



PATRÍCIA MARIA WIZIACK ZAGO

***Arrabidaea chica* Verlot: avaliação *in vitro* de toxicidade, atividades antimicrobiana e citoprotetora do extrato bruto livre padronizado combinado ao ácido zoledrônico, e estudos de microencapsulação**

Piracicaba-SP,
2014



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

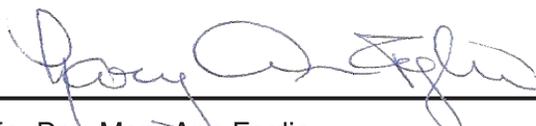
PATRÍCIA MARIA WIZIACK ZAGO

***Arrabidaea chica* Verlot: avaliação *in vitro* de toxicidade, atividades antimicrobiana e citoprotetora do extrato bruto livre padronizado combinado ao ácido zoledrônico, e estudos de microencapsulação**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Ann Foglio
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz
Co-orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Patrícia Maria Wiziack Zago e orientada pela Profa. Dra. Mary Ann Foglio.



Profa. Dra. Mary Ann Foglio

Piracicaba-SP,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Z132a Zago, Patrícia Maria Wiziack, 1982-
Arrabidaea chica Verlot : avaliação *in vitro* de toxicidade, atividades antimicrobiana e citoprotetora do extrato bruto livre padronizado combinado ao ácido zoledrônico, e estudos de microencapsulação / Patrícia Maria Wiziack Zago. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Mary Ann Foglio.
Coorientadores: Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz e João Ernesto de Carvalho.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Arrabidaea chica*. 2. Células epiteliais. 3. Osteoblastos. 4. Queratinócitos. 5. Fibroblastos. 6. *Streptococcus mutans*. I. Foglio, Mary Ann. II. Ruiz, Ana Lúcia Tasca Gois. III. Carvalho, João Ernesto de. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Arrabidaea chica* Verlot : *in vitro* evaluation of toxicity, antimicrobial and cytoprotective activities from standardized free crude extract combined with zoledronic acid, and microencapsulation studies

Palavras-chave em inglês:

Arrabidaea chica

Epithelial cells

Osteoblasts

Keratinocytes

Fibroblasts

Streptococcus mutans

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Doutora em Odontologia

Banca examinadora:

Mary Ann Foglio [Orientador]

Vanessa Rocha Lima Shcaira

Patrícia Corrêa Dias

Maria Elvira Pizzigatti Corrêa

Humberto Moreira Spindola

Data de defesa: 28-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2014, considerou a candidata PATRÍCIA MARIA WIZIACK ZAGO aprovada.

Profa. Dra. MARY ANN FOGLIO

Profa. Dra. VANESSA ROCHA LIMA SHCAIRA

Profa. Dra. PATRÍCIA CORRÊA DIAS

Profa. Dra. MARIA ELVIRA PIZZIGATTI CORRÊA

Prof. Dr. HUMBERTO MOREIRA SPINDOLA

RESUMO

A Osteonecrose Maxilar Induzida por Bisfosfonatos (OMIB) está associada à terapia com bisfosfonatos como o ácido zoledrônico (ZA), que são medicamentos importantes para o manejo de patologias ósseas. Estudos *in vitro* demonstraram que os bisfosfonatos podem alterar a viabilidade e proliferação de células epiteliais, o que justificaria situações de deficiente cicatrização em feridas de OMIB. *Arrabidaea chica* (H&B.) Verlot é uma Bignoniaceae com propriedades cicatrizantes, e que apresenta as antocianidinas como principais compostos identificados. Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana, citotóxica e citoprotetora, *in vitro*, do extrato hidroalcoólico de *A. chica* (AC) na presença de ZA. Foi realizado estudo de estabilidade nas condições de 40 °C e 75% umidade, do extrato microencapsulado em mistura de goma arábica com maltodextrina (1:1) e do extrato livre correspondente. Queratinócitos (HaCaT), fibroblastos (PT64-04HF) e osteoblastos (MC3T3-E1) foram submetidos a 2 protocolos de tratamento: a exposição a ZA 10 µM por 24h e posteriormente AC por 48h e vice-versa; ou o co-tratamento de ambos. Os parâmetros estudados foram viabilidade, ocorrência de apoptose e ativação de caspases 3/7. A viabilidade de células de câncer de próstata (C4-2B) foi avaliada após tratamento com AC. *Streptococcus mutans* foram submetidos ao co-tratamento ZA e AC. Microcápsulas contendo AC foram produzidas por processamento em *spray dryer*, aliquotadas e armazenadas em câmara climática para o estudo de estabilidade acelerada, segundo protocolo da ANVISA (RE 01/2005). Os resultados foram submetidos à análise estatística (ANOVA e Teste T de Student, $\alpha=0,05$). Após 48 h, ZA reduziu a viabilidade de queratinócitos, fibroblastos e osteoblastos em, respectivamente, 34%, 47% e 51%. O co-tratamento ZA e AC 5 µg mL⁻¹ aumentou a viabilidade celular (82%, 83% e 55%), o mesmo ocorrendo para ZA e AC 10 µg mL⁻¹ (69%, 70% e 64%). Após 48 h de tratamento com ZA, não houve apoptose celular ou ativação de caspases em fibroblastos, mas verificou-se a ativação de caspase 3/7 em osteoblastos. As concentrações de 5 e

10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AC não alteraram a viabilidade de células C4-2B, porém observou-se uma redução de mais de 40% em concentrações maiores que 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O crescimento de *S. mutans* foi aparentemente aumentado após o tratamento com ZA em concentrações maiores que 50 μM , sem que AC ocasionasse qualquer efeito. Finalmente, o material formador de parede (mistura de goma arábica com maltodextrina 1:1) empregado para microencapsular AC, foi incapaz de inibir a degradação das antocinidinas, cujas concentrações relativas foram reduzidas após 15 dias de incubação. Assim, baixas concentrações de AC (5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) demonstraram promissora atividade citoprotetora contra os efeitos prejudiciais de ZA, em células epiteliais e osteoblastos, sem estimularem o crescimento das células cancerígenas (C4-2B) e de *S. mutans*. Outros materiais formadores de parede serão avaliados, buscando-se aumentar a estabilidade química de AC. Mais estudos são necessários para a comprovação dos efeitos benéficos de AC como um auxiliar no tratamento de OMIB.

Palavras-chave: Ácido zoledrônico. *Arrabidaea chica*. Células epiteliais. Microcápsulas. Queratinócitos. Fibroblastos. Osteoblastos. *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

The bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) is a condition associated to bisphosphonates, medicines used to treat bone disorders, as zoledronic acid. *In vitro* studies showed epithelial cells viability and growth can be altered by bisphosphonates, and may cause a deficient wound healing in BRONJ. *Arrabidaea chica* (H&B.) Verlot is a Bignoniaceae with wound healing properties, however, anthocyanidins, the main compounds of the plant extract, can be easily degraded under environmental conditions. This *in vitro* study aimed to evaluate the antimicrobial, citotoxic and citoprotective actions of *A. chica* hydroalcoholic extract (AC) in the presence of ZA therapy. Stability studies at 40 °C and 75% humidity conditions, from microencapsulated into arabic gum plus maltodextrin (1:1) and free crude extract samples were conducted. Keratinocytes (HaCaT), fibroblasts (PT64-04HF) and osteoblasts (MC3T3-E1) were submitted to 2 treatment protocols: zoledronic acid 10 µM (ZA) therapy during 24 h and then AC during 48 h and vice-versa; or co-treatment with both. Parameters as viability, apoptosis and caspase 3/7 activation were evaluated. Cancer cells (C4-2B) viability was determined after AC treatment. *Streptococcus mutans* were submitted to co-treatment with ZA and AC. Microcapsules containing AC were obtained after *spray dryer* processing, aliquoted and stored into climatic chamber for stability study according to ANVISA protocol (RE 01/2005). ANOVA and T Student test, $\alpha=0,05$, were applied for statistical analysis. After 48 h, ZA treatment decreased viability of keratinocytes, fibroblasts and osteoblasts respectively by 34%, 47% and 51%. Co-treatments ZA and AC 5 µg mL⁻¹ (82%, 83% and 55%), and ZA and AC 10 µg mL⁻¹ (69%, 70% and 64%) increased cell viability. No apoptosis or caspase activation were detected on fibroblasts, however, caspase 3/7 was active on osteoblasts after ZA 48 h treatment. Concentrations higher than 10 µg mL⁻¹ of AC were toxic to cancer cells and showed a decrease by 40% in cell viability, while no effect was seen with AC 5 or 10 µg mL⁻¹. Higher ZA concentrations (50 µM) seemed to induce *S. mutans* growth, while AC

showed no effect on bacteria. Finally, the studied core material (arabic gum plus matodextrin 1:1) was ineffective on protecting AC extract against degradation, since anthocyanidins concentration was reduced after 15 days incubation. Therefore, lower AC concentrations (5 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were promising on treating BRONJ wounds, as they were effective in protect epithelial cells against harmful effects of ZA, without affecting cancer cells or *S. mutans* growth. Different types of core materials must be evaluated for improving AC chemical stability. More studies are required to prove AC beneficial effects on treating BRONJ.

Keywords: Zoledronic acid. *Arrabidaea chica*. Epithelial cells. Microcapsules. Keratinocytes. Fibroblasts. Osteoblasts. *Streptococcus mutans*.

Sumário

DEDICATÓRIA	xv
AGRADECIMENTOS	xvii
EPÍGRAFE	xxi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xxiii
LISTA DE TABELAS	xxvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1- BISFOSFONATOS	5
2.1. 1 - <i>Classes de bisfosfonatos</i>	6
2.1. 2 - <i>Osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos</i>	7
2.1. 3 - <i>Epidemiologia da osteonecrose induzida por bisfosfonatos</i>	9
2.1. 4 - <i>Mecanismo de ação dos bisfosfonatos</i>	11
2.1. 5 - <i>Efeito dos bisfosfonatos em células epiteliais</i>	13
2.1. 6 – <i>Infecção bacteriana e OMIB</i>	15
2.1. 7 – <i>Tratamento de OMIB</i>	16
2.2 – LINHAGENS CELULARES: CÉLULAS EPITELIAIS, OSTEABLÁSTICAS E TUMORAIS	17
2.2. 1 - <i>Queratinócitos</i>	17
2.2. 2 - <i>Fibroblastos</i>	18
2.2. 3 - <i>Osteoblastos</i>	19
2.2. 4 – <i>Células de câncer de próstata com características osteoblásticas (C4-2B)</i>	21
2.3 - APOPTOSE E CASPASES	22
2.4 - PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS	23
2.4. 1 - <i>Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot</i> :.....	24
2.4.1.1 - <i>Toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de extratos de Arrabidaea chica</i>	28
2.5 - MICROENCAPSULAÇÃO.....	29

2.5. 1 - Atomização (spray drying).....	31
2.5. 2 - Material formador de parede.....	32
2.6 - ESTABILIDADE DE FITOTERÁPICOS.....	35
3 PROPOSIÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 - ESTUDO FITOQUÍMICO:	41
4.1. 1 - Obtenção do Material Vegetal:.....	41
4.1. 2 - Secagem e moagem do material vegetal	42
4.1. 3 - Preparo dos Extratos Vegetais:.....	42
4.1. 4 - Análise de peso seco e perdas por dessecação dos extratos bruto e/ou microencapsulado	44
4.1. 5 - Condições do Spray Dryer para processar os extratos brutos de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....	44
4.1. 6 - Aferição do pH.....	46
4.1. 7 - Estudo de estabilidade.....	46
4.1. 8 – Análises químicas.....	47
4.2 - TESTES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i>	48
4.2 .1 – Culturas celulares	48
4.2. 1.1 - Queratinócitos humanos.....	48
4.2. 1.2 - Fibroblastos gengivais humanos	48
4.2. 1.3 - Pré-osteoblastos da calvária de rato.....	49
4.2. 1.4 – Células humanas originárias de câncer próstata	49
4.2. 1.5 - Concentrações celulares.....	49
4.2. 2 - Amostras e substâncias testadas:	50
4.2. 2.1 - Preparo dos extratos vegetais para incorporação em cultura celular	50
4.2. 3 – Protocolos experimentais	50
4.2.3.1 – Simulação de condição clínica de tratamento com o extrato de <i>A. chica</i> previamente, posteriormente ou concomitante à administração de ácido zoledrônico	50
4.2. 3.2 – Aplicação das amostras e tempos de avaliação	51
4.2. 3.3 – Métodos de avaliação da viabilidade celular.....	52
4.2. 3.4 – Métodos para avaliação de morte celular por apoptose	55
4.3 - Experimentos com bactéria da cavidade oral.....	57

