9%) corroborando com a contagem macroscópica (Figura 39) dos vasos sanguíneos no tegumento do dorso de camundongos.

Figura 39: Cortes histológicos do tegumento do dorso de camundongos.



Grupos avaliados: **A:** Controle negativo absoluto (salina NaCl 0,9%); **B:** *A. chica* 5 mg/mL; As setas indicam vasos sanguíneos.

Tabela 23: Quantificação microscópica dos vasos sanguíneos nos cortes histológicos do tegumento do dorso de camundongos.

	Salina	EB
Vasos		
(números)	8±0,5	22±0,42

Grupos avaliados: Controle negativo absoluto (salina NaCl 0,9%); EB 5 mg/mL; $p < 0,001$.

Os resultados dos testes de angiogênese em CAM e tegumento de camundongos sugerem um efeito angiogênico para o EB que complementam o mecanismo de ação cicatrizante do EB, cujos estudos anteriores já demonstraram uma ação sobre proliferação de fibroblastos *in vitro* e *in vivo* e sobre a síntese de colágeno *in vitro* e *in vivo* (Jorge *et al.*, 2008).

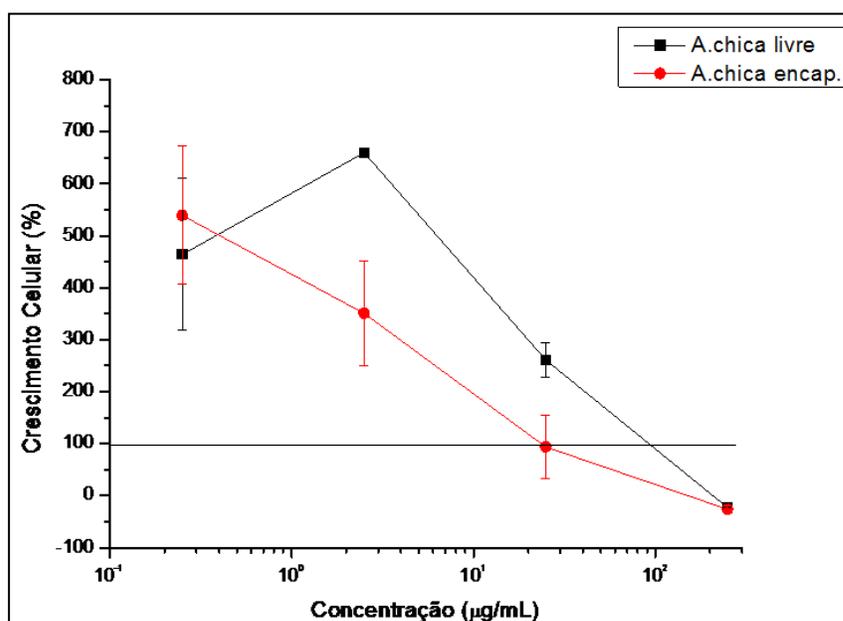
6. Atividade Cicatrizante.

6.1. Teste de Indução de Crescimento de Fibroblastos Dérmicos *in vitro*

Inicialmente foi realizado teste de indução de crescimento de fibroblastos *in vitro* para verificar se o EBM manteve o efeito proliferativo observado para o EB. Além disso, foi avaliada também a atividade da carajurina sobre a proliferação celular também.

Na maior concentração (250 $\mu\text{g/mL}$), ambas as amostras EB e EBM foram tóxicas, resultando em morte celular. A partir da concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, ambas as amostras estimularam o crescimento dos fibroblastos de maneira concentração dependente. Foi interessante observar ainda que o processo de microencapsulamento levou a uma redução do estímulo o que pode ser atribuído à liberação mais lenta do extrato para o meio de cultura (Figura 40).

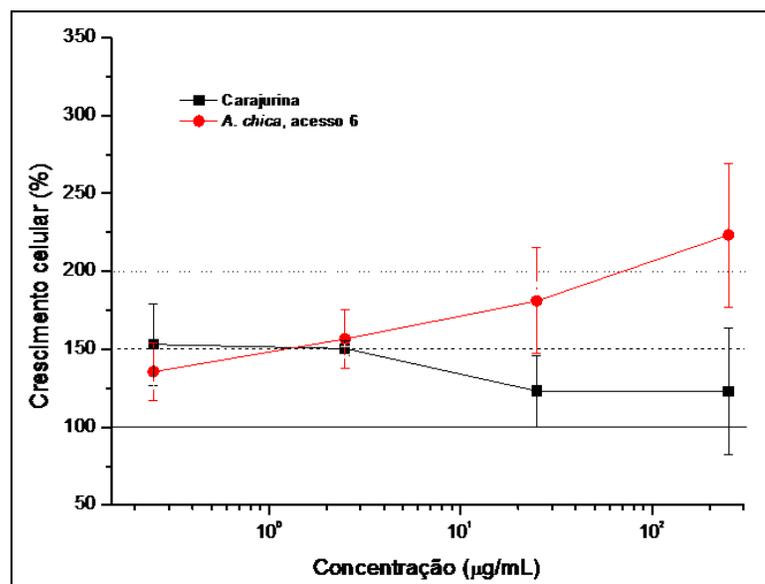
Figura 40: Gráfico de crescimento celular de fibroblasto dérmico humano em função da concentração de EB e EBM.



*linha preta representa EB e linha vermelha EBM

Como observado na Figura 41, a carajurina apresentou um efeito estimulante sobre a proliferação celular menos intenso do que aquele observado para o EB.

Figura 41: Gráfico de crescimento de fibroblastos dérmicos humanos em função da concentração de EB e de carajurina.



*linha preta representa EB e linha vermelha EBM

Esses resultados corroboram com a hipótese de que a atividade cicatrizante do EB está relacionada principalmente com as antocianinas, com pequena participação das agliconas.

2. 2. Atividade Cicatrizante em Ratos diabéticos por estreptozotocina

O diabetes melito é um distúrbio metabólico crônico e complexo caracterizado por comprometimento do metabolismo da glicose e de outras substâncias produtoras de energia, associado a uma variedade de complicações em órgãos essenciais para manutenção da vida. Constitui um importante problema de saúde pública, devido à elevada prevalência e morbimortalidade, além do risco de desenvolvimento de complicações crônicas incapacitantes (como retinopatia, nefropatia, neuropatia e vasculopatia). Soma-se a isso o elevado custo econômico, gerado pelo tratamento e pela redução da capacidade de trabalho de indivíduos em idade produtiva. Globalmente sua prevalência está estimada em 120 milhões de indivíduos, sendo que entre 4 a 10% destes desenvolvem lesões no pé. (Moura *et al*, 2013; Brasileiro *et al* 2005).

No Brasil, um estudo multicêntrico realizado em nove capitais encontrou uma prevalência de 7,6% entre pessoas de 30 a 69 anos de idade, sendo que, destas, quase a metade ainda desconhecia ser portadora da doença, e aproximadamente 25% dos diabéticos previamente diagnosticados não realizavam qualquer tipo de tratamento (Oliveira *et al*, 2009). Em 2010 foi estimado 285 milhões de diabéticos, estima-se que em 2030, 434 milhões de pessoas sejam diabéticas (Moura *et al*, 2013).