4.3. 1 - Desenho experimental das avaliações de concentração inibitória mínima (CIM).....	57
4.3. 2 - Avaliação de condições de troca do meio de cultura bacteriano.....	59
4.4 - Análise dos resultados	60
5 RESULTADOS.....	61
5.1 - ESTUDO FITOQUÍMICO	61
5.1. 1 - Obtenção do extrato bruto padronizado e extrato bruto padronizado microencapsulado de <i>Arrabidaea chica</i>	61
5.1. 2 – Teste de estabilidade e avaliações do extrato de <i>A. chica</i> microencapsulado	62
5.1. 2.1 - Análises físico-químicas.....	63
5.1. 2. 2 - Análise do pH das amostras.....	63
5.1. 2.3 – Análise das amostras em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	64
5.1. 2.3.1 - Curva analítica.....	64
5.1. 2.3.2 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos brutos	66
5.1. 2.4 - Microscopia eletrônica de varredura.....	68
5.1.2.5 – Comparação biológica <i>in vitro</i> dos extratos bruto e microencapsulado de <i>Arrabidaea chica</i>	68
5.2 - TESTES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i>	69
5.2.1 - Tratamento das células com extrato padronizado de <i>Arrabidaea chica</i> (AC).....	69
5.2.1.1 - Tempos de exposição de 24, 48 e 72 h.....	70
5.2.2 - Tratamentos com ácido zoledrônico (ZA).....	72
5.2.2.1 - Exposição ao ácido zoledrônico por 24, 48 ou 72 h.....	72
5.2.2.2 - Exposição ao ácido zoledrônico em diferentes condições de tratamento.....	73
5.2.3 - Condições de co-tratamento com ácido zoledrônico e extrato de <i>Arrabidaea chica</i>	75
5.2.3.1 - Tratamento de 48 h de duração.....	76
5.2.3.2 - tratamento de 72 h de duração	77
5.2.4 - Tratamento com extrato de <i>Arrabidaea chica</i> por 24 h e posteriormente adição de ácido zoledrônico por mais 48 h.....	78
5.2.5 - Tratamento com ácido zoledrônico por 24 h e posteriormente adição de extrato de <i>Arrabidaea chica</i> por mais 48 h.....	79
5.2.4 – Citometria de fluxo e ativação de caspases	81

5.2.4.1 - Queratinócitos	81
5.2.4.2 - Fibroblastos	81
5.2.4.3 - Osteoblastos.....	84
5.2.5 - Experimentos com células tumorais – C4-2B	86
5.2.6 – Experimentos envolvendo <i>Streptococcus mutans</i>	88
5.2.6.1 – Crescimento de bactérias expostas ao extrato de <i>Arrabidaea chica</i> 88	
5.2.6.2 – Crescimento de <i>S. mutans</i> exposto ao ácido zoledrônico.....	88
5.2.6.3 – Crescimento de <i>S. mutans</i> exposto ao co-tratamento de ácido zoledrônico com o extrato de <i>Arrabidaea chica</i>	89
5.2.6.4 – Exposição de <i>S. mutans</i> a condições de troca de tratamento	90
6 DISCUSSÃO	93
7 CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS.....	105
APÊNDICE 1	129
APÊNDICE 2	137
APÊNDICE 3	139
ANEXOS.....	143

Dedicatória

À *Deus*, pelo dom da vida e presença constante.

Aos meus queridos pais *Hélio* e *Maria Ester*, e irmãos *Cris* e *Ri*,
presentes de Deus em minha vida.

Agradecimentos

Em especial aos meus *pais e irmãos*, por serem a base dos meus ensinamentos e o sustento em todos os momentos. Pelos exemplos de fé, perseverança, trabalho e amor. Nenhum trabalho ou estudo seria possível sem a força, o incentivo, o carinho e o amor de minha família.

À *Universidade Estadual de Campinas*, por meio do *Reitor José Tadeu Jorge*.

À *Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP – UNICAMP)*, por meio do diretor *Dr. Jacks Jorge Junior*.

Ao *Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP*, por meio do chefe de departamento *Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury*.

À *Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia*, coordenadora dos cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e à *Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury*, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Ao *Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas – CPQBA – Unicamp*, por meio do diretor *Dr. Ivo Milton Raimundo Jr.*

Às Divisões de *Química em Produtos Naturais e Farmacologia e Toxicologia do CPQBA – Unicamp*, por todo o apoio e suporte para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de Nova York (College of Dentistry – New York University) pela oportunidade de estágio como aluno visitante.

À *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP* pelo apoio para a realização deste trabalho através das bolsas de doutorado processo número 2010/07781-0, e de estágio em pesquisa no exterior - BEPE, processo número 2011/21006-1 concedidas.

À minha querida orientadora *Profa. Dra. Mary Ann Foglio*, minha gratidão pelo pronto acolhimento, pelo estímulo profissional, orientação e ensinamentos que ficarão por toda a vida; pelos exemplos de seriedade, esforço, profissionalismo e simpatia, pela disposição em sempre me ajudar e me aconselhar, pela amizade. Muito obrigada.

À minha querida co-orientadora *Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz* pelo carinhoso abraço sempre muito acolhedor, pela disposição em todos os momentos, pela grande ajuda na execução deste trabalho, pelas orientações e aconselhamentos, pelo exemplo de profissionalismo, pela amizade.

Ao co-orientador *Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho*, pelo acolhimento na divisão de Farmacologia do CPQBA – Unicamp.

Ao *Prof. Dr. Rodney Ferreira Alexandre Rodrigues*, pela disposição em sempre ajudar, pela atenção e auxílio neste trabalho.

Ao *Prof. Dr. Deepak Saxena* pelo acolhimento da Universidade de Nova York, pelos exemplos e ensinamentos de trabalho e profissionalismo, pelo auxílio na realização das pesquisas e disposição de seu laboratório.

Às professoras *Dra. Simone Duarte* e *Dra. Xin Li* da Universidade de Nova York.

Aos professores *Dr. Ricardo Della Coletta, Dra. Livia Maria Andaló Tenuta, Dra. Luciana Gonzaga de Oliveira e Dra. Ana Paula Pardo*, membros da banca de qualificação, pelas sugestões para a realização e finalização desta tese.

À *Profa. Dra. Maria Elvira Pizzigatti Correa*, pelo carinhoso acolhimento na realização do estágio no Hemocentro – UNICAMP, pelos aconselhamentos, ensinamentos e amizade tão importantes.

À *Profa. Dra. Vanessa Rocha Lima Shcaira*, pelos diversos conselhos e ajudas, pela amizade e disposição e atenção sempre dispensadas.

Aos professores da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica e a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia de Piracicaba.

À minha amiga *Smruti Pushalkar*, minha gratidão pelo caloroso acolhimento, pelos conselhos, pelas ajudas fundamentais, pelos estímulos e exemplos de força de vontade, trabalho, cordialidade e respeito. Com muito carinho, agradeço. धन्यवाद.

Aos queridos amigos do estágio no exterior, com carinho:

Marco Paschoal, e Helô minha gratidão pela amizade tão essencial de vocês.

André Landin Malt e Benjamin Trinité, e também ao *prof. Dr. David Levy*, com muito carinho, muito obrigada por todo o apoio e ajuda, fundamentais para este trabalho.

Roxy (Xi Wei), Natalia Tyhovych e Tunde e também *Raquel, Maria Belen Jaurena, Arun Devotta, Candy Petrolle, Cinthia, Himani, Nidhi, Nonie e Anirudh*.

Aos amigos do CPQBA:

À guria *Leila*, por sua ajuda e amizade tão importantes.

Às queridas *Núbia* e *Ilza* pela grande ajuda dispensada, pelas fundamentais colaborações para a realização deste trabalho e pela amizade.

Aos fitoquímicos *Fabício*, *Ícaro*, *Rogério*, *Katyri* e também *Verônica*, *Rosana* e *Inês*, pelo acolhimento, ajuda e amizade.

À *Michelle P. Jorge*, uma das iniciadoras do trabalho com *A. chica*, pela atenção e carinho dispensados em tantos momentos. Obrigada.

Aos farmacológicos *Sica*, *Gi Fiorito*, *Gi Longato* e *Lari Shiozawa*, em especial, pela ajuda, pelo carinho e atenção sempre dispensadas! À *Gabi*, *Paula Monteiro*, *Leilane*, *Vanessa*, *Beto*, *Mariana*, *Adriana*, *Paula Pereira*, *Karin* e *Débora* pela amizade.

Aos amigos da FOP de pós-graduação e graduação, em especial *Lika*, pela amizade e companheirismo mesmo à distância.

A todos os *funcionários do CPQBA - Unicamp* e da *secretaria da Farmacologia* da FOP-Unicamp.

Aos *amigos e pessoas* que embora não citadas, colaboraram e incentivaram para que este trabalho fosse realizado.

Epígrafe

*“Não são os grandes planos
que dão certo, são os pequenos detalhes”.*

Stephen Kanitz

*“Confia ao Senhor a tua sorte,
espera Nele e Ele agirá.
Ainda que caia, não ficarás prostrado,
porque o Senhor o sustenta pela mão”.*

Salmo 36: 3-5; 24

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras	Páginas
Figura 1 - Estrutura química do ácido bifosfônico (bisfosfonato) e pirofosfórico (pirofosfato) (Adaptado de Castro <i>et al.</i> , 2004).....	05
Figura 2 - Estruturas representativas da classe dos bisfosfonatos (Castro <i>et al.</i> , 2004).	07
Figura 3 - Osteonecrose maxilar induzida por bisfosfonatos em mandíbula (McLeoud <i>et al.</i> , 2012).....	08
Figura 4 - Mecanismo de ação dos bisfosfonatos nitrogenados em osteoclastos.....	13
Figura 5 - Imagem de queratinócitos HaCaT.....	18
Figura 6 - Imagem de fibroblastos primários PT64-04HF (aumento de 5x). 19	
Figura 7 - Imagem de pré-osteoblastos MC3T3-E1 (aumento de 5x).....	20
Figura 8 - Imagem de células de câncer de próstata com características de osteoblasto C4-2B (aumento de 5x).....	22
Figura 9 - Agliconas isoladas das folhas de <i>A. chica</i>	26
Figura 10 - Estrutura química dos pigmentos de <i>A. chica</i>	27
Figura 11 - Esquema representativo do processo de <i>spray drying</i> (adaptado de Munin & Edwards-Lévy, 2011).....	32
Figura 12 - Goma arábica.....	33
Figura 13 - Estrutura química da maltodextrina.....	34

Figura 14	- Exemplar de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot, cultivado no campo experimental do CPQBA/UNICAMP.....	41
Figura 15	- Processo de secagem e moagem das folhas de <i>A. chica</i>	42
Figura 16	- Esquema da extração de antocianinas de folhas de <i>A. chica</i> para obtenção do extrato bruto microencapsulado.....	43
Figura 17	- A) Frasco de vidro âmbar com batoque e tampa rosqueável. B) Câmara climática (Tecnal modelo TE-4003).....	47
Figura 18	- Esquema representativo do tratamento das células por um período total de 72 h.....	51
Figura 19	- Esquema representativo da coloração com sulforrodamina B e leitura de absorbância.....	53
Figura 20	- Esquema representativo da coloração com cristal de violeta e leitura de absorbância.....	54
Figura 21	- Desenho experimental das avaliações de concentração inibitória mínima de (CIM) realizados com <i>S. mutans</i>	59
Figura 22	- Desenho experimental para as situações de troca do meio de cultura bacteriano.....	60
Figura 23	- Secagem do extrato bruto de <i>A. chica</i> por <i>Spray Dryer</i>	61
Figura 24	- Análise macroscópica do extrato bruto e microencapsulado em goma arábica com maltodextrina (1:1) de <i>Arrabidaea chica</i> durante o teste de estabilidade acelerada.....	63
Figura 25	- Curva analítica do marcador carajurina.....	65
Figura 26	- Cromatograma do extrato bruto sem encapsular de <i>A. chica</i>	66

Figura 27	- Variação do teor de carajurina durante o estudo de estabilidade de extrato bruto de <i>A. chica</i> microencapsulado em goma arábica/ maltodextrina (1:1).....	67
Figura 28	- Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das microcápsulas do extrato de <i>A. chica</i> microencapsulado em goma arábica/maltodextrina (1:1).....	68
Figura 29	- População de queratinócitos (%) em apoptose.....	81
Figura 30	- População de fibroblastos (%) em apoptose.....	82
Figura 31	- Imagens obtidas em citômetro de fluxo após 48 h de tratamento de fibroblastos com ZA. A) células coradas com Anexina V vs 7-AAD; B) Forward Scatter (FSC) vs Side Scatter (SSC).....	83
Figura 32	- Atividade das caspases 3/7 em fibroblastos.....	84
Figura 33	- População de osteoblastos (%) em apoptose.....	85
Figura 34	- Atividade das caspases 3/7 em osteoblastos.....	86
Figura 35	- Densidade óptica obtida após 48 h de tratamento de <i>S. mutans</i> com extrato de <i>A. chica</i>	88
Figura 36	- Densidade óptica média obtida após 24 h e 48 h de tratamento de <i>S. mutans</i> com diferentes concentrações de ácido zoledrônico.....	89
Figura 37	- Densidade óptica obtida após 48 h de co-tratamento de <i>S. mutans</i> com extrato de <i>A. chica</i> 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e diferentes concentrações de ácido zoledrônico.....	90

Figura 38 - Densidade óptica de *S. mutans* obtida após diferentes condições de troca de tratamento ou não, com as concentrações de ácido zoledrônico (ZA) 5, 10 e 100 μM 91

LISTA DE TABELAS

Tabelas		Páginas
Tabela 1	- Condições do processamento de secagem por <i>spray drying</i> do extrato bruto de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....	45
Tabela 2	- Condições do processamento de microencapsulação (goma arábica com maltodextrina 1:1) por <i>spray drying</i> do extrato bruto de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....	46
Tabela 3	- Avaliação de parâmetros físico-químicos do extrato bruto de <i>A. chica</i> após secagem através de <i>Spray Dryer</i>	62
Tabela 4	- Medidas de pH dos extratos bruto e microencapsulado de <i>A. chica</i>	64
Tabela 5	- Dados obtidos para confecção da curva analítica carajurina.....	65
Tabela 6	- Viabilidade (%) de queratinócitos tratados com extrato de <i>A. chica</i> (AC) ou extrato de <i>A. chica</i> microencapsulado (MAC)....	69
Tabela 7	- Viabilidade (%) de queratinócitos, fibroblastos e osteoblastos submetidos ao tratamento com diferentes concentrações do extrato de <i>A. chica</i> (AC; $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 24, 48 e 72 h.....	71
Tabela 8	- Viabilidade (%) das células epiteliais e osteoblastos submetidos ao tratamento com ácido zoledrônico (ZA) 10 μM durante 24, 48 e 72 h.....	73
Tabela 9	- Viabilidade (%) de fibroblastos em experimentos que envolveram a adição ou a troca do meio de cultura, em	

	condições de tratamentos prévios ou posteriores à exposição ao ácido zoledrônico (ZA) 10 μM	74
Tabela 10	- Viabilidade (%) de osteoblastos em experimentos que envolveram a adição do meio de cultura, em condições de tratamentos prévios ou posteriores à exposição ao ácido zoledrônico (ZA) 10 μM	75
Tabela 11	- Viabilidade (%) das células após 48 h do co-tratamento ácido zoledrônico 10 μM e extrato de <i>A. chica</i> 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	77
Tabela 12	- Viabilidade (%) das células após 72 h do co-tratamento ácido zoledrônico 10 μM e extrato de <i>A. chica</i> 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	78
Tabela 13	- Viabilidade (%) de fibroblastos e osteoblastos tratados com o extrato de <i>A. chica</i> 5 ou 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou meio de cultura 24 h previamente à adição de ácido zoledrônico.....	79
Tabela 14	- Viabilidade (%) de fibroblastos e osteoblastos tratados com o extrato de <i>A. chica</i> 5 ou 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou meio de cultura 24 h posteriormente à adição de ZA.....	80
Tabela 15	- Viabilidade (%) de C4-2B tratadas com diferentes concentrações do extrato de <i>A. chica</i>	87
Tabela 16	- Viabilidade (%) de C4-2B tratados com ácido zoledrônico 5 μM	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

µg mL⁻¹ - Microgramas por Mililitro

µL - Microlitro

µM – Micromolar

7-AAD – 7-Aminoactinomicina D

AAOMS – American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (Associação Americana de Cirurgiões Buco-maxilo-facial)

AC – Extrato Bruto Padronizado Hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* Verlot

Alpha-MEM – Minimum Essencial Medium Alpha

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion (infusão de cérebro e coração)

BP - Bisfosfonato

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CGEN – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE – DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos

CLS – Cell Lines Service

CPMA – Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas

CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas

DMEM – Dulbecco's Modified Essential Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazila

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FOP – Faculdade de Odontologia de Piracicaba

GOT – Transaminase Glutâmico Oxalacética

GTP – Transaminase Glutâmico Pirúvica

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ITAL – Instituto de Tecnologia em Alimentos

kg – Quilograma

MAC – Extrato Bruto Padronizado Hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* Verlot
Microencapsulado em Mistura de Goma Arábica com Maltodextrina 1:1

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura / Microscópio Eletrônico de Varredura

mL – Mililitro

O.D. – Optical Density (Densidade Óptica)

OMIB / BRONJ – Osteonecrose Maxilar Induzida por Bisfosfonatos / Bisphosphonate
Related Osteonecrosis of the Jaw

PBS – Phosphate Buffered Saline / Solução Salina Tamponada

pH – Potencial Hidrogeniônico

Renisus – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

RPM – Rotações Por Minuto

RPMI 1640 – Roswell Park Memorial Institute 1640

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SUS – Sistema Único de Saúde

TA – Temperatura Ambiente

TR – Tempo de Retenção

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

UR – Umidade Relativa

UV – Ultravioleta

ZA – Ácido Zoledrônico

1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BPs) são medicamentos amplamente administrados a pacientes portadores de metástases em tecido ósseo e/ou com osteoporose, por permitirem um adequado manejo da doença ao auxiliarem o processo de formação óssea (Berenson *et al.*, 1996; Hortobagyi *et al.*, 1996; Wells George *et al.*, 2008) a partir da inibição do recrutamento e a indução de apoptose em osteoclastos. Apesar de seus benefícios, um efeito colateral raro mas de grande significância clínica tem sido relatado associado à utilização dos fármacos: a osteonecrose maxilar induzida por bisfosfonatos (OMIB). Dentre as características da OMIB têm-se a quase exclusividade de seu aparecimento nos ossos maxilares, principalmente após procedimentos odontológicos invasivos como exodontias (Gegler *et al.*, 2005). Assim, é referido ao cirurgião-dentista um papel importante no diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes usuários desses medicamentos.

Além das ações desencadeadas em células ósseas, os bifosfonatos também exercem efeitos em células epiteliais orais, alterando sua proliferação e ocasionando efeitos de toxicidade (Agis *et al.*, 2010; Ravosa *et al.*, 2010). Essas ações poderiam provocar ulcerações gengivais, que ao deiscerem, exporiam o osso subjacente deixando-o suscetível a infecções bacterianas e necrose (Bagan *et al.*, 2006). Sonis *et al.* (2009) demonstraram através de um modelo de indução da OMIB em ratos, que as feridas osteonecróticas estavam associadas à ulcerações da mucosa, uma vez que os animais com mucosa íntegra, tratados com bisfosfonatos, não apresentaram feridas.

O efeito terapêutico dos BPs na preservação tecidual óssea é essencial para o tratamento das diversas enfermidades que envolvem o osso, porém, a ocorrência da OMIB como um efeito colateral aumenta a morbidade do paciente e diminui sua qualidade de vida. O estudo de um tratamento que permita a cicatrização da mucosa gengival exposta aos BPs é essencial para impedir a

exposição óssea, e conseqüentemente, a predisposição à infecção bacteriana. Não há um protocolo de tratamento específico para OMIB, sendo que as principais medidas adotadas são a prevenção, e uma vez adquirida a ferida, a limpeza local, remoção de sequestro ósseo e a administração de antibióticos (Forsgren *et al.*, 2011). Pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de se determinar novas terapêuticas que auxiliem o controle e a cicatrização dessas feridas (Adornato *et al.*; 2007; Marcuzzi *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012; Ziebart *et al.*, 2011; Draenert *et al.*; 2012). Neste trabalho, avaliou-se os efeitos do extrato das folhas da espécie vegetal *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot em células expostas ao tratamento com ácido zoledrônico.

Encontrada desde a América central até a América do Sul, *A. chica* apresenta grande potencial terapêutico em cicatrização de feridas. Jorge *et al.* (2008) estudaram os efeitos do extrato metanólico da planta, que *in vitro* estimulou a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno e *in vivo*, induziu a cicatrização de feridas epiteliais em ratos. Desta forma, o extrato de *A. chica* apresentou-se bastante promissor para o tratamento tópico de lesões de OMIB, na medida em que uma estimulação da cicatrização epitelial poderia proteger o osso subjacente contendo o BP incorporado. Aliado a isto, propusemos a inclusão de células tumorais no protocolo estudado, pois muitas lesões estão associadas à utilização do medicamento para o tratamento de tumores primários ou de metástases em tecido ósseo, principalmente metástases de cânceres de mama ou de próstata de acordo com Marx *et al.* (2005). Assim, a estimulação local de um tumor seria um fator contra-indicativo para a aplicação de uma nova terapêutica.

Outro aspecto relevante a ser considerado é a interferência do tratamento proposto no crescimento bacteriano. A microbiota bucal é bastante vasta e infecções bacterianas estão muitas vezes associadas às lesões de OMIB sem, no entanto, uma elucidação sobre a efetiva interferência dos bisfosfonatos no crescimento de algumas bactérias orais (Kobayashi *et al.*, 2010; Mawardi *et al.*, 2011; Muller *et al.*, 2012). A importância da microflora oral para o desenvolvimento

de OMIB também representa uma incógnita. Amostras biopsiadas das lesões, indicaram a presença das espécies *Fusobacterium*, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Marx *et al.*, 2005; Mawardi *et al.*, 2011), muitas delas colonizadoras de biofilmes orais ao invés de serem patógenos invasivos (Mawardi *et al.*, 2011). Especificamente, *Streptococcus mutans* está relacionado ao desenvolvimento da cárie dental e colonização do biofilme bucal e assim poderia representar uma amostra da microbiota oral, em estudos que envolvessem novas terapias para OMIB. Com relação ao presente estudo, apesar de alguns trabalhos demonstrarem a ausência de atividade do extrato de *A. chica* sobre o gênero *Streptococcus* (Duarte, 2006; Mafioleti *et al.*, 2013), inexitem pesquisas que esclareçam os efeitos do tratamento combinado do extrato e bisfosfonatos sobre essa bactéria.

Neste contexto, percebe-se a importância de pesquisas que explorem conceitos farmacológicos como testes celulares e microbianos, e de desenvolvimento farmacotécnico, que propiciem um eficiente tratamento para OMIB. No caso do extrato de *A. chica*, faz-se necessária a viabilização de uma forma farmacêutica que proteja o princípio ativo contra degradação. As antocianidinas são compostos altamente redutores e, portanto, influenciáveis por condições ambientais adversas como os raios UV, umidade e oxigênio (Brouillard & Dangles 1993; Rivas-Gonzalo, 2003). Dentre as alternativas para a manutenção da estabilidade química do extrato e, por conseguinte, das antocianidinas, tem-se a microencapsulação, uma ferramenta muito utilizada na indústria alimentícia (Reineccius, 1991; Goubet *et al.*, 1998; Cano-Chauca *et al.*, 2005; Wang & Zhou, 2011; da Costa *et al.*, 2012), sendo que os principais agentes microencapsulantes utilizados são a goma arábica, a maltodextrina ou a combinação de ambos.

A partir do exposto, este trabalho teve por objetivo produzir dados pré-clínicos para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico à base do extrato padronizado de *A. chica* em tratamentos de feridas de OMIB, através de

experimentos *in vitro* que envolveram células epiteliais, osteoblásticas e tumorais e também *Streptococcus mutans*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos são medicamentos análogos sintéticos dos reguladores fisiológicos da calcificação e reabsorção óssea, os pirofosfatos (Castro *et al.*, 2004). De estrutura química P-O-P, os pirofosfatos não podem ser empregados como agentes terapêuticos, devido à rápida hidrólise enzimática a que estão sujeitos. A substituição do átomo central de oxigênio por um de carbono conferiu resistência à degradação enzimática e aumento da meia-vida biológica, originando os bisfosfonatos (P-C-P) (Figura 1) (Fernandes *et al.*, 2005). Dessa forma, os BPs possuem grande afinidade pelo cálcio (Migliorati *et al.*, 2006) e uma forte ligação com a hidroxiapatita da superfície óssea, onde atuam preferencialmente em sítios de grande formação e reabsorção tecidual, potencializando, através da inibição exercida em osteoclastos, o processo de formação óssea (Senaratne *et al.*, 2000; Marx, 2007).

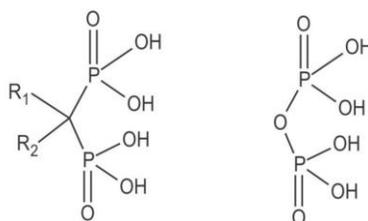


Figura 1: Estrutura química do ácido bifosfônico (bisfosfonato) e pirofosfórico (pirofosfato) (Adaptado de Castro *et al.*, 2004).

Os BPs são utilizados no tratamento de várias doenças que atingem o osso, dentre essas a hipercalemia maligna (na qual reduzem as concentrações de cálcio no soro de pacientes portadores), a doença de Paget óssea, a osteoporose pós-menopausa, as metástases ósseas, o mieloma múltiplo e o câncer de mama avançado, ao diminuírem, por exemplo, a quantidade e a taxa de complicações

esqueléticas (Ryzen *et al.*, 1985; Kanis *et al.*, 1987; Berenson *et al.*, 1996; Hortobagyi *et al.*, 1996).

2.1. 1 - Classes de bisfosfonatos

De acordo com os substituintes ligados ao carbono central da estrutura dos bisfosfonatos, têm-se fármacos com diferentes atividades. A afinidade por cristais ósseos é determinada por R1, enquanto que a potência e atividade farmacológica por R2 (Figura 1). Além disso, a adição de um grupo amino no final da cadeia lateral e o tamanho desta, influenciam a potência da atividade anti-reabsortiva (Fernandes *et al.*, 2005).

Existem três gerações de bisfosfonatos. A primeira é representada pelos compostos não-nitrogenados, como etidronato e o clodronato, enquanto a segunda e terceira gerações pelos compostos nitrogenados (Lehenkari *et al.*, 2002; Reszka, 2004). Alendronato, pamidronato e ibandronato, de segunda geração, são de 10 a 1000 vezes mais potentes (mais absorvidos pelos ossos) do que os de primeira (Lin, 1996; Tenenbaum *et al.*, 2002; Ponte Fernández *et al.*, 2006). Risedronato e zoledronato representam os medicamentos de terceira geração, sendo que este último apresenta potência 100 a 850 vezes superior à do pamidronato (Figura 2) (Tenenbaum *et al.*, 2002).