Em relação às consequências do diabetes, o pé diabético constitui a complicação mais frequente, com alta taxa de amputação, internação prolongada e custo hospitalar elevado. Nos Estados Unidos, o diabetes é responsável por quase metade das amputações não traumáticas de membro inferior. De etiologia frequentemente multifatorial, caracteriza-se por uma variedade de anormalidades resultante da combinação de neuropatia e/ou vasculopatia em pacientes portadores do diabetes melito. (Brasileiro *et al* 2005; Oliveira *et al* 2009; Moura *et al*, 2013).

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 do pé diabético, acamados, cadeirantes entre outros tem demonstrado resultados promissores. Extratos obtidos de plantas como *Aloe vera*, *Calendula officinales* e *Hamamelis virginiana* são os mais utilizados (Jorge, 2008). Ainda sim a busca de novas opções para o tratamento das ulcerações do pé diabético é necessária em vista da prevalência desta complicação e da baixa eficiência dos tratamentos usuais.

Os trabalhos anteriores demonstraram que o extrato bruto de *A.chica* apresenta atividade cicatrizante *in vitro* e *in vivo* através da indução do crescimento de fibroblastos e síntese de colágeno, motivando a continuidade dos estudos agora em modelos de ratos diabéticos (Jorge *et al.*, 2008). Além disso, o Ministério da Saúde (2009) elaborou uma lista com 71 plantas que poderão gerar produtos para serem usados pelo SUS dentre as quais se encontra a *A. chica*.

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico complexo que envolve ações simultâneas de mediadores, células sanguíneas, matriz extra celular e células parenquimais. Imediatamente após a lesão inicia-se a homeostase/coagulação logo inicia-se a resposta inflamatória, seguida proliferação (formação do tecido de granulação) re-epitelização e remodelamento. A transição entre as fases depende da maturação e diferenciação de

queratinócitos, fibroblastos, macrófagos e mastócitos. Enquanto feridas agudas geralmente progridem linearmente através das diferentes fases do processo cicatrizante, o processo de cura em pacientes diabéticos pode não seguir essa linha do tempo, mas sim resultar em uma ferida crônica. Quando o tecido de granulação é excessivo, pode ocorrer retardamento da cicatrização, prolongando a fase inflamatória, comum na complicação do processo cicatrizante em diabéticos. (Lima *et al*, 2013; Moura *et al*, 2013).

Os modelos de estudos dos diversos aspectos da diabetes podem ser realizados em animais geneticamente modificados ou com o uso de agentes indutores, dentre eles a estreptozotocina (STZ). A STZ é uma nitrosamida de ocorrência natural, isolada de colônias de *Streptomyces achromogenes* e caracterizada como um antimicrobiano de largo espectro, utilizada como indutora de diabetes em animais experimentais, por possuir citotoxicidade específica para células beta das ilhotas de Langerhans. Por isso, essa substância provoca insuficiência insulínica, com uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as primeiras horas de administração, seguida do estabelecimento da diabetes permanente após as 24hs. Esse método químico, apesar de ter um elevado índice de mortalidade relativa, permite a utilização de um grande número de animais, destruindo a parte endócrina do pâncreas, com preservação de sua função exócrina (Lerco *et al* 2003; Delfino *et al*, 2002)

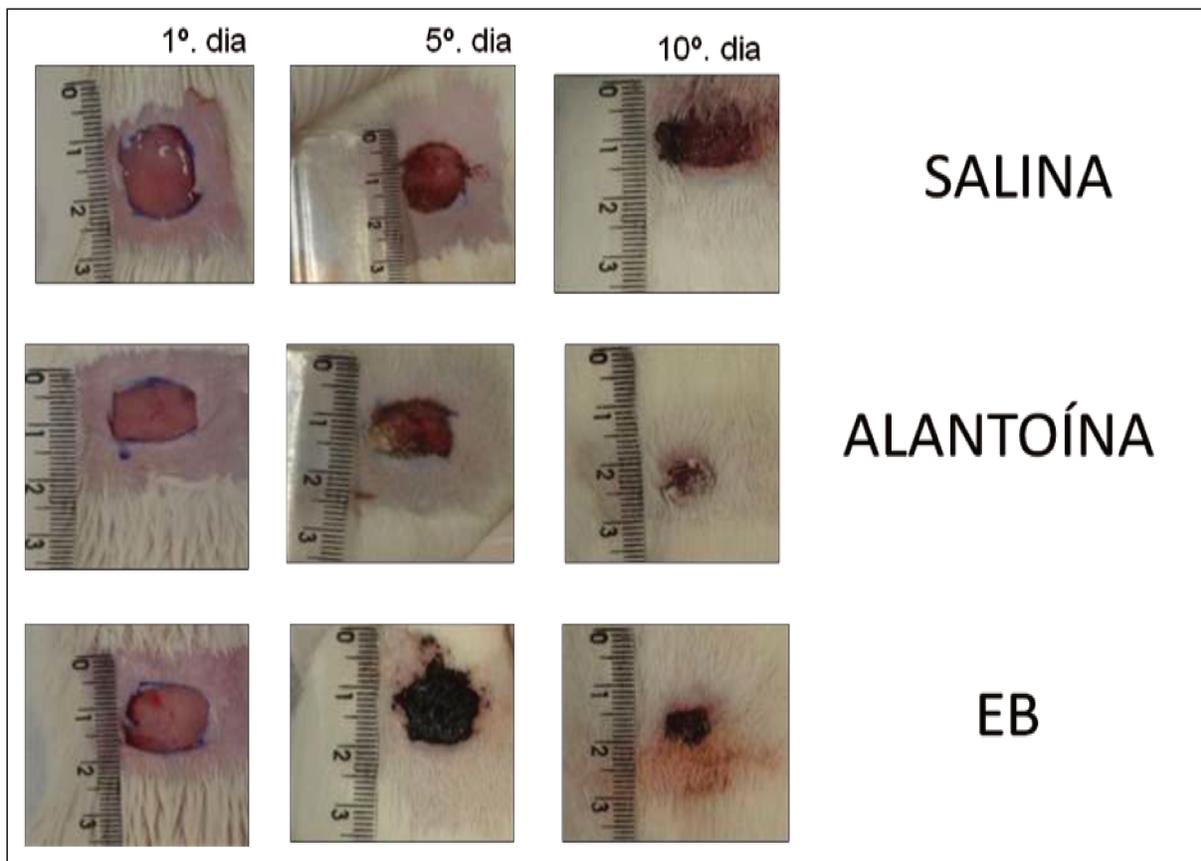
Diversos artigos citam a utilização de STZ como indutora de diabetes em diferentes doses, entre 60 mg/kg e 80 mg/Kg, por via intraperitoneal (i.p.) (Chithra *et al* 1998; Delfino *et al*, 2002; Valcheva-Kuzmanova *et al* 2007; Akbarzadeh *et al* 2007; Kamer *et al* 2010).

Para a indução da diabetes foi utilizada a STZ na dose de 60 mg/kg em 28 ratos Wistar machos pesando em média 200 g com glicemia basal de 92 mg/dL, após jejum de 12 h. Após três dias da administração intraperitoneal de STZ (60 mg/Kg) e 6 h de jejum a glicemia basal dos animais estava em média 434 mg/dL.