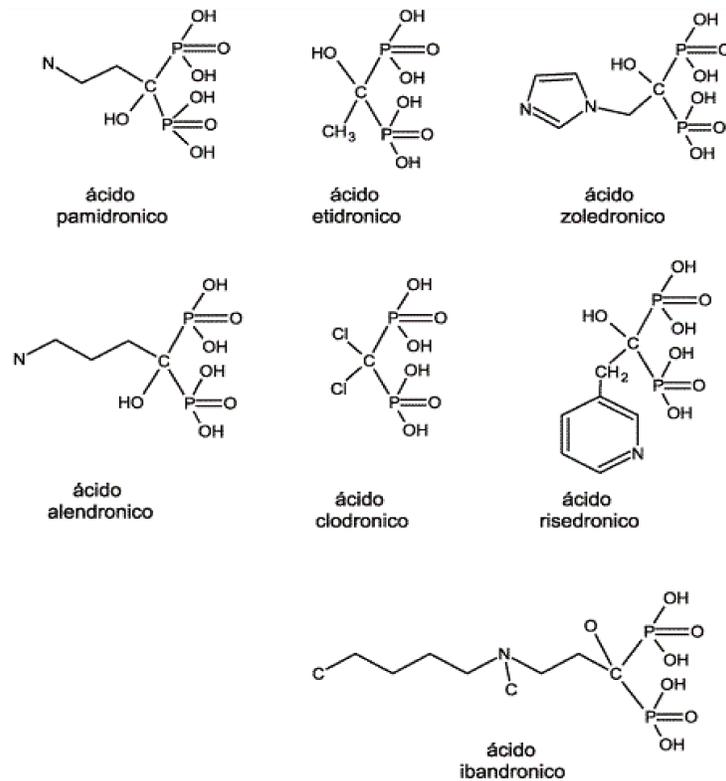


Figura 2: Estruturas representativas de diferentes bisfosfonatos (Castro *et al.*, 2004).

2.1. 2 - Osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos

Apesar de seus benefícios, uma importante complicação denominada osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos (OMIB) tem sido observada em pacientes usuários desses medicamentos.

A AAOMS (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons – Associação Americana dos Cirurgiões Buco-Maxilo-Faciais, 2009) define OMIB como uma condição caracterizada pela exposição óssea na mandíbula ou maxila, persistindo por mais de oito semanas em um paciente usuário, ou que tenha feito uso de bisfosfonato, sem histórico de radioterapia na região dos maxilares. Clinicamente, há uma exposição óssea de ocorrência espontânea ou evidenciada após procedimento odontológico como extração dentária, cirurgia periodontal,

apicectomia e cirurgia de implantes dentários (Migliorati *et al.*, 2006; AAOMS, 2009; Campisi *et al.*, 2012; Thumbigere-Math *et al.*, 2012). A área é dolorida, o que compromete a alimentação, a fala e a higiene oral do paciente. A ocorrência de ulceração é frequente, e o osso necrótico exposto apresenta coloração branco-amarelada (Figura 3). Acreditava-se que OMIB era ocorrência isolada em ossos maxilares, o que poderia ser justificado em parte, pelo alto metabolismo e exposição ao ambiente externo, através dos dentes e ligamento periodontal, do osso alveolar (Ruggiero *et al.*, 2011; Janovska, 2012; McLeod *et al.*, 2012). No entanto, a literatura já apresenta a casuística rara de osteonecrose induzida por bisfosfonatos no canal auditivo externo (Kharazmi *et al.*, 2013; Wickham *et al.*, 2013).

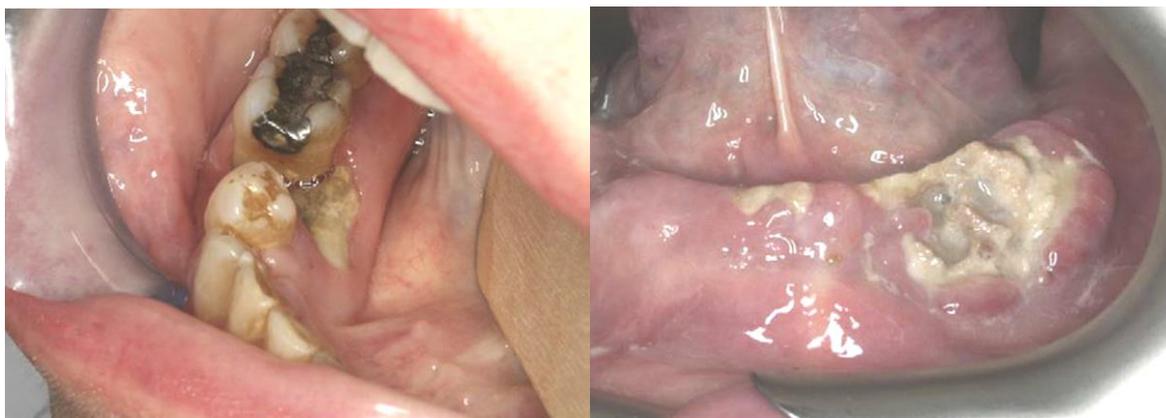


Figura 3: Osteonecrose maxilar induzida por bisfosfonatos em mandíbula (McLeoud *et al.*, 2012).

Os fatores de risco para OMIB foram categorizados pela a AAOMS (adaptado de Coskun Benlidayi & Guzel, 2013):

- Potência do bisfosfonato: quanto maior a potência do BP, maior a probabilidade do desenvolvimento da doença;
- Duração da terapia medicamentosa: quanto maior a duração do tratamento com BP, maior a probabilidade de OMIB;

- Fatores de risco locais: pacientes que sofrem intervenções cirúrgicas odontológicas ou que apresentam infecções periodontais, ou ainda próteses mal adaptadas e que causam injúrias à mucosa oral, apresentam maior risco de OMIB;
- Fatores demográficos e sistêmicos: pacientes idosos (maiores de 65 anos); e condições sistêmicas como a diálise renal, baixa hemoglobina e obesidade aumentam o risco de OMIB (AAOMS, 2009);
- Fatores genéticos: polimorfismos em um único nucleotídeo dos genes do citocromo P-450-2C e IGF-1, podem auxiliar no desenvolvimento da doença.

Avaliação e tratamento odontológico prévios ao tratamento com BPs são fatores preventivos e contribuintes para a diminuição do risco de OMIB (Ruggiero *et al.*, 2009, São Paulo, 2013).

2.1. 3 - Epidemiologia da osteonecrose induzida por bisfosfonatos

Inicialmente, acreditava-se que OMIB era um evento raro e restrito aos pacientes tratados com bisfosfonatos injetáveis, e submetidos a procedimentos odontológicos invasivos. Desde os primeiros relatos da doença em 2003 por Marx, a literatura passou a apresentar tanto um aumento gradativo de sua ocorrência, como uma mudança em seu perfil epidemiológico. Posteriormente, OMIB foi diagnosticada em pacientes em tratamento com BPs por via oral e também relatada como de surgimento espontâneo em alguns casos (Herbozo *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2010).

Indivíduos em tratamento com BPs injetáveis apresentam um risco significativo de desenvolverem OMIB, do que aqueles em tratamento com os fármacos orais menos potentes. Especula-se de que a razão para isso seja a dificuldade de absorção do bisfosfonato via oral (1%) quando comparado à absorção por via injetável (IV) (50%) (Shannon *et al.*, 2011). De acordo com Cartsos

et al. (2008) pelo menos 5% dos pacientes em tratamento com bisfosfonatos injetáveis desenvolvem OMIB. Russel (2006) e Clarke & Koka (2011) afirmam que 94% das pessoas diagnosticadas com a doença estavam em terapia com altas doses de bisfosfonatos IV como o pamidronato e o zoledronato.

Ruggiero *et al.* (2004) verificaram valores de incidência de OMIB entre 1,8 a 12,8% com o uso de bisfosfonatos injetáveis. A AAOMS (2009) relata uma porcentagem variando entre 0,8% e 12%. Em pacientes tratados de câncer com bisfosfonatos injetáveis essa incidência tem sido de 2,5 a 5,4% (Carranza, 2007).

Thumbigere-Math V *et al.* (2012) realizaram estudo retrospectivo em 576 pacientes utilizando bisfosfonatos injetáveis, e verificaram que 18 deles desenvolveram OMIB (3,1%). A maior incidência ocorreu com os pacientes que apresentavam mieloma múltiplo, sendo 7,2%. A lesão osteonecrótica ocorreu após procedimento de extração dentária em 59% dos pacientes e de forma espontânea em 41%. A média de duração de tratamento com os medicamentos foi de $44,3 \pm 24,3$ meses. De acordo com o estudo, o risco do desenvolvimento de OMIB também esteve relacionado ao número de aplicações das injeções de zoledronato.

O aparecimento da doença em pessoas em tratamento com bisfosfonatos orais, apesar dos muitos relatos na literatura, ainda não está bem determinado. Isso pode ser explicado devido a erros em definições de diagnósticos e também à ocorrência de casos com moderada manifestação de sintomas, ou ainda que se resolveram espontaneamente (McLeoud *et al.*, 2012). Sedghizadeh *et al.* (2009) verificaram que 9 dos 208 pacientes (4%) usuários de alendronato, desenvolveram a doença, e em um estudo multicêntrico europeu, dos 470 casos de OMIB, 37 eram decorrentes do uso de bisfosfonatos orais (7,8%). Além disso, a maioria desses casos não apresentou qualquer fator de risco, de acordo com a AAOMS (2009), para OMIB (Otto *et al.*, 2011). Yamazaki *et al.* (2012) descreveram a porcentagem de risco de 0,46% a 0,99% para o desenvolvimento de OMIB em usuários de bisfosfonatos orais.

A área posterior da mandíbula, na região de molares, é a mais acometida (Marx *et al.*, 2005; Ponte Fernández *et al.*, 2006), seguida da região posterior da maxila (Marx *et al.*, 2005), principalmente em casos em que são realizadas exodontias. No entanto, mesmo sem história de procedimento dento-alveolar recente, é possível a ocorrência de necrose avascular dos maxilares com exposição óssea espontânea (Marx, 2003; Migliorati, 2003).

2.1. 4 - Mecanismo de ação dos bisfosfonatos

Há um consenso de que no mecanismo de ação dos bisfosfonatos o alvo final, direta ou indiretamente, é o osteoclasto. Determinou-se ações envolvidas com a inibição da formação dos osteoclastos a partir de células precursoras imaturas, e/ou a direta inibição dos osteoclastos por meio da indução da apoptose (Booncamp *et al.*, 1986; Hughes *et al.*, 1989; Fleisch, 1998).

Segundo Rodan (1998), é aceito que paratormônio, prostaglandina E, interleucina-1 e fator de necrose tumoral (TNFa), alguns dos fatores que estimulam a reabsorção óssea mediada por osteoclastos, agem indiretamente via osteoblastos. Além disso, existem evidências que apontam para um mecanismo de ação dos bisfosfonatos envolvendo também a inibição da ativação de osteoclastos por osteoblastos.

Os bisfosfonatos não-nitrogenados atuam em osteoclastos e nessas células são metabolizados em análogos citotóxicos de adenosina trifosfato (ATP). Ao acumularem-se intracelularmente, além da direta toxicidade, competem com o ATP provocando a apoptose nessas células por falta de suprimento energético (Fleisch, 1998, Russell *et al.*, 1999; Cartsos *et al.*, 2008). Dessa maneira, a reabsorção óssea, principal função dos osteoclastos, fica comprometida.

Os bisfosfonatos nitrogenados induzem a apoptose em osteoclastos ao estimularem análogos citotóxicos de ATP, e ao inibirem a enzima farnesil pirofosfato sintase (FPP), que faz parte da via do mevalonato na síntese do colesterol. Essa

inibição impede a formação de dois metabólitos, o farnesol e o geranylgeraniol, que são essenciais para a prenilação. A prenilação se consiste na conexão com a membrana plasmática de algumas pequenas proteínas; que ao se ligarem ao GTP (guanosina trifosfato) são imprescindíveis para o tráfego de vesículas e manutenção da integridade do citoesqueleto (Green, 2004; Shannon *et al.*, 2011). A taxa de reabsorção óssea é diminuída na medida em que ocorre a inibição do tráfego vesicular na membrana dos osteoclastos (Shannon *et al.*, 2011).

A geranylgeranilação é a ligação do geranylgeranil (um lipídio de 20 carbonos) a determinadas proteínas, como as proteínas-G regulatórias chaves (Rac, Rho, e membros da família Rab), às membranas intracelulares ou à membrana plasmática. A não ocorrência desse processo provoca um bloqueio ou mudança nos eventos sinalizadores, que em última instância, resultam na ativação das caspases e apoptose (Figura 4) (Coxon *et al.*, 1998; Benford *et al.*, 1999; Reska *et al.*, 1999; Vasconcellos *et al.*, 2004). Assim, caracterizou-se a indução da apoptose em osteoclastos por bisfosfonatos como um evento constituído por alterações morfológicas celulares, perda do potencial de membrana da mitocôndria e ativação da caspase, principalmente a efetora 3 (Benford *et al.*, 2001).

Em baixas concentrações, os BPs nitrogenados demonstraram alterar o arranjo do citoesqueleto e diminuir o tráfego vesicular na membrana celular; concentrações intermediárias cessam a diferenciação do osteoclasto; e altas concentrações (100 μ M) levam à apoptose (Kimmel, 2007).

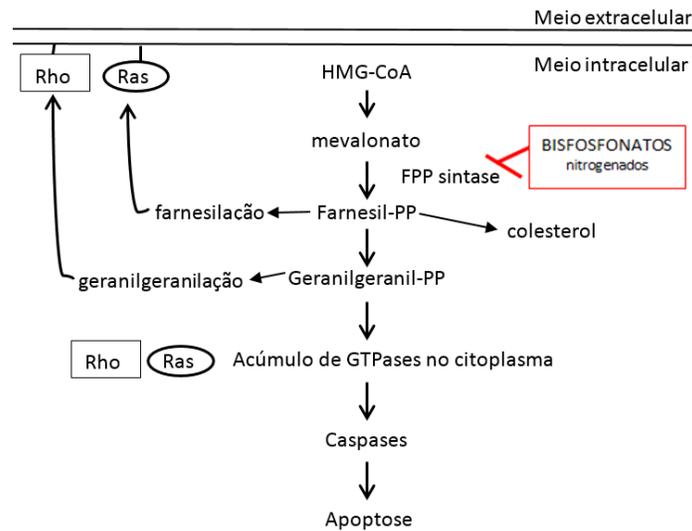


Figura 4: Mecanismo de ação dos bisfosfonatos nitrogenados em osteoclastos.

Os bisfosfonatos nitrogenados induzem a apoptose em osteoclastos ao inibirem a FPP (farnesil pirofosfato) sintase, e dessa maneira, impedirem a prenilação de pequenas GTPases, que são importantes para o tráfego de vesículas e a manutenção da integridade do citoesqueleto. A ancoragem dessas proteínas à membrana plasmática é, dessa maneira, prejudicada, desencadeando uma mudança em eventos sinalizadores que resultam na ativação de caspases e indução de apoptose (adaptado de Vasconcellos *et al.*, 2004).

2.1.5 - Efeito dos bisfosfonatos em células epiteliais

Estudos demonstraram o efeito dos bisfosfonatos em várias células epiteliais como as gastrointestinais, renais, cervicais epiteliais, prostáticas e as da mucosa oral (Landesberg *et al.*, 2011).

A administração de bisfosfonatos nitrogenados orais está relacionada ao desenvolvimento de úlceras e erosões gástricas, como efeitos colaterais conhecidos. Os efeitos tóxicos desses medicamentos em células gastrointestinais foram verificados, *in vitro*, por exemplo, por Twiss *et al.* (1994), utilizando alendronato e pamidronato em células Caco-2 (adenocarcinoma humano epitelial

colo-retal), e Suri *et al.* (2001) com pamidronato em células Caco-2, observando ainda a ocorrência de apoptose celular de maneira concentração-dependente.

Após tratamento com zoledronato, Giraudo *et al.* (2004) verificaram um aumento da apoptose em células epiteliais cervicais, enquanto Montaguea *et al.* (2004) relataram a diminuição da proliferação de células epiteliais prostáticas.

Os efeitos dos bisfosfonatos em células da mucosa, estão sendo muito relatados na literatura. Scheper *et al.* (2008) reportaram ação direta do zoledronato sobre os tecidos da mucosa oral induzindo a apoptose. Simon *et al.* (2010) ainda relataram uma diminuição na produção de colágeno e matriz extracelular em osteoblastos e fibroblastos expostos por um período de 28 dias a zoledronato nas concentrações de 1 a 20 μM ou pamidronato. Cozin *et al.* (2011) verificaram significativa redução da proliferação de fibroblastos gengivais e queratinócitos após 72 h de tratamento com pamidronato (0,06 e 0,01 mmol/L) e com zoledronato (8 μM), concluindo uma maior sensibilidade aos bisfosfonatos dos fibroblastos gengivais quando comparados aos queratinócitos. Os autores também observaram indícios de apoptose após 72 h e 144 h de tratamento dos fibroblastos gengivais com pamidronato mas não com zoledronato, que além da ausência de eventos apoptóticos, manteve os níveis de caspase 3 iguais aos do grupo controle.

Os efeitos dos bisfosfonatos nitrogenados em fibroblastos, osteoblastos e sarcomas osteogênicos foram reportados por Açil *et al.* (2012). Após 7 dias as medicações testadas, com concentrações que variaram de 1 a 20 μM , reduziram significativamente a proliferação celular e a produção de colágeno *in vitro*. Pabst *et al.* (2012) observaram uma diminuição da viabilidade e migração de queratinócitos após 24 h de exposição a 5 μM de ZA, e também apoptose em células tratadas com bisfosfonatos nitrogenados. Sonis *et al.* (2009) verificaram *in vivo* a presença de ulcerações mucosas concomitantes ao aparecimento de lesões osteonecroticas.

Apesar de estudos relacionando a toxicidade de bisfosfonatos nitrogenados aos tecidos epiteliais, não está totalmente elucidado se aqueles

encontrados nos tecidos estão em concentrações suficientes para gerarem efeitos tóxicos (Fleisch, 1998).

2.1. 6 – Infecção bacteriana e OMIB

A microbiota bucal é composta em sua maioria pelos gêneros *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Veillonella* e *Prevotella* (Mager *et al.*, 2003). Amostras biopsiadas de lesões de OMIB indicaram a presença de espécies bacterianas como *Fusobacterium*, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Marx *et al.*, 2005; Mawardi *et al.*, 2011). Wei, *et al.* (2012), em um estudo que avaliou o perfil microbiológico de 12 pacientes com câncer (sendo 6 com OMIB e 6 sem a doença, sem utilização de bisfosfonatos mas com infecção), verificaram que os pacientes com OMIB apresentaram predominância de *Streptococcus* (29%), *Eubacterium* (9%) e *Psdeudoramibacter* (8%), enquanto no grupo sem OMIB predominaram *Parvimonas* (17%), *Streptococcus* (15%) e *Fusobacterium* (15%).

Apesar de alguns dos microorganismos citados representarem bactérias colonizadoras de biofilmes orais ao invés de patógenos invasivos, a importância da microflora bucal para o desenvolvimento de OMIB ainda não está elucidada, bem como os efeitos dos bisfosfonatos sobre o crescimento bacteriano (Kobayashi *et al.*, 2010; Mawardi *et al.*, 2011; Muller *et al.*, 2012).

Streptococcus mutans

O gênero *Streptococcus* está presente na microbiota e também em infecções associadas ou não a OMIB. Um dos representantes desse grupo é a espécie *Streptococcus mutans*, exclusivamente humana e responsável pela patogênese da cárie dentária, sendo colonizadora dessas superfícies e formando, por conseguinte, o biofilme dental. O aumento de sua virulência está relacionado principalmente às características de acidogenicidade (produção de ácidos a partir

do metabolismo de açúcares) e aciduricidade (capacidade de sobrevivência em meios ácidos) (Graner *et al.*, 2005). Poucos estudos verificaram os efeitos de bisfosfonatos sobre *S. mutans*, sendo que Kobayashi *et al.* (2010) relataram um aumento da ligação da bactéria à hidroxiapatita após o terapia com ácido zoledrônico.

A antibioticoterapia consiste em um dos tratamentos da OMIB por auxiliar no controle da infecção muitas vezes presente (Forsgren *et al.*, 2011); porém, pouco se determinou sobre a efetividade de sua utilização. No estudo de Ji *et al.* (2012), realizado com 20 pacientes portadores da OMIB (sendo 10 submetidos à terapia com antibióticos sistêmicos e 10 sem o emprego de antibiótico previamente), os autores verificaram que a terapia antibiótica oral apresentava eficácia limitada para o tratamento de OMIB, já que o uso da medicação não diminuiu a infecção mas selecionou a população bacteriana presente. Apesar de pesquisas que demonstraram a ausência de efeitos do extrato de *A. chica* sobre o gênero *Streptococcus* (Duarte, 2006; Mafioleti *et al.*, 2013), não há relatos na literatura empregando-se o extrato da planta em combinação com os bisfosfonatos, o que possibilitaria a simulação de uma condição clínica de OMIB.

2.1. 7 – Tratamento de OMIB

O tratamento de OMIB ainda é controverso. As principais medidas adotadas são a limpeza local, remoção de sequestro ósseo e a administração de antibióticos (Forsgren *et al.*, 2011).

Alguns estudos propuseram alternativas de tratamento que incluem: a reposição de geranylgeraniol, que é bloqueado pelos bisfosfonatos nitrogenados (Marcuzzi *et al.*, 2011; Ziebart *et al.*, 2011); a utilização de fator de crescimento plaquetário (PDGF) associada a um biomaterial; o uso de um citoprotetor como o dexrazoxane e a laserterapia.

O geranilgeraniol, na concentração de 10 μM , conseguiu reverter a ação tóxica, em fibroblastos e osteoblastos, do zoledronato 50 μM . Enquanto o bisfosfonato reduziu a viabilidade das células para 20 e 30%, o geranilgeraniol aumentou para 70 e 80% (Ziebart *et al.*, 2011). A utilização de PDGF associado a um biomaterial foi testada por Adornato *et al.* (2007) no tratamento de OMIB. Draenert *et al.* (2012) relataram um efeito citoprotetor com a utilização de dexrazoxane, um cardioprotetor empregado na quimioterapia por antraciclina, na concentração de 600 μM quando em co-tratamento com ácido zoledrônico 50 μM . Outra forma de tratamento descrita é a laserterapia. Os lasers de alta e de baixa potência têm apresentado resultados importantes para o auxílio da melhora dos sintomas de OMIB, e sua associação à terapia farmacológica tem sido sugerida (Martins *et al.*, 2012).

Apesar dos avanços médicos e da grande quantidade de pesquisas, o tratamento adequado para OMIB, bem como suas causas e mecanismos envolvidos precisam ser melhor elucidados, indicando que a prevenção ainda representa a melhor forma de tratamento.

2.2 – Linhagens celulares: células epiteliais, osteoblásticas e tumorais

2.2. 1 - Queratinócitos

Os queratinócitos são o tipo celular mais comum da epiderme. O nome origina da característica dessa célula em produzir queratina, principal responsável pela impermeabilidade epitelial. O desenvolvimento desse tipo celular começa no estrato basal da epiderme (camada mais interna) e na medida em que as células se maturam ocorre a diferenciação para corneócitos, durante movimentação para o estrato córneo, onde formam uma barreira para a proteção do organismo contra germes e desidratação. Os queratinócitos participam ativamente da resposta imune,

processo inflamatório e cicatrização, já que são capazes de sintetizar grande parte de citocinas, fatores de crescimento e co-fatores (Wiegand & Hipler, 2009).

A linhagem celular HaCaT (Figura 5) representa queratinócitos imortalizados espontaneamente e muito utilizados para estudos *in vitro*. Originaram-se a partir do isolamento de células periféricas distante de um melanoma localizado na parte superior das costas de um homem de 62 anos de idade (Boukamp *et al.*, 1988). As células HaCaT são praticamente imortais e com uma possibilidade de cultivo por mais de 140 passagens. Apesar de apresentarem um fenótipo alterado *in vitro*, não são tumorigênicas, demonstram uma expressão constante de queratinas específicas e outros marcadores de identificação, e também uma diferenciação normal (Wiegand & Hipler, 2009).

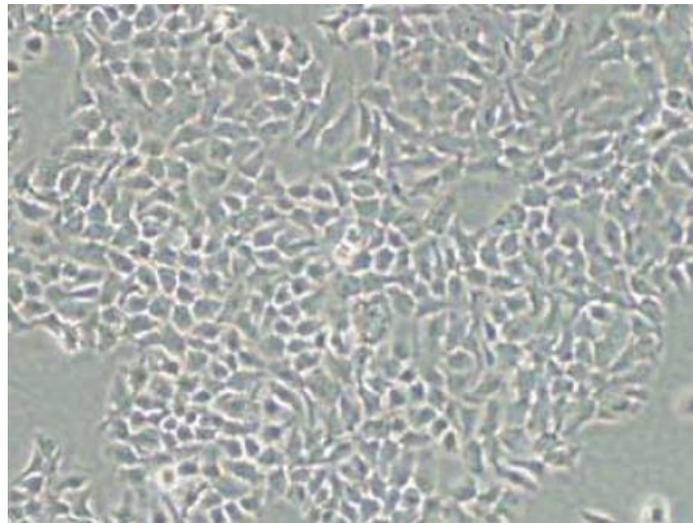


Figura 5: Imagem de queratinócitos HaCaT.

Fonte: Yang *et al.*, 2010.

2.2. 2 - Fibroblastos

Os fibroblastos (Figura 6) são células do tecido conjuntivo essenciais para a formação da derme e da mucosa; sendo também responsáveis pela firmeza estrutural e secreção de colágeno (Pimentel, 2001). A manutenção da integridade

estrutural é a sua principal função, e para isso secretam também outras macromoléculas residentes da matriz extracelular, como glicosaminoglicanos e glicoproteínas (Wiegand & Hipler, 2009). Após a lesão tecidual, os fibroblastos próximos proliferam, migram para a ferida e produzem grande quantidade de matriz rica em colágeno (tipo I e III), que ajuda a isolar e reparar o tecido lesado. O gene de actina tem então sua expressão aumentada nessas células, chamadas agora de *miofibroblastos*, o que permite que elas adquiram algumas das propriedades contráteis das células musculares lisas, auxiliando a aproximação das margens do ferimento. Essa transformação é estimulada por fatores de crescimento como TGF- β , PDGF e IGF-I e IGF-II (Balbino *et al.*, 2005).

Nos tecidos moles periodontais, os fibroblastos também são residentes e predominantes, onde são responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular (Ten Cate, 1989).