A análise macroscópica da evolução do processo cicatricial é essencial quando se trata de um novo produto (Sonnewend, 2013). Durante o experimento, utilizando ratos diabéticos por indução de STZ, foram realizadas, análises clínicas de sinais inflamatórios como edema, exsudato inflamatório e pus, formação de crosta e, medidas diárias utilizando sonda periodontal, durante os 10 dias de experimento, e as feridas fotografadas dos 3 grupos experimentais, salina, alantoína e EB. Nos dois primeiros dias todos os animais estavam com as bordas das feridas edemasiadas, com exsudato inflamatório e pus, porém observou-se a

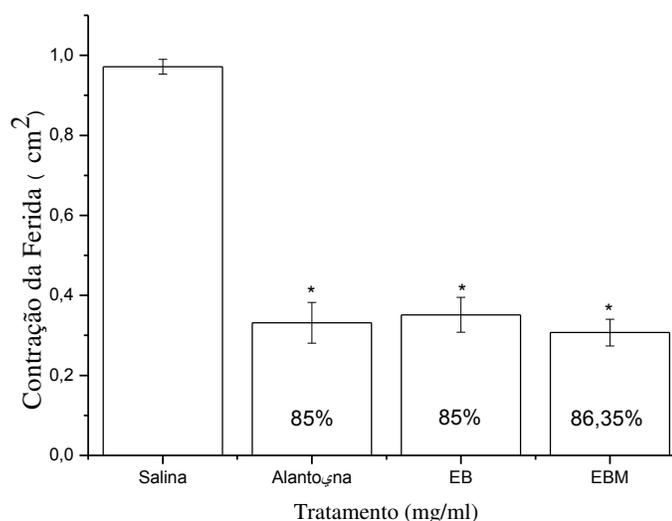
presença de crosta apenas nos grupos tratados com alantoína e EB. A partir do terceiro dia até o sétimo dia foram observados sinais inflamatórios apenas no grupo tratado com salina, com formação de crosta fina no sétimo dia. Na Figura 42 são apresentadas as fotos das feridas nos dias 1, 5 e 10, dos 3 grupos tratados.

Figura 42: Análise macroscópica da contração das feridas de ratos diabéticos por estreptozotocina, nos dias 1, 5 e 10.



O experimento, utilizando ratos diabéticos por indução de STZ, neste estudo demonstra a porcentagem de contração da ferida após dez dias de tratamento (Figura 43). Os tratamentos com EB e EBM diminuíram significativamente a área ulcerada (85% e 86% de contração) quando comparados com o grupo salina (57% de contração). O grupo tratado com alantoína apresentou, no mesmo período, redução de 85%. Este resultado corroborou com o estudo anterior no qual se observou contração da ferida de 96% em ratos normoglicêmicos tratados topicamente com o extrato bruto de *A. chica* (Jorge *et al*, 2008).

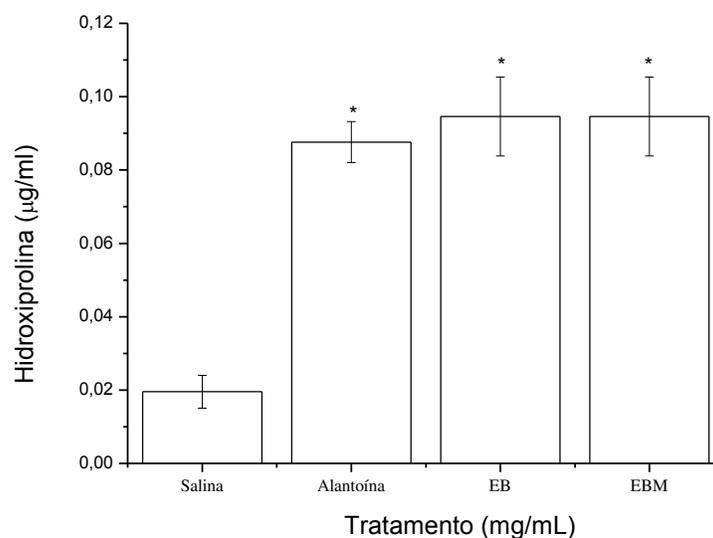
Figura 43: Efeito cicatrizante de EB e EBM após tratamento diário (10 dias) de úlceras cutâneas em animais diabéticos por STZ *in vivo*.



Tratamento: EB e EBM (100mg/mL), Alantoína (100mg/mL), Salina (NaCl 0,9%).* $p < 0,05$.

Ao final do experimento (décimo primeiro dia) retirou-se a área de contração da ferida para análise do estímulo à síntese de colágeno, através do teste de hidroxiprolina e análise histológica. A hidroxilação da prolina e da lisina é uma etapa vital para a formação do colágeno que ocorre no ribossomo do fibroblasto que sofreu alterações morfológicas para a secreção de colágeno. Oxigênio, ácido ascórbico e ferro são cofatores nesta hidroxilação. Através da determinação do conteúdo de colágeno sintetizado, pela análise de hidroxiprolina e histologia do tecido em processo cicatrizante, é possível avaliar também o potencial cicatrizante de uma droga. (Jorge *et al*, 2008). Os resultados da análise de hidroxiprolina indicaram que nos ratos diabéticos tratados tanto com EB quanto com EBM ocorreu um estímulo significativo na síntese de colágeno (Figura 44).

Figura 44: Efeito estimulante sobre a síntese de colágeno do EB e EB *in vivo* avaliado pela quantidade de hidroxiprolina.



Tratamento: EB e EBM (100mg/mL), Alantoína (100mg/mL), Salina (NaCl 0.9%). Os resultados (índice de lesão ulcerativa) são expressos como média \pm erro padrão. Análise estatística ANOVA seguida de teste de Dukan:

* $p < 0,001$.

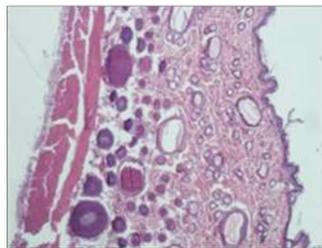
Além disso, uma parte da área lesionada em processo cicatrizante, de cada animal, foi retirada e armazenada em formol 10% para posterior análise histológica. Estas análises foram realizadas em parceria com a professora Dra. Denise Priolli no departamento de histopatologia da Faculdade de Medicina da Universidade São Francisco Campus Bragança Paulista.

As análises do tecido de granulação do grupo tratado com EB demonstraram a presença moderada de fibroblastos, com pouco infiltrado inflamatório e neovascularização, enquanto no grupo controle negativo (NaCl 0,9%) o tecido de granulação apresentou sinais de necrose, abundante infiltrado inflamatório neutrofilico e derramamento hemático. Finalmente, o grupo controle positivo (alantoína) apresentou tecido de granulação com presença moderada de fibroblastos, pouco infiltrado inflamatório como o EB, porém sem induzir neovascularização (Figura 45).