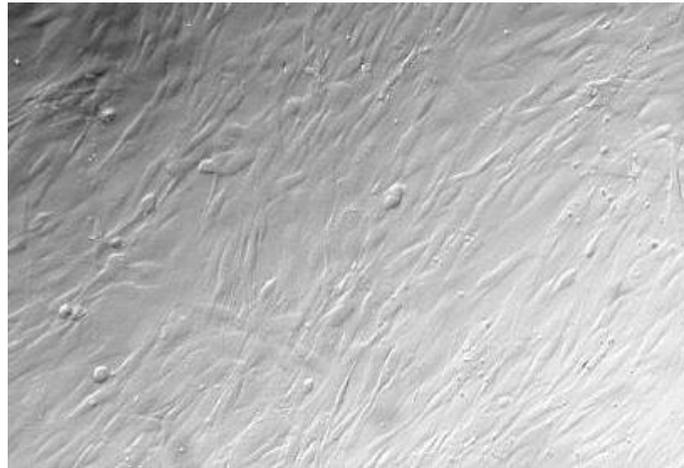


Figura 6: Imagem de fibroblastos primários PT64-04HF (aumento de 5x).

2.2. 3 - Osteoblastos

Osteoblastos são células mononucleares responsáveis pela produção do osso. Pode-se dizer que são fibroblastos especializados que expressam, além dos produtos comuns aos fibroblastos, glicoproteínas ósseas e proteínas de ligação de

cálcio (osteocalcina). Produzem ainda uma matriz osteoide composta, principalmente, de colágeno tipo I e são responsáveis pela mineralização dessa matriz. Dessa maneira, expressam fosfatases alcalinas que, juntamente com o colágeno tipo I, são marcadores da atividade osteoblástica (Murshed *et al.*, 2005).

O osso é um tecido dinâmico e está em constante remodelação, o que é realizado por osteoblastos (formadores da matriz mineral) e osteoclastos (responsáveis pela reabsorção óssea) (Lerner, 2004). Durante a remodelação óssea, pré-osteoblastos migram para áreas de reabsorção óssea, lá se diferenciam em osteoblastos maduros e iniciam a atividade de mineralização (Kodama *et al.*, 1981).

As células MC3T3-E1 (Figura 7) são pré-osteoblastos derivados da calvária de ratos (Kodama *et al.*, 1981).

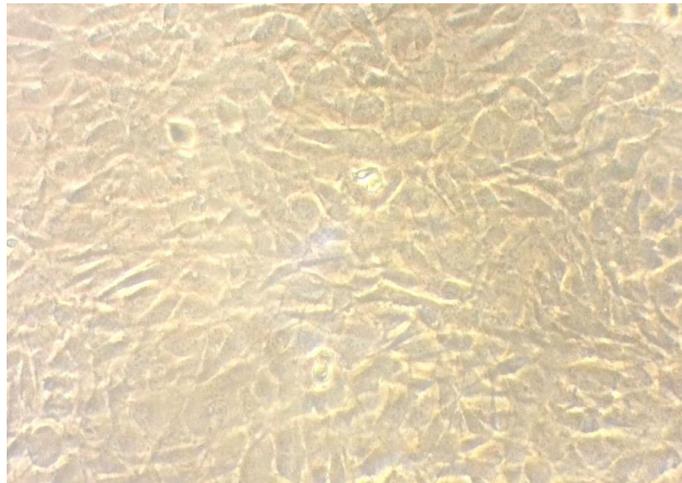


Figura 7: Imagem de pré-osteoblastos MC3T3-E1 (aumento de 5x).

2.2. 4 – Células de câncer de próstata com características osteoblásticas (C4-2B)

A linhagem LNCaP representa células originárias de um adenocarcinoma de próstata, sensíveis a andrógeno e que podem crescer em agregados ou isoladamente (Horoszewicz *et al.*, 1983). Os estudos *in vitro* de câncer de próstata procuram mimetizar situações onde há a progressão da doença, como a situação onde ocorre a diferenciação das células tumorais para um estado não andrógeno-sensível e potencialmente metastático. As células DU 145 e PC3 são não-hormônio sensíveis, no entanto, não provocam metástases ósseas (Lin *et al.*, 2001).

A sub-linhagem C4 foi elaborada por Wu *et al.* (1994) ao desenvolverem tumores em ratos imunocomprometidos a partir da introdução de células LNCaP e fibroblastos ósseos humanos. Durante o experimento, os animais foram castrados para a reprodução de um perfil tumoral resistente a hormônios andrógenos. Para o desenvolvimento de uma linhagem mais representativa, as células C4 foram posteriormente injetadas novamente em ratos juntamente com fibroblastos humanos, e os tumores resultantes formaram a sub-linhagem C4-2.

As células C4-2B (Figura 8) são originárias de pesquisas para o desenvolvimento de uma linhagem de metástase óssea a partir das células epiteliais tumorais da próstata: as células C4-2 foram injetadas em ratos para a formação de tumores; os tumores ósseos formados tiveram as suas células isoladas, as quais deram origem à sub-linhagem C4-2B (Lin *et al.*, 2001). Essas células são epiteliais mas expressam muitas características osteoblásticas.

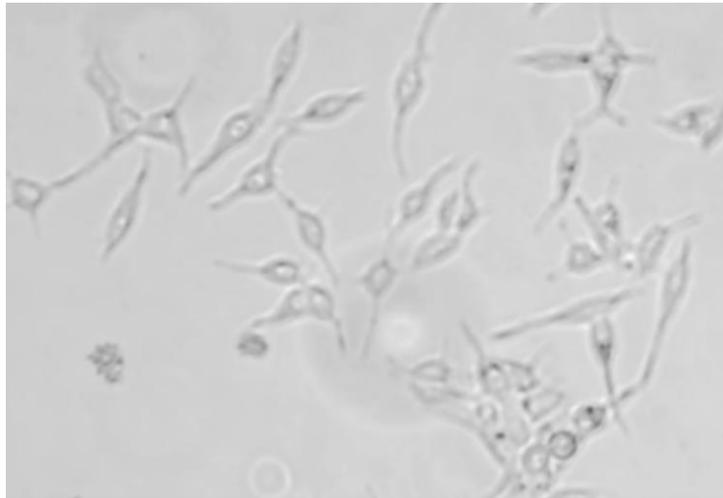


Figura 8: Imagem de células de câncer de próstata com características osteoblásticas C4-2B (aumento de 5x).

2.3 - Apoptose e Caspases

Os processos de morte celular são classificados de acordo com as características das alterações morfológicas e bioquímicas sofridas pela célula. A apoptose é uma morte celular programada que ocorre de maneira ordenada e com gasto de energia. De maneira geral, acontece rapidamente, sem a perda morfológica das organelas e com a condensação da cromatina, redução do volume celular e quebra do DNA em pequenos fragmentos (Koopman *et al.*, 1994; Grivicich *et al.*, 2007). A necrose, por sua vez, representa uma morte celular desordenada, patológica e geralmente causada por uma lesão irreversível à célula. Nessa situação, ocorre um aumento do volume, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, ruptura da membrana plasmática e consequente liberação do conteúdo celular, decorrentes de uma injúria sofrida pela célula (Ziegler & Groscurth, 2004; Grivicich *et al.*, 2007).

A ocorrência de um evento apoptótico está relacionado à ativação de algumas proteases, baseadas em cisteína, chamadas caspases. Ao serem ativadas, iniciam a “cascata de caspases” através da clivagem de outras pró-

caspases (forma inativa). Existem dois tipos de caspases: iniciadoras e efetoras. As iniciadoras clivam as pró-formas inativas das efetoras, ativando-as; as efetoras, como a 3 e a 7, atuam clivando outros substratos proteicos das células e provocando o evento de apoptose (Grivicich *et al.*, 2007).

Durante a apoptose, resíduos de fosfatidilserina, os quais normalmente estão localizados na superfície interna da membrana plasmática, se redistribuem para a superfície externa. É a fosfatidilserina que se liga à proteína anexina V. A identificação das células em apoptose através de citometria de fluxo é permitida pela conjugação da anexina V a um fluoróforo, como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Koopman *et al.*, 1994; Schmid *et al.*, 1994). Com a continuidade do processo a membrana plasmática torna-se cada vez mais permeável, permitindo, por exemplo, a entrada no interior da célula de um intercalante fluorescente que se liga ao DNA, como a 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (Schmid *et al.*, 1994).

2.4 - Plantas medicinais e fitoterápicos

Entre os anos 1981 e 2011, verificou-se que grande parte das moléculas que apresentaram potencial terapêutico eram, direta ou indiretamente, de origem natural (Newman e Cragg, 2012).

O Brasil é um país com grande patrimônio genético e biodiversidade, e nesse contexto, há muito a ser desenvolvido para possibilitar o aproveitamento de suas plantas medicinais e o desenvolvimento de futuros fitoterápicos. O Ministério da Saúde publicou em fevereiro de 2009 a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Sistema Único de Saúde - Rennisus – Brasil, 2009), que além de estimular o desenvolvimento de fitoterápicos nacionais, visava melhorias na atenção à saúde e condições de inclusão social para a população (Brasil, 2006).

Muitas das espécies que fazem parte do Rennisus ainda necessitam de estudos complementares para validação de sua eficácia e segurança, pois se tratam ocasionalmente, de plantas nativas ou exóticas adaptadas e de uso popular

bastante estabelecido. Dentre as principais espécies citadas, tem-se a *Arrabidaea chica* (Humb & Bonpl.) Verlot (Brasil, 2009).

2.4. 1 - *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot:

Membro da família Bignoniaceae, que abrange 120 gêneros e 800 espécies, *Arrabidaea chica* se distribui pela América tropical desde o sul do México até o Brasil central (Devia *et al.*, 2002). Popularmente *A. chica* é conhecida como pariri (no Pará), crajiru (no Amazonas), puca-panga, coapiranga, chica ou cipó-cruz (Von-Poser, 2000).

No nordeste do Brasil, *A. chica* é usada em tatuagens pelos índios devido aos pigmentos carajurina e carajurona (Corrêa, 1926; Chapman *et al.*, 1927; Zorn *et al.*, 2001). As folhas, submetidas à fermentação e manipuladas como as anileiras (*Indigofera* spp.), fornecem matéria corante vermelho-escuro ou vermelho-tijolo. Algumas tribos utilizam uma infusão para o tratamento de conjuntivite aguda, e uma pasta, na forma de cataplasma, contra ataques de insetos. Na medicina popular, as folhas dessa espécie são usadas na preparação de chás com propriedades adstringentes para o tratamento de diarreia, anemia, leucemia, icterícia e albuminúria. Quando aplicada topicamente, são atribuídos à espécie *A. chica* propriedades terapêuticas para enfermidades da pele (psoríase, feridas e úlceras) (Takemura *et al.*, 1995).

Há ainda relatos de eficácia como anti-inflamatório e contra câncer de boca, de útero e leucemia (Kalil Filho *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2010); eficácia contra dermatófitos de *Trypanosoma cruzi* (*Trichophyton mentagrophytes*) (Barbosa *et al.*, 2008) e contra espécies de *Candida* (extrato diclorometano de *A. chica*) (Hofling *et al.*, 2010). Mafioleti *et al.* (2013) reportaram inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* (com uma concentração inibitória mínima – CIM - de 12,5 µg mL⁻¹) e *Enterococcus faecalis* (CIM de 100 µg mL⁻¹) promovida pelo extrato hidroalcoólico de *A. chica*, mas não encontraram atividade contra espécies de *Candida*. Medeiros

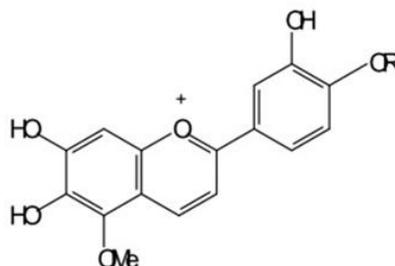
et al. (2011) verificaram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *A. chica* reduziu os níveis de GTP (transaminase glutâmico pirúvica), GOT (transaminase glutâmico oxalacética) e da bilirrubina plasmática, em ratos; apresentando portanto, efeitos de citoproteção hepática. Aro *et al.* (2013 a, b) verificaram que o tratamento com o extrato hidroalcoólico das folhas de *A. chica* em ratos com lesões parciais no tendão de aquiles ou calcâneo, proporcionou um aumento numérico e uma melhor organização das fibras colágenas e melhora da marcha nos animais. Siraichi *et al.* (2013b) estudaram a penetração do extrato hidroalcoólico de *A. chica* na pele de animais, com o objetivo de verificar efeitos de proteção contra radiação UVA e UVB. Os resultados foram semelhantes aos de protetores solares comerciais, e o extrato ainda permaneceu na pele por pelo menos 180 minutos após sua aplicação.

Uma ampla revisão bibliográfica indicou que o gênero *Arrabidaea* era fonte de antocianinas, flavonoides e taninos (Harborne, 1967; Takemura, 1995; Zorn *et al.*, 2001; Alcerito, 2002; Devia *et al.*, 2002; Pauletti *et al.*, 2003; Mafioletti *et al.*, 2013). Magalhães *et al.* (2009) identificaram o ferro (38,4 - 115,5 $\mu\text{g g}^{-1}$) como o mineral mais abundante nas folhas secas de *A. chica*, enquanto o magnésio esteve em evidência em infusões preparadas a partir da folha (45,6 – 63,6%). Medeiros *et al.* (2011) verificaram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *A. chica* apresentou substâncias como quinonas e flavonóides.

O primeiro estudo fitoquímico das folhas de *A. chica* relata o isolamento da 3-deoxiantocianidina carajurina (Chapman *et al.*, 1927). Posteriormente, Scogin (1980) e Harborne & Willians (2001) propuseram que a ocorrência deste raro pigmento em Bignoniaceae era provavelmente restrita a *A. chica*. Estudos posteriores resultaram no isolamento de antocianinas, fito-esteróis, 7,4'-di-hidroxi-5-metaxiflavona e 6,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavona (carajuruflavona) (Takemura *et al.*, 1995).

Williams & Grayer (2004) citaram o isolamento de agliconas destacando-se a 3-deoxiantocianidina, a 6,7,3'-tri-hidroxi-5-dimetoxiflavilio (**1**) e a 6,7,3',4'-tetra-

hidroxi-5-metoxi-flavílio (**2**) (Figura 9), provenientes das partes aéreas da *A. chica* juntamente com a conhecida 6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio (carajurina).



1 R = CH₃

2 R = H

Figura 9: Agliconas isoladas das folhas de *A. chica*.

As antocianinas são pigmentos naturais pertencentes à família dos compostos fenólicos, da qual também fazem parte os flavonoides e fenilpropanoides. Apresentam um esqueleto básico C₃C₆C₃, mas diferem dos demais compostos de sua família por apresentarem coloração intensa, um maior grau de oxidação e por serem glicosiladas (Harborne, 1967). Devido à sua grande instabilidade, ou reatividade, raramente são isoladas e identificadas.

Componentes de muitas frutas vermelhas e hortaliças escuras (Moon *et al.*, 2006), as antocianinas desempenham importante papel nas interações de insetos com plantas para a polinização e dispersão de sementes, e também nas interações alelopáticas ligadas à defesa contra insetos predadores. Outros benefícios apresentados pela classe estão relacionados às suas propriedades antioxidantes, por serem carreadores diretos de radicais livres e assim, desempenharem papel significativo no combate a doenças metabólicas e suas complicações (Kong *et al.*, 2003; Tsuda *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2007; Valcheva-Kuzmanova *et al.*, 2007; Zafra-Stone *et al.*, 2007), como na

prevenção de doenças cardiovasculares, modulação da inflamação, inibição da agregação plaquetária, e na prevenção e progressão do câncer (Volp *et al.*, 2008).

O resíduo de açúcar, presente nas antocianinas, pode ser facilmente hidrolisado por aquecimento com HCl 2N (hidrólise ácida), resultando em uma aglicona chamada antocianidina, que em sua estrutura básica apresenta o cátion 2-fenilbenzopirílio.

As antocianidinas mais frequentes na natureza são perlagonidina, cianidina, peonidina, petunidina e malvidina. Os açúcares mais encontrados nessas moléculas são a glicose, ramnose, galactose e arabinose (Mazza & Miniati, 1993). Estes açúcares ocorrem como monoglicosídeos e triglicosídeos substituídos diretamente na glicona nas posições 3, 5 e 7 (Oliveira, 2001).

Os principais pigmentos da espécie *A. chica*, são as desoxiantocianidinas: 6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavílio (pigmento 1), 6,7- tri-hidroxi-5-metoxiflavílio (pigmento 2) e 6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio (pigmento 3 - carajurina) (Figura 10).

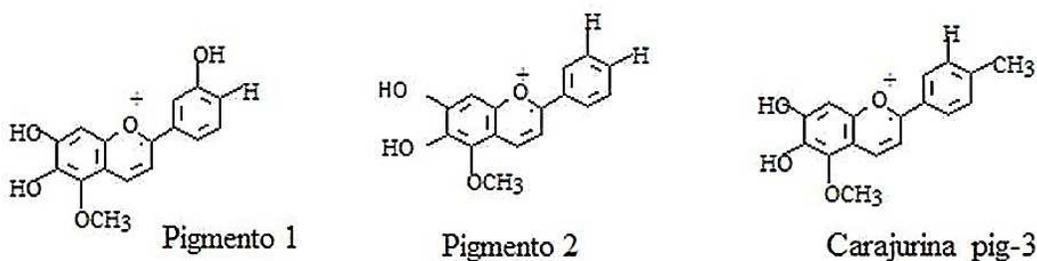


Figura 10: Estrutura química dos pigmentos de *A. chica*.

Pigmento 1: 6,7,3',4'- tetra-hidroxi-5- metoxiflavílio; pigmento 2: 6,7- tri-hidroxi-5- metoxiflavílio; pigmento 3 carajurina: 6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio.

Jorge *et al.* (2008) verificaram que o extrato bruto de *A. chica* estimulou o crescimento de fibroblastos, *in vitro*, de forma proporcional à concentração

utilizada e com atividade similar ao controle positivo alantoína. Já o aumento da produção de colágeno foi semelhante ao do ácido ascórbico. O extrato bruto demonstrou moderada ação antioxidante, observada através dos ensaios de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e Folin-Ciocalteu. Além disso, reduziu em 96% a área cutânea ulcerada após dez dias de tratamento em ratos (modelos experimentais do processo de cicatrização), com a aplicação tópica na concentração de 100 mg mL⁻¹. Neste mesmo experimento, a solução salina (controle negativo) reduziu somente em 36% a ferida. Em modelos de úlcera gástrica, em ratos, o extrato bruto de *A. chica*, reduziu o índice de lesões em 90%. Apesar do uso popular em processos inflamatórios, esse extrato não diminuiu os edemas de pata induzidos por carragenina, ou de orelha induzidos por óleo de cróton. Esses resultados permitiram concluir que o extrato bruto de *A. chica* possui princípios ativos que ativam o processo cicatricial, através da proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, confirmando o uso popular para efeitos cicatrizantes da espécie.

2.4.1.1 - Toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de extratos de *Arrabidaea chica*

Siraichi *et al.* (2013b) reportaram a segurança da utilização do extrato de *A. chica* ou suas frações após testes de toxicidade em pele e mucosa de ratos. Mafioleti *et al.* (2013) em um estudo de toxicidade de 30 dias, relataram que concentrações do extrato da planta de até 3000 mg mL⁻¹, via oral, não causaram qualquer sinal de intoxicação aguda em ratos. A administração oral por 30 dias também não demonstrou evidências de toxicidade subcrônica. *In vitro*, concentrações do extrato que variaram de 3,12 a 200 µg mL⁻¹, não apresentaram citotoxicidade para células CHO-K1 (células epiteliais do ovário de hamster chineses) por um período de até 72h.

Dos Santos *et al.* (2013), estudaram o potencial mutagênico genotóxico e antígenotóxico da fração clorofórmica do extrato das folhas de *A. chica*, onde estavam presentes metabólitos bioativos. Os estudos envolveram avaliações *in*

vitro, com o teste da Salmonella, e *in vivo*, o teste do micronúcleo feito a partir da medula óssea de ratos. Os autores verificaram que a fração não apresentou qualquer potencial mutagênico ou genotóxico. Dessa forma, pode-se inferir que o extrato de *A. chica* é geneticamente seguro para a utilização em pessoas e animais.

2.5 - Microencapsulação

Os polifenóis têm despertado grande interesse nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética devido aos potenciais benefícios para a saúde que podem apresentar.

A eficácia ou a eficiência desses compostos, como as antocianidinas, depende de fatores como a via de administração, a biodisponibilidade e a integridade de suas moléculas. A baixa solubilidade e/ou permeabilidade impedem que sejam bem absorvidos por via oral, apresentando instabilidade no trato gastrointestinal devido à presença de enzimas e dos diferentes valores de pH. Esses compostos podem se oxidar de maneira rápida dependendo das condições ambientais, o que provoca a mudança de seu aspecto para uma cor marrom e a liberação de odores, indicativos muitas vezes da perda de atividade. A partir disso, cuidados adicionais com relação ao processamento industrial, transporte e estocagem devem ser considerados (Munin & Edwards-Lévy, 2011).

O desenvolvimento de formulações que visem à manutenção estrutural das moléculas ativas de um fármaco, até que seja consumido, administrado ou absorvido, é essencial para a garantia de sua eficácia e atividade. Nesse contexto, a microencapsulação apresenta-se como um dos principais métodos a serem empregados (Fang e Bhandari, 2010; Munin & Edwards-Lévy, 2011).

A encapsulação envolve o recobrimento de um recheio (pequenas partículas de sólidos, gotículas de líquido ou materiais gasosos) por um material formador de parede. O objetivo do processo consiste no isolamento da substância

de interesse, protegendo-a de condições adversas como oxigênio, luz e umidade, e aumentando-se a vida útil do produto (Sparks, 1981; Shahidi & Han 1993).

Pode-se citar como objetivos da encapsulação de compostos ativos (Munin & Edwards-Lévy, 2011):

- proteção de compostos sensíveis às condições ambientais diversas (oxigênio, umidade, luz, etc.);
- proteção dos usuários contra efeitos colaterais do composto;
- camuflagem de aromas, cores ou sabores presentes nos compostos;
- modificação da densidade de um líquido;
- transformação de um líquido em sólido;
- isolamento de dois compostos incompatíveis que devem coexistir;
- promoção de uma liberação controlada do composto ativo;

As microcápsulas são partículas com diâmetro entre 0,2 e 500 μm , sendo que seu material de parede atua como um filme protetor, podendo formar membranas contínuas ou porosas de diferentes tamanhos e formatos, de acordo com o processo e o encapsulante utilizados (Salib, 1997; Ré, 2000). A arquitetura define as microcápsulas do tipo reservatório, onde o núcleo fica concentrado próximo ao centro e é rodeado por um filme contínuo, ou do tipo matriz, onde o núcleo é disperso uniformemente pela mesma (Ré, 1998).

Inúmeras técnicas permitem microencapsular um material ativo, dentre elas um método físico denominado atomização (*spray drying*) (Jackson & Lee, 1991; Risch & Reineccius, 1988; Shahidi & Han, 1993). Segundo Wendel & Çelik (1998), Filková & Mujumdar (1995), embora o *spray drying* seja uma tecnologia inicialmente cara, em razão do alto custo do equipamento, muitas são as razões pelas quais ela é muito utilizada.

2.5. 1 - Atomização (*spray drying*)

A técnica de *spray drying* é responsável pelo crescimento dos produtos fitofarmacêuticos devido à sua tecnologia em secagem de extratos. Mais de 70% dos 512 medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil, são formas farmacêuticas sólidas (Carvalho *et al.*, 2008). Os extratos vegetais secos apresentam muitas vantagens, como a manutenção da estabilidade química, físico-química e microbiológica além da facilitação da padronização e concentração dos compostos ativos (Oliveira e Petrovick, 2010).

O método de secagem por atomização (ou *spray drying*), pode ser definido como a transformação de um material fluido (solução, dispersão ou pasta) para uma partícula seca na forma de pó (Ré, 1998). O processo é contínuo e envolve as etapas de formação de uma emulsão (ou suspensão) do agente encapsulante com o material ativo, atomização em câmara de secagem contendo ar quente circulando (ar ou nitrogênio) e a evaporação do solvente e consequente secagem das gotículas atomizadas (Jackson & Lee 1991; Shahidi & Han, 1993) (Figura 11). A rápida evaporação provocada pela técnica mantém a temperatura das gotículas relativamente baixas, sem afetar o produto final (Filková & Mujumdar, 1995; Ré, 2000). O equipamento utilizado na técnica é o *spray dryer*, amplamente empregado para a obtenção de microcápsulas e de simples utilização. Maior produtividade pode ser obtida ajustando-se as variáveis do processo, entre estas: temperatura do ar de entrada e saída, fluxo de ar ou fluído de arraste, distribuição de temperatura e umidade (Filková & Mujumdar, 1995).

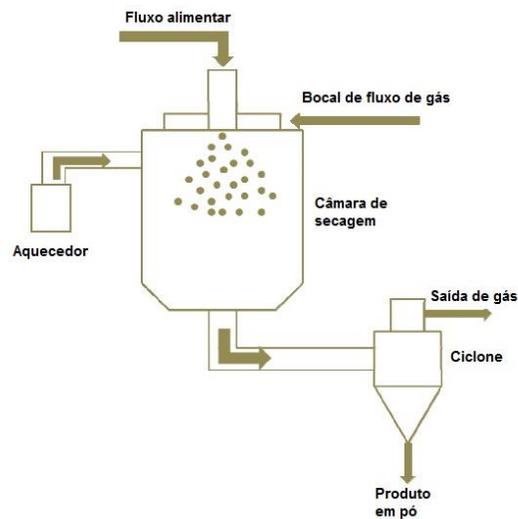


Figura 11: Esquema representativo do processo de *spray drying* (adaptado de Munin & Edwards-Lévy, 2011).

2.5. 2 - Material formador de parede

A seleção do material formador de parede (agente encapsulante) depende de uma série de fatores como a não reatividade com o material a ser encapsulado, as propriedades físico-químicas do material (massa molar, solubilidade e difusibilidade), o processo utilizado para fabricação das microcápsulas e a aplicação final destas (Jackson & Lee, 1991). Carboidratos, celuloses, lipídios, proteínas, gomas e quitosana, extraída da casca de crustáceos (Suave, 2006) são exemplos de materiais que podem ser empregados na microencapsulação de compostos, sendo que a goma arábica e a maltodextrina são os mais utilizados.

A goma arábica é um exsudato obtido do tronco e dos ramos de duas espécies de *Acacia* da região subsaariana, em especial *Acacia senegal* L, após sofrerem algum dano. Essa resina natural, de coloração variando de amarelo a cinza claro, é composta por polissacarídeos e glicoproteínas, e vastamente utilizada como material encapsulante devido à sua excelente propriedade emulsificante,

estabilizante e de proteção contra oxidação (Robbers *et al.*, 1997; Buffo *et al.*, 2001) (Figura 12).



Figura 12: Goma arábica.