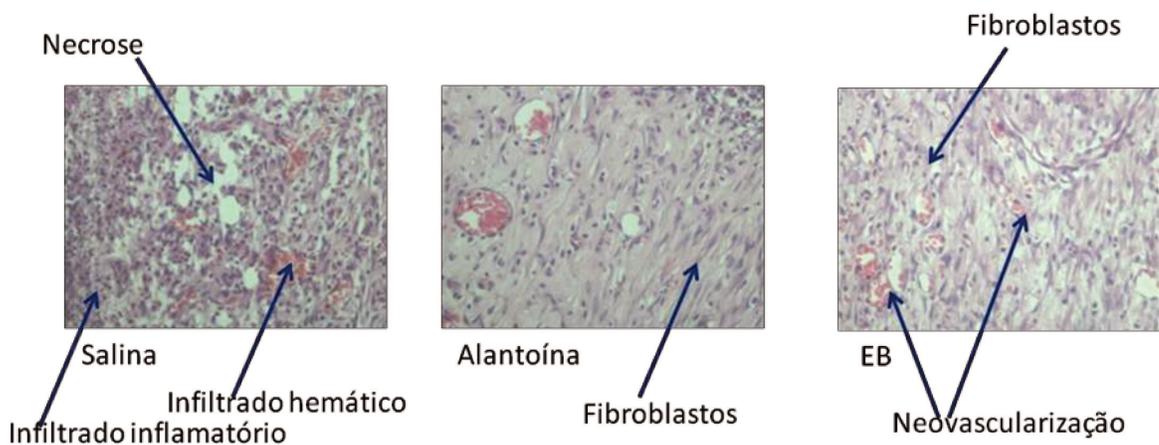
Além disso, a pele integra dos ratos diabéticos, dos 3 grupos tratados, retirada no primeiro dia do experimento também foi analisada histologicamente para quantificar o

colágeno presente na pele integra e desta forma servir como parâmetro de comparação com o que foi sintetizado durante o processo cicatrizante, após 10 dias de experimento. Neste estudo, o TM cora o colágeno de azul e, portanto quanto mais fibras colágenas presentes mais intensa é a coloração azul. Assim, a pele integra dos animais apresentou em média 16% de colágeno enquanto, ao final do experimento, os animais tratados com EB apresentaram em média 16% e o grupo salina apresentou em média 9%. Além disso, o grupo tratado com Alantoína apresentou em média 18% de colágeno, indicando que tanto o EB quanto a alantoína foram capazes de restaurar a pele dos animais diabéticos (Figura 46).

Figura 45: Corte Histológico da pele dos ratos tratadas e coradas com HE (200X).

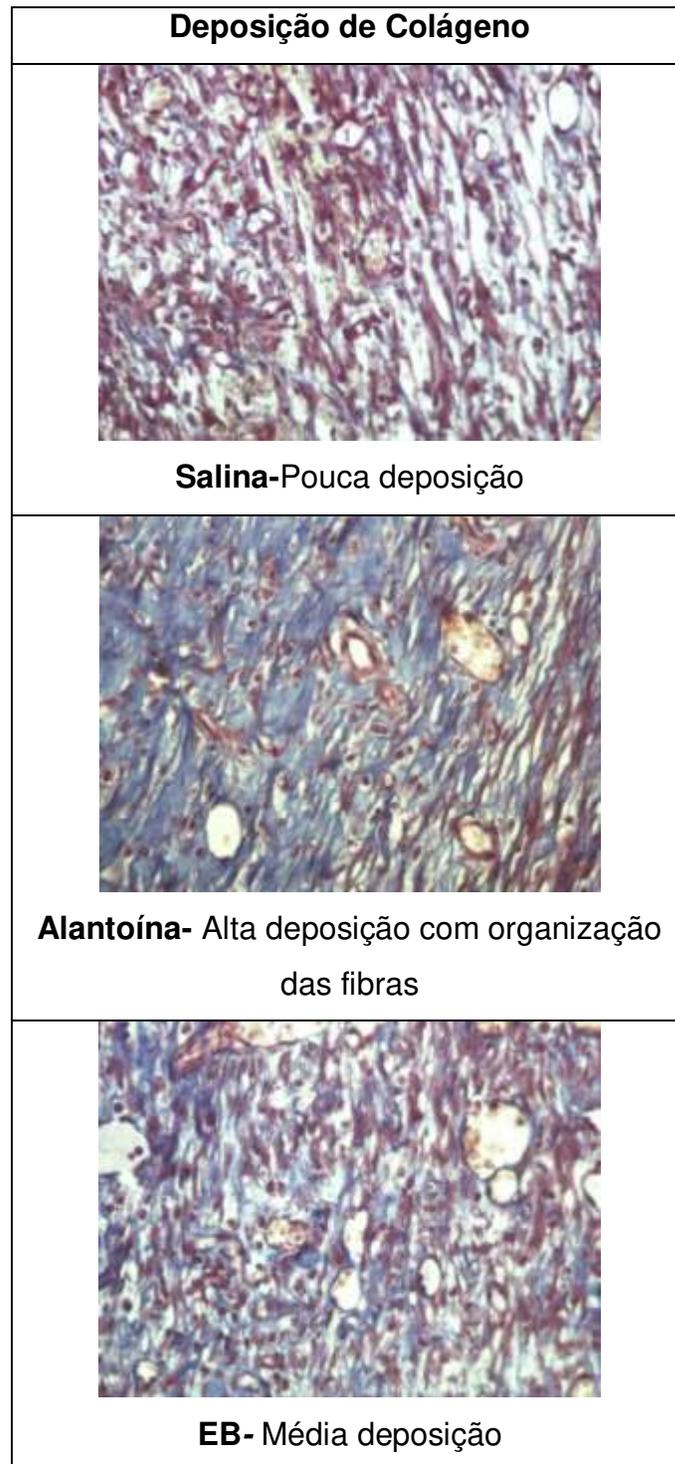


Corte histológico da pele integra de animal diabético coloração HE (200x)



Corte histológico do tecido de granulação de animais diabéticos coloração HE (200x)

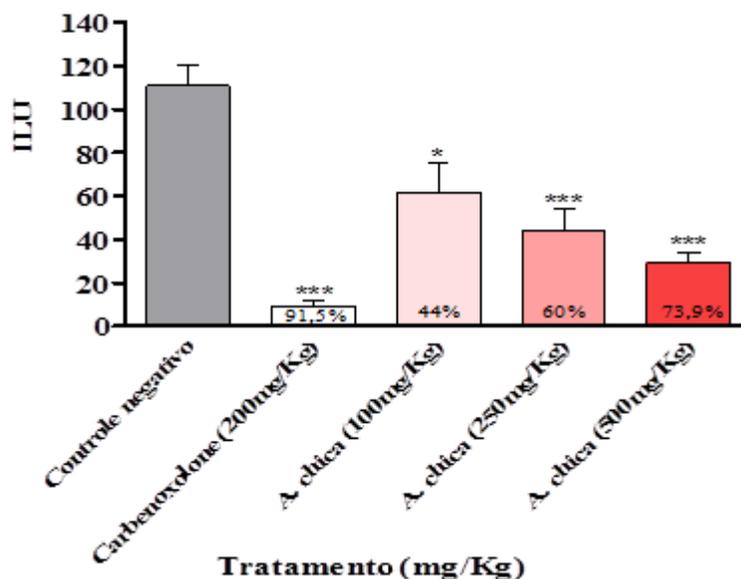
Figura 46: Corte Histológico da pele dos ratos tratadas e coradas com TM (400X).
Fibras de Colágeno coradas de azul.



O principal objetivo do processo cicatricial é o fechamento da ulceração no menor tempo possível, com o mínimo de dor, desconforto e pânico ao paciente (Jorge *et al*, 2008; MacKay & Miller, 2003). Compreender os mecanismos moleculares trará no futuro novas estratégias para promover a cicatrização, restaurar a função da pele, bem como permitirá o emprego de novas terapias tópicas para o tratamento de feridas. Assim, os resultados obtidos com os extratos (EB e EBM) demonstram o potencial cicatrizante em animais diabéticos, possivelmente por estímulo do crescimento de fibroblastos e da produção de colágeno bem como a neovascularização.

Devido a ação antiulcerogênica do EB em ratos normoglicêmicos, o EB também foi avaliado em animais diabéticos por STZ, com média de 434 mg/dL o índice glicêmico. Assim, em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos diabéticos, o EB (doses de 100, 250 e 500 mg/Kg) reduziu o índice de lesões ulcerativas quando comparado ao grupo controle negativo (NaCl 0,9%) apresentando DE_{50} de 208 mg/Kg, quase o dobro da observada em ratos normoglicêmicos (DE_{50} de 125 mg/Kg). Este aumento da DE_{50} pode ser atribuído à diminuição da capacidade cicatrizante observada no diabetes devido a diminuição da insulina circulante, mesmo assim o extrato protegeu a mucosa gástrica, não sendo diferente do grupo controle positivo tratado com carbenoxolona (200 mg/Kg) (Figura 47).

Figura 47: Efeito da administração oral única de *A. chica* em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos *Wistar* diabéticos.



Tratamento: *A. chica* (EB) (100, 250 e 500 mg/mL), Controle negativo (NaCl 0.9%). Os resultados (índice de lesão ulcerativa) são expressos como média ± erro padrão. Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey: $p < 0,001$ (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Desta forma, os resultados obtidos tanto no modelo de cicatrização dérmica quanto no modelo de úlcera gástrica demonstraram que o EB manteve sua atividade cicatrizante em animais diabéticos.

Diversos fatores de crescimento estão envolvidos no processo de cicatrização tendo como principais fatores, TNF- α , TGF- α , TGF- β , PDGF, VEGF, IL-1, que são liberados pelas principais células que constituem a pele (Tabela 3). A biologia molecular proporcionou a quantificação dos fatores de crescimento, através de complexas reações utilizando material genético encontrado no tecido de granulação de feridas. Futuros testes devem ser realizados para verificar uma possível ação do EB no estímulo da produção destes fatores, os quais estão envolvidos na proliferação de uma das principais células da derme, o fibroblasto, e na neovascularização.

Além desta tese de doutorado, nosso grupo de trabalho vem desenvolvendo estudos fitoquímicos e farmacológicos que visam o desenvolvimento de formas farmacêuticas para uso tópico em pele e em mucosa oral contendo o EB. Sousa (2013) demonstrou a

manutenção dos compostos químicos do EB incorporado ao gel de Natrosol, bem como a manutenção da atividade cicatrizante em ratos normoglicêmicos, com estímulo da proliferação de fibroblastos e da síntese de colágeno, em análise histológica da pele. Estes trabalhos geraram duas patentes (Anexo) sendo uma internacional, **PI1105312-7: COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO EXTRATO DE ARRABIDAEA CHICA VERLOT EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MICRO E NANOPARTICULADOS E LIPOSSOMAIS, PROCESSOS DE FABRICAÇÃO E USO DOS MESMOS** e **BR 10 2012 033126 8: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PRODUTOS A BASE DE QUITOSANA E ENRIQUECIDOS COM ARRABIDAEA CHICA**, que despertou o interesse de uma indústria farmacêutica nacional no desenvolvimento de um produto. O grande interesse em implementar um medicamento fitoterápico no SUS despertou o interesse do desenvolvimento de um projeto de pesquisa clínica, em Mucosite oral produzida pelo uso de quimioterápicos no ambulatório de Oncologia do HC da Unicamp e no ambulatório de Odontologia do Hemocentro da Unicamp.

Conclusões

Com a finalidade de desenvolver um medicamento fitoterápico contendo o extrato bruto de *Arrabidaea chica* este trabalho contribuiu com dados para definição dos parâmetros de eficácia, segurança e reprodutibilidade:

- O extrato bruto reproduziu sua atividade cicatrizante em animais diabéticos aumentando a proliferação de fibroblasto e síntese de colágeno bem como o estímulo a neovascularização.
- A microencapsulação mostrou ser uma estratégia viável aumentando o tempo de prateleira do extrato bruto preservando a atividade antiulcerogênica.
- Os parâmetros bioquímicos e hematológicos do extrato bruto não apresentaram alterações.
- A atividade antiulcerogênica do extrato demonstrou estar relacionada ao aumento da produção de muco e a atividade antissecretora inibindo a ação da gastrina e acetilcolina.

Ⓢ Esses resultados fornecem subsídios científicos para confirmação do uso dessa espécie de *A. chica* na cicatrização de úlceras cutâneas e da mucosa gástrica derivadas ou não das complicações da diabetes.

Referências

Bibliográficas

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P., 2010. *Biologia Molecular da célula*. 5ª edição, Artmed, Porto Alegre, .
- 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. & Flemtrom, G., 2005. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, 288(1): C1-19.
- Amaral, R.R.; Santos, A.A.D.; Saraiva, A.; Botas G.; Cruz, R.A.S.; Fernandes, C.P.; Rocha, L.; Boylan, F., 2012. Biological activities of *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. Leaves. *Latin American Journal of Pharmacy* , 31 (3): 451-455.
- Aro A.A.; Simões, G.F; Esquisatto, M..A.M; Foglio, M.A; Carvalho,J.E; Oliveira, A.L.R; Gomes,L; Pimentel, E.R., 2012. *Arrabidaea chica* extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. *Injury, Int. J. Care Injured*.
Arrabidaea chica Verlot (Bignoneaceae), an Amazon Plant with Medicinal Properties. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76:381–390.
- 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.
- Awika, J. 2008 Behavior of 3-deoxyanthocyanidins in the presence of phenolic copigments. *Food Research International* 41: 532–538.
- Awika, J. M.; Rooney, L. W.; Waniska, R. D., 2004. Properties of 3-Deoxyanthocyanins from Sorghum. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 52, 4388-4394.
- Balbino, C. A., Pereira, L. M., Curi, R. 2005. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 41: 27-51.