Fonte: http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/222.pdf

As maltodextrinas, por sua vez, são produtos da hidrólise ácida ou enzimática do amido de milho que resultam em polímeros de glicose (polissacarídeos) (Figura 13): $\alpha(1-4)$ -linked D-glucose, disponíveis como sólidos brancos ou soluções concentradas. São bastante hidrossolúveis e higroscópicas, e se armazenadas em ambientes com alta umidade, suas partículas se aglutinam e passam da condição de “sólido” para “gel de sorção” (Radosta *et al.*, 1989). Dentre as suas principais características têm-se: excelente proteção contra oxidação de voláteis encapsulados, ausência de capacidade emulsificante, baixa retenção de voláteis e proteção termal, este último essencial para a preservação das antocianinas durante o processo de encapsulação (Inglett *et al.*, 1988; Reineccius, 1991; Ré, 1998; Munin & Edwards-Lévy, 2011). Propriedades físicas como a boa solubilidade e baixa viscosidade em altas concentrações sólidas, permitiram bons resultados em seu emprego como agente microencapsulante formado através de *spray drying*, como os pós higroscópicos de sucos de fruta (Reineccius, 1991; Goubet *et al.*, 1998; Cano-Chauca *et al.*, 2005; Wang & Zhou, 2011; da Costa *et al.*, 2012).

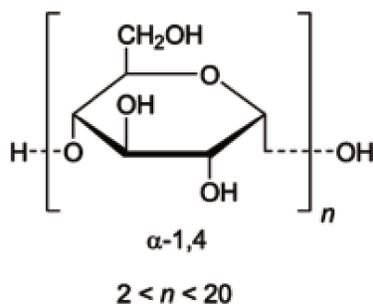


Figura 13: Estrutura química da maltodextrina.

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/>

Utilizadas sozinhas ou em combinação com outros materiais para o processamento de comidas, extratos vegetais, aditivos aromáticos, carotenóides e vitaminas, as maltodextrinas são o material de revestimento mais empregado para os compostos antociânicos utilizados em alimentos (Pierucci *et al.*, 2007; Bae & Lee, 2008; Sadeghi *et al.*, 2008; Cavalcanti *et al.* 2011). No entanto, a sua baixa temperatura de transição vítrea (temperatura na qual um sólido amorfo, como o vidro, fica macio com o aquecimento e quebradiço com o resfriamento e que permite a formação de cristais com o aumento da temperatura), pode proporcionar a ruptura da integridade da matriz da parede, e produzir aglomerados de pós microparticulados (Bae & Lee, 2008; Drusch *et al.*, 2006; Sansone *et al.*, 2011).

Apesar das vantagens apresentadas pela maltodextrina na encapsulação de compostos antociânicos, há a possibilidade de degradação dos produtos durante o período de armazenamento. Assim é necessário que a maltodextrina, como formadora de parede, seja utilizada de maneira mais eficiente (Sansone *et al.*, 2011), o que pode ser proporcionado misturando-a a diferentes agentes encapsulantes (Ré 1998; Fernandes *et al.*, 2008; Bae & Lee, 2008), sendo a goma arábica o principal deles (Munin & Edwards-Lévy, 2011). Os resultados obtidos por Thevenet (1995) indicaram que a mistura de goma arábica e maltodextrina foi quase tão vantajosa quanto a goma arábica pura para estabilização oxidativa de óleo essencial de laranja. Pirocianidinas de sementes de uva têm sido encapsuladas com

mistura de goma arábica (40%) e maltodextrina (60%) com bons resultados de formação de microcápsulas e manutenção da estabilidade do composto ativo (Zhang *et al.*, 2007).

2.6 - Estabilidade de fitoterápicos

A estabilidade é definida como o “tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação (Silva *et al.*, 2009)”.

A alta complexidade das moléculas fitoterápicas faz com que suas formulações apresentem uma maior tendência a alterações físicas e químicas. Nesse contexto, a análise da estabilidade de uma formulação é essencial para a determinação de condições de estocagem e tempo de validade (Kopleman e Ausgsburger, 2001).

Medicamentos são formados por um ou mais compostos ativos, excipientes e veículos que estão sujeitos a reagirem entre si. Alterações de cor, odor e sabor muitas vezes são características de determinados fitoterápicos, e por isso devem ser cuidadosamente avaliados em um estudo de estabilidade (Veiga Junior, 2005).

No Brasil, a reponsabilidade em garantir a segurança, a qualidade e eficácia dos produtos previamente à sua comercialização e/ou importação é da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esse órgão também rege normas para os estudos de estabilidade, importantes na determinação de condições de armazenamento e prazo de validade dos fármacos. De acordo com a RE 01/2005 (Brasil, 2005), são preconizados três tipo de estudos mandatórios para o registro de medicamentos pela ANVISA:

- Estudo de estabilidade acelerado: as amostras são acondicionadas em sua embalagem primária e submetidas à temperatura de 40 °C e umidade relativa (UR) de 75%. A UR deve ser controlada para o caso de embalagens semi-permeáveis, o que não é necessário para embalagens impermeáveis;

- Estudo de estabilidade de longa duração: objetiva a confirmação de prazos de validade e condições de armazenamento ou a recomendação de tais parâmetros. A temperatura deve ser mantida a 30 °C, as condições de umidade são as mesmas do estudo de estabilidade acelerado e o tempo deve ser determinado de acordo com o prazo de validade que deve ser consolidado;

- Estudo de estabilidade de acompanhamento: verifica se as características do medicamento mantêm-se de acordo com as demonstradas no estudo de longa duração. O intervalo de realização é de 12 meses.

Durante os estudos as amostras devem ser removidas das condições propostas de armazenamento em tempos pré-determinados, para serem então analisadas. Empregam-se avaliações de doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução e pH (quando aplicáveis) (Brasil, 2005).

Os efeitos tipicamente envolvidos na degradação de fármacos e avaliados em testes de estabilidade, são (Silva *et al.*, 2009):

- Hidrólise: a água é um dos principais catalisadores de reações de degradação. Muitos fármacos são instáveis em meio aquoso, o que exige o desenvolvimento de formulações para que a estabilidade e forma farmacêutica final sejam mantidas. O monitoramento e avaliação do pH do meio também é importante durante a avaliação de condições de instabilidade de produtos, já que os íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação;

- Oxidação: responsável pela instabilidade de fármacos, principalmente esteróides, antibióticos, vitaminas, óleos e gorduras. A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo

eletronegativo ou radical. Esse processo muitas vezes ocorre em cadeia, sob influência do oxigênio molecular, o que é denominado auto-oxidação;

- Fotólise: iniciada após a absorção de radiação eletromagnética emitida por uma fonte, por exemplo a luz solar. Grande parte dos medicamentos apresenta máxima absorção no espectro eletromagnético na região ultravioleta (UV), que pode fotolizar e/ou degradar muitas ligações químicas. O conhecimento da fotoestabilidade dos princípios ativos dos fármacos que serão produzidos é essencial na garantia de sua estabilidade e ausência de toxicidade (Moriwaki *et al.*, 2001). Os produtos farmacêuticos podem ser protegidos da decomposição pela luz através do armazenamento em ambiente escuro ou em recipientes de vidro colorido. Os vidros de cor âmbar filtram comprimentos de onda luminosos menores que 470 nm, oferecendo proteção contra raios UV (ICH, 1996).

A partir dos estudos que demonstraram a efetividade do extrato de *A. chica* em induzir além da proliferação de fibroblastos *in vitro*, um efeito cicatricial epitelial *in vivo* (Jorge *et al.*, 2008), este trabalho visou o estudo destes efeitos em uma situação mimetizadora, *in vitro*, da osteonecrose maxilar induzida por bisfosfonatos. Assim, houve a introdução em meio de cultura celular de um bisfosfonato como o ácido zoledrônico, muitas vezes combinado ao extrato de *A. chica* e o estudo da viabilidade celular de queratinócitos, fibroblastos e osteoblastos. A microencapsulação do extrato em material formador de parede constituído de goma arábica com maltodextrina (1:1), foi avaliada como uma possível alternativa para auxiliar na preservação das antocianidinas em condições drásticas de armazenamento (40 °C; 75% UR) e/ou para proporcionar uma melhora das ações farmacológicas de *A. chica*.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral

Obtenção de dados pré-clínicos de um potencial medicamento fitoterápico à base do extrato de *Arrabidaea chica* para o tratamento de feridas de osteonecrose induzida por bisfosfonatos.

Objetivos específicos

Avaliação *in vitro* da atividade do extrato bruto padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot sobre a viabilidade de queratinócitos, fibroblastos e osteoblastos influenciados por bifosfonato.

Avaliação *in vitro* da atividade do extrato bruto padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot sobre a viabilidade de células tumorais.

Avaliação do crescimento de bactérias da cavidade oral (*Streptococcus mutans*) tratadas com bisfosfonato ou com o extrato bruto padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot ou combinações dos dois tratamentos.

Produção de extratos hidroalcoólicos padronizados de *Arrabidaea chica* Verlot microencapsulados e a avaliação de sua estabilidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Estudo Fitoquímico:

Os procedimentos fitoquímicos e análises foram realizados na Divisão de Química de Produtos Naturais do CPQBA - UNICAMP sob supervisão da Profa. Dra. Mary Ann Foglio. Os monitoramentos analíticos dentro do projeto de pesquisa foram realizados em colaboração com a doutoranda Ilza Maria Oliveira Sousa.

4.1.1 - Obtenção do Material Vegetal:

Foram utilizadas folhas de *Arrabidaea chica* (Humb & Bonpl) Verlot (Figura 14) disponíveis no Banco de Germoplasma do acesso 06 (exsicata 1865) do CPQBA - UNICAMP, localizado no município de Paulínia (22° 45' 00" Sul e 47° 10' 21" Oeste), estado de São Paulo. Folhas das partes inferior, média e superior foram coletadas, procurando-se obter uma amostra representativa das diferentes partes da planta. O material vegetal foi identificado e classificado pela curadora Dra. Glyn Mara Figueira da coleção de plantas medicinais e aromáticas (CPMA – CPQBA – UNICAMP). O uso de material apresenta autorização de acesso dentro do processo número 010150/2012-9 de 16/04/2012 emitido pelo CGEN (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético) – IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis).



Figura 14: Exemplar de *Arrabidaea chica* Verlot, cultivado no campo experimental do CPQBA/UNICAMP

Fonte: Dra. Michelle Pedroza Jorge, 2013.

4.1. 2 - Secagem e moagem do material vegetal

As folhas foram secas em estufa a 40 °C com ventilação forçada (marca Fabbe) durante 48 horas. Posteriormente, foram moídas em moinho tipo martelo (marca Stephen, modelo UM 40) com peneira de 40 mesh. O produto foi embalado (Figura 15) em laminado composto por filme interno de polipropileno, revestido por uma camada alumínio opaca, com a finalidade de proteger o material vegetal da ação deteriorante proveniente da luminosidade externa, oxigênio e umidade. O processo de embalagem foi realizado no Instituto de Tecnologia em Alimentos (ITAL) Campinas.

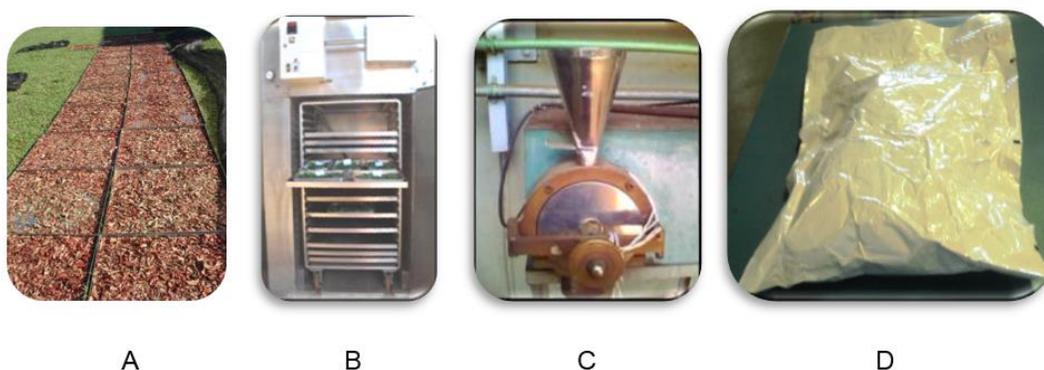


Figura 15: Processo de secagem e moagem das folhas de *A. chica*.

A) Estufa onde as folhas de *A. chica* foram secas durante 48 h. B) O moinho do tipo triturador de facas utilizado. C) Folhas secas de *A. chica*. D) embalagem contendo 1 kg de planta moída empacotada à vácuo.

Fonte: Acervo laboratório de Química de Produtos Naturais CPQBA-Unicamp.

4.1. 3 - Preparo dos Extratos Vegetais:

O processo de extração seguiu o protocolo metodológico descrito por Oliveira (2001). As folhas coletadas em abril de 2010 foram as utilizadas para a produção dos extratos, e após secas, foram moídas e embaladas a vácuo.

O material vegetal seco e moído foi extraído com solução etanol/H₂O 70/30 (etanol comercial CHEMCO), acidificada com 0,3% de ácido cítrico (marca *Synth*), na proporção de 1:5 (p/v). Repetiu-se o processo por 3 vezes de 1,50 h cada. Após a filtração do material vegetal, o solvente foi concentrado, sob vácuo e protegido da luz, até redução de 80% do volume final. O pH do extrato bruto foi fixado para aproximadamente 6,50 - 7,00 utilizando hidróxido de amônio (Merck®).

O extrato foi dividido em duas alíquotas, sendo uma diretamente submetida à secagem em *spray dryer* e a outra microencapsulada com uma mistura de goma arábica com maltodextrina (1:1) e posteriormente processada em *spray dryer* (Figura 16).