- Barbosa, W.L.R.; Nascimento, L.P.; Quignard,E.;Vieira J.M.S.; Silva Jr,J.O.C. , 2008. Albuquerque, S.; Arrabidaea chica (HBK) Verlot: phytochemical approach,antifungal and trypanocidal activities Brazilian Journal Pharmacognosy, 18:544-548.
- Bighetti, A.E., Antonio, M.A., Carvalho, J.E., 2002. Regulation and modulation of gastric secretion. Revista de Ciências Médicas 11(1): 55-60.
- Borsa A, Kohayagawa A, Boretti LP, Saito ME, Kuibida K., 2006. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 58 (4):675-677.
- BRASIL, 2006. ANVISA, Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), o decreto lei N°5813, de 22 de junho de 2006,Brasília.
- BRASIL, 2009. Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (Renuis), <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf> Brasília.
- BRASIL, 2010. ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos - Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF; Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- BRASIL. 2005. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estudo de estabilidade, RE nº1de 29 de julho, Brasília.
- Brunton, L.; Chabner, B.; Knollman, B. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.
- Bush, BM. Interpretation of laboratory results for small animal clinicians. London: Blackwell Scientific Publications, 1991, p.311-340.
- Cai S, Liu Y, Shu X Z, Prestwich G D., 2005. Injectable glycosaminoglycan hydrogels for controlled release of human basic fibroblast growth factor. Biomaterials, 26: 6054-6067.
- Campos, A. C. L.; Borges-Branco, A.; Groth; A. K., 2007. Cicatrização de feridas. ABCD Arq Bras Cir Dig.,20(1):51-8.
- Carmeliet P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature, 438: 932-936.
- Carvalheira, J.B.C.; Zecchin, H.G.; Saad, M. J.A. Vias de Sinalização da Insulina., 2002. Arq Bras Endocrinol Metab. 46(4): 419-425.

- Carvalho, A.C.B.; Balbino, E.E.; Maciel, A.; Perfeito, J.P.S.; 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira Farmacognosia* 18: 314-319.
- Castello Branco, A.C.S.; Diniz, M.F.F.; Almeida, R.N.; Santos, H.B.; Oliveira, K.M.; Ramalho, J.A.; Dantas, J.G., 2011. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do biotério professor Thomas George. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, 15 (2): 209-214.
- Cavalcanti, R. N.; Santos, D.T., 2011. Meireles, M.A., Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems - an overview. *Foods Research International*, 44: 499-509.
- Chan J.C.N.; Vasanti M.; Weiping J.; Kadowaski T.; Yajnik C.S.; Yoon K.H. *et al.* 2009. Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors and pathophysiology. *J Am Med Assoc.*, 301(20):2129-40.
- Chapman, E.; Perkin, A.G.; Robinson, R., 1927. The colouring matters of carajura. *Journal Of The Chemical Society* , 3015-3041.
- Chen,C-H.;Wu, M-C; Hou,C-Y; Jiang,C-M; Huang,C-M ; Wang, Y.T.,2009. Effect of Phenolic Acid on Antioxidant Activity of Wine and Inhibition of Pectin Methyl Esterase. *Journal of the Institute of Brewing* 115, 328-333.
- Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G., 1998. Influence of aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* Jan;59(3):195-201.
- Corrêa, P.M., 1926. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas I*; Imprensa Nacional: Rio De Janeiro, p.31-39.
- Cunha, P.L.R.; De Paula, R.C.M., 2009 Feitosa, J.P.A. Polissacarídeos na biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Química Nova*, 32, 649-660.
- Curi, R., Procopio, J.2009. *Fisiologia Básica*.Guanabara Koogan.591-644.
- Delfino V. DA; Figueiredo J. F.; Matsuo T.; Favero M. E.; Matnia A. M.; Mocelina A. J.,2002. *Journal Bras Nefrol.*, 24(1):31-36.
- 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.

- Donatini, R.S., Ishikawa,T., Barros, S.B.M., Bacchi,M.E., 2009. Brazilian Journal of Pharmacognosy 19(1A): 89-94.
- Evans, GO.,2009. Animal Clinical Chemistry, A Practical Guide For Toxicologists And Biomedical Researchers. 2a.edição, Taylor & Francis Group, LLC Boca Raton, EUA. 2009, 338 p.
- Fang, Z.;Bhandari, B., 2010 Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols .Trends in Food Science &Technology, 21 510-523.
- Federação Brasileira de Gastroenterologia, 2003. Úlcera Péptica. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina 12p.
- Ferre , V.S.,2012. Preparação e Caracterização de Micro e Nanopartículas de Ácido Hialurônico com Encapsulação do Extrato Bruto Vegetal da Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot para Aplicações Farmacêuticas e Cosméticas. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas 145 pgs.
- Ferreira, L.A.; Leite, J.P.V., 2008. Desenvolvimento de formulações fitoterápicas. In: LEITE, J.P.V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Editora Atheneu, p. 206-251.
- Figueira, G.M.; Ramelo, P.R.; Ogasawara, D. C.; Montanari Jr, I.; Zucchi M. I.; Cavallari , M.M.; Foglio, M. A.;2010 A set of microsatellite markers for Arrabidaea chica (Bignoniaceae), a medicinal liana from the neotropics. American Journal of Botany, 63–64.
- 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.
- Gartiner, L.P.; Hiatt, J.L. Tratado de Histologia em cores. 3ª. Edição 2007. Cap 14, tegumento p.253-266.
- Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. ICH, 2003.p. 1-22.
- Guyton, A.C.; Hall, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. . ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

- Haidong, L.; Fang, Y. ;Zhihong, T. ; Huanwei, S. ; Tiehui, Z.,2012. Use of combinations of gum arabic, maltodextrin and soybean protein to microencapsulate ginkgo leaf extracts and its inhibitory effect on skeletal muscle injury. *Carbohydrate Polymers* 88, 435-440.
- 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.
- Höfling, J. F.; Aníbal, P. C.; Obando-Pereda,G. A.; Peixoto, I. A.; Furletti, V. F.,Foglio, M. A.; and Gonçalves, R. B., 2010. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida*. species. *Braz. Journal Biology*, 70:1065–1068.
- Hou, D.-X.; Kai, K.; Li, J.-J.; Lin, S.; Terahara, N.; Wakamatsu, M.; Fujii, M.; Young, M. R. Colburn, N., 2004. Anthocyanins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis* 25, 29-36.
- Isaac, V.L.B.; Cefali L.C.; Chiari, B.G.; Oliveira, C.C.L.G.; Salgado H.R.N.; Corrêa, M.A., 2008. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista Ciências farmacêuticas Básica Aplificada.*, v.29, n.1, p.81-96.
- Jorge, M. P. , 2008. Atividade cicatrizante do extrato bruto de *Arrabidaea chica* Verlot. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.
- Jorge, M. P.; Madjarof, C.; Ruiz, A.L.T.G.; Fernandes, A.T.; Rodrigues, R.A.F.; Sousa, I.M.O.; Foglio, M.A.; Carvalho, J.E., 2008. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 118: 361-366.
- Junqueira L. C., Carneiro J. (1999). *Histologia Básica*. 9º edição, Guanabara Koogan, 72-97.
- Junqueira L. C., Carneiro J. (2004). *Histologia Básica*. 11º edição, Guanabara Koogan, 358-370.
- Kakizawa,H.; Mitsuyasu, I.; Yasutoshi I.; Iamamura, S.; Ishiwata,Y.; Matsumoto, T.; Yamamoto, K.; Kato, T.; Ono, Y.; Nagata, M.; Hayakawa, N.; Suzuki, A; Goto, Y. and Oda, N. 2004. *Metabolism*, 53 (5): 550-555.

- 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.
- Kamer, E.; Unalp H. R.; Omer G.; Gulden D.; Ragip O.; Murat O.; Hayrullah D.; Onal M. A. 2010. Wounds Care, 1: 27-31.
- Kaneko, JJ; Harvey JW; Bruss, ML. Clinical biochemistry of domestic animals, 5th ed, San Diego, Academic Press, 1997. P.309-349.
- Kaneko, JJ. Clinical biochemistry of domestic animals, 4th ed, San Diego, Academic, 1989. pp.932.
- Konturek, P. C. H.; Duda, A.; Brzozowski, T. Konturek, S. J.;Kwiecien, S.; Drozdowicz, D.; Pajdo, R.; Meixner, H.; Hahn, E. G. 2000. Activation of genes for superoxide dismutase, interleukin-1 β , tumor necrosis factor and intercellular adhesion molecule-1 during healing of ischemia – reperfusion gastric injury. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. 35: 452-463,
- Kopleman, S. H.; Augsburg, L. L.,2001. Selected physical and chemical properties of commercial *Hypericum perforatum* extracts relevant for formulated product quality and performance. *Pharmaceutical Science* 3 (4) 26.
- Lerco, M. M., Spadella C.T.; Machado J.L.M.; Schellini S.A.; Padovani C.R., 2003. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. *Acta Cirúrgica Bras.*, 18 (2): 133-142.
- Lima, M.H.M., Caricilli A. M. Abreu, L. L., Araujo, U.P, Pelegrinelli F. F, Thirone A.C. P, Tsukumo D.M.2, Pessoa A. F. M., Santos M.F., Moraes M.A., Carvalheira J.B. C., Velloso L., Saad M. J. A. 2012. Topical Insulin Accelerates Wound Healing in Diabetes by Enhancing the AKT and ERK Pathways: A Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Insulin Signaling in Wound Healing in Diabetes* 5:7 1-13.
- Lima, M.H.M.; Araujo, U.P.,2013. Diabetes mellitus e o processo de cicatrização cutânea. *Cogitare Enferm.*18(1):170-2.
- Mabona,U.; Van Vuuren,S.F.,2013. Southern African medicinal plants used to treat skin diseases. *South African Journal of Botany* 87:175-193.

- 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.
- Mafioleti, L., da Silva Junior, I.F.; Colodel, E.M.; Flach A.; Martins D.T., 2013. Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(2):576-82.
- 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.
- Mazza, G.; Miniati, E., 1993. *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. Boca Raton, FL: CRC Press 379p.
- Melo, M.J., Moura, S., Maestri, M., Pina, F., 2002. Micelle effects on multistate/multifunctional systems based on photochromic flavylum compounds: The case of luteolinidin. *Journal Molecular Structure.*, 612: 245–253.
- 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.
- Miranzi, S.S.C.; Ferreira F.S.; Iwamoto H.H.; Pereira G.A., Miranzi M.A.S., 2008. Qualidade de Vida de Indivíduos com *Diabetes mellitu* e Hipertensão acompanhados por uma Equipe de Saúde da Família. *Texto e Contexto Enfermagem* 17(4):672-9.
- Monteiro K M, 2006. Avaliação Farmacológica e Toxicológica do Complemento nutricional “TK3”, Dissertação de Mestrado, 161 pg
- Monteiro K M.; Spindola H. M.; Possenti A.; Tinti S. V., Ruiz A. L.T.G., Longato G.B.; Fiorito G.G.a, Marchetti G.M.; Shiozawa L.; iloni B.U.; Oliveira A. C.; Miyagawa L. M.; Carvalho J.E., 2012. Characterization of a refinement of the “pylorus ligation” model of rat gastric ulceration resulting in “no pain” and a more specific pharmacological response. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*

- 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.
- Moura, L.I.F.; Dias A.M.A.; Carvalho E.; Sousa, H.C., 2013. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review. *Acta Biomaterialia* 9: 7093–7114.
- Newman D.J. Cragg, G.M., 2012. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010 *Journal Natural Products*, 75, 311-335.
- Njoroge G.N., Bussmann R.W., 2007. Ethnotherapeutic Management of Skin diseases among the Kikues of central Kenya. *Journal of Ethnopharmacology* 11(2):3303-7.
- OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS – Acute Oral Toxicity: 420 – adopted 17/12/2001.
- Oliveira Junior, I.S. 2009. Laringe. Membrana Basal. Disponível: <http://www.unifesp.br/dmorfo/histologia/ensino/laringe/membrana.htm>. Acesso agosto 2013.
- 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.
- Oliveira, M.D.C.; Souza, L.B.; Leão, P.P.; Freitas, R.A., 2002. Estudos imunohistoquímicos de componentes da membrana basal em cistos Odontogênicos. *Pesquisa Odontológica Brasileira* 16:2.
- Oliveira, O. W. ; Petrovick, P. R., 2010. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20(4): Ago./Set. 641-650.
- Ozgen, U., Ikbal 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.
- Pauletti, 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-Glucosylxanthenes from stems of *Arrabidaea samydoides*. *Journal of Natural Products*. 66: 1384-1387.
- Pearson EG. Moléstias do sistema hepatobiliar. In: Bradford P.S. Tratado de medicina interna de grandes animais, São Paulo: Manole, 1993, p.839-872.
- 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.
- Popovic, M.; Janicijevic-Hudomal, S.; Kaurinovic, B., Rasic, J.; Trivic, S., 2009. Antioxidant effects of some drugs on ethanol-induced ulcers. *Molecules*, 14(2):816-26,
- Possenti, A.; Carvalho, J.E.; Monteiro, K.M.; Dias, I.M.G.; Gibrim, M.F.; Jacobucci, H.B., 2012. Efeito de fermentado (utilizado como alimento funcional) sobre: a citoproteção gástrica, atividade anti-secretória e a motilidade intestinal em animais. *International Journal of Nutrology* (5): 35-41.
- 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.
- Ribeiro A. F.C.; Telles, T.C., Ferraz V. P.; Souza-Fagundes E.M.; Cassali, G. D.; Carvalho A.T.; Melo M. M., 2012. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(2): 364-373.
- Ribeiro, M., 2012. Botica da Família. <http://www.campinas.sp.gov.br> acessada em outubro.
- Robbers, J.E.; Speedie, M.K.; Tyler, V.E., 1997 *Farmacognosia farmacobiotechnologia*. Baltimore: Willians & Wilkins, p 41-54.
- Rodrigo A. S. CRUZ 4, Caio P. FERNANDES 4, Leandro ROCHA 1,4* & Fábio BOYLAN 5
Ansel, H. C.; Popovich, N. G.; Allen, L. V., 2000. *Farmacotécnica: Formas*

Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos. 6º ed., São Paulo: Editorial Premier, p. 398-400.

- Rodrigues, L. N. C.; Ferraz, H. G., 2007. Embalagem farmacêutica tipo blister: Escolha de um filme adequado para fármacos sensíveis a umidade. Revista Analytica, Abril/Maio, Nº28, 80- 86.
- Rodrigues, R.A.F. , 2004. Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por spray drying, contendo extrato de café crioconcentrado, Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- Santos V. C., Longo T. B., Garcia A. L. H., Richter M. F., Guecheva T. N., Henriques J. A. P., Ferraz A. B. F., Picada J. N. 2013. Evaluation of the Mutagenicity and Genotoxicity of
- Schubert, M. L., 2011. Gastric secretion. Current Opinion in Gastroenterology, 27, 536–542.
- Shih, C.; Siu, S.; Ng, R. ; Wong, E.; Chiu, L. C. M.; Chu, I. K.; Lo, C., 2007. Quantitative analysis of anticancer 3-deoxyanthocyanidins in infected sorghum seedlings. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 254–259.
- Sistema Tegumentar, 2011. www.auladeanatomia.com acessado em Julho de 2013.
- Slomianka, L., 2009. Blue Histology-Integumentary System. School of Anatomy and Human Biology-The University of western Australia. Disponível em URL: http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/integumentary/integum.htm#lab_dermis acesso em Junho 2013
- Sobre seu estômago: Gastrite e dispepsia funcional, disponível em: URL: <http://www.gastronet.com.br/imagens/mucosagastr.jpeg>, acesso em Dezembro de 2007.
- Sonnewend, D.; Oliveira, J. L. R.; Nicolau, R. A.; Magalhães, R. G.; Conrado, L. A.; Zângaro, R. A.; Pacheco, M. T. T., 2013. O efeito da radiação infravermelho longo e microcorrentes sobre o processo de reparação deferidas em ratos.
- Sousa, I.M.O., 2013. Avaliação da estabilidade do extrato seco e formulações de bases semi sólidas, contendo *arrabidaea chica verlot*, para uso em cicatrização. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. 123pgs.

- Taffarello, D.; Jorge, M.P.; Sousa I.M.O.; Duarte, M.C.T.; Figueira, G. M.; Queiroz, N. C. A.; Rodrigues R. A.F.; Carvalho, J.E.; Ruiz, G. A.L. T.; Foglio, M. A., 2013. Atividade de Extratos de *Arrabidaea Chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot Obtidos por Processos Biotecnológicos sobre a Proliferação de Fibroblastos e Células Tumorais Humanas. *Química Nova*, 36(3): 431-436.
- Takemura, O. S.; Inuma, 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.
- Thakur, R.; Jain N.; Pathak, R.; Sandhu, S. S.; 2001. Practices in Wound Healing Studies of Plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-17.
- Toneto, M. G., Oliveira, F. J. M., & Lopes, M. H. I., 2011. History of peptic ulcer: From etiology to treatment. *Scientia Medica* 21(1), 23–30.
- Trindade, M.A.; Grosso, C.R.F., 2000. *Journal of microencapsulation* , 17(2):169-176.
- Twardowschya A., Freitas C. S., Baggio C. H., Mayer B., Santosa A. C., Pizzolatti M. G., Zacariasb A. A., 2008. Antiulcerogenic activity of bark extract of *Tabebuia avellanedae*, Lorentz ex Griseb. *Journal of Ethnopharmacology* 118 : 455–459
- 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
- Veiga Junior, V. F.; Pinto, A C.; Maciel, M. A. M., 2005. Plantas Mediciniais: cura segura? *Química Nova*. v. 28, n. 3.
- Wallace J. L., 2006. Nitric oxide, aspirin-triggered lipoxins and NO-aspirin in gastric protection. *Inflammation & Allergy Drugs Targets* 5(2): 133- 137.
- Wang, L. S., Stoner, G. D., 2008. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269, 281–290.
- 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.
- Wolfensohn S: Pain, stress and humane end points, in Wolfensohn S & Lloyd Maggie (ed.): *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*, 3rd ed, Blackwell Publishing Ltd. 2003, pp.59-73.

- 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.

Anexos

< Uso exclusivo do INPI >

Espaço reservado ao protocolo



018120047755
026/12/2012
021/12/2012
BR 10 2012 033126 8

Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
- 1.2 Qualificação: PESSOA JURÍDICA DE DIREITO PÚBLICO, AUTARQUIA ESTADUAL
- 1.3 CNPJ/CPF: 460684250001/33
- 1.4 Endereço Completo: CIDADE UNIVERSITÁRIA "ZEFRINO VAZ"
- 1.5 CEP: 13083-970 1.6 Telefone: (19) 35215015 1.7 Fax: (19) 35219210
- 1.8 E-mail: patentes@inovs.unicamp.br

continua em folha anexa

- 2. Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

3. Título da invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PRODUTOS A BASE DE QUITOSANA E ENRIQUECIDOS COM ARABIDAZA CHICA

continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão:** do pedido N° _____ Data de Depósito: _____

- 5. Prioridade:** interna unionista

O depositante reivindica a(x) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação do seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: MARY ANN FOGGIO
- 6.2 Qualificação: BRAS, DIVORCIADA, PESQUISADOR 6.3 CPF: 096.776.818-77
- 6.4 Endereço completo: RUA ALEXANDRE CAIAELLATO, 939, EM PAULÍNIA - SP
- 6.5 CEP: 13081-970 6.6 Telefone: 19 2139-2861 6.7 Fax:
- 6.8 E-Mail: foggio@cpqba.unicamp.br

continua em folha anexa

653 - PARTICULARES

Data de Protocolo: 20.12.11

Número do Processo: PI1105312-7

Natureza do Pedido: Privilégio de Invenção - PI

Título: COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO EXTRATO DE ARRABIDAEA CHICA VERLOT EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MICRO E NANOPARTICULADOS E LIPOSSOMAIS, PROCESSOS DE FABRICAÇÃO E USO DOS MESMOS

Autores: MARY ANN FOGLIO, JOÃO ERNESTO DE CARVALHO, ANA LUCIA TASCA GÓIS RUIZ, MICHELLE PEDROZA JORGE, LEILA SERVAT, PATRICIA MARIA WIZIAK ZAGO, MARCOS NOGUEIRA EB ERLIN, ELAINE CRISTINA CABRAL POLCELLI, MARIA HELENA ANDRADE SANTANA, VIVIANE FERRE DE SOUZA, GLYN MARA FIGUEIRA, ILZA MARIA OLIVEIRA ,RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES e RENATA MILIANI MARTINEZ

Unidade: CPQBA

Ciro de la Cerda

Propriedade Intelectual

Agência de Inovação - Inova Unicamp

19 3521-5015

Fax: 19 3521-5210

ciro@inova.unicamp.br

www.inova.unicamp.br



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

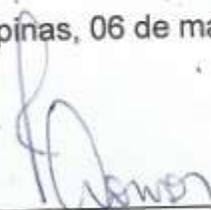
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação da atividade cicatrizante, antiúlcero-gênica e angiogênica de formulações de *Arrabidaea chica* Verlot" (protocolo nº 2407-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Michelle Pedroza Jorge, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 06 de maio de 2011.

Campinas, 06 de maio de 2011.


 Profa. Dra. Ana Maria A. Guinaldo
 Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva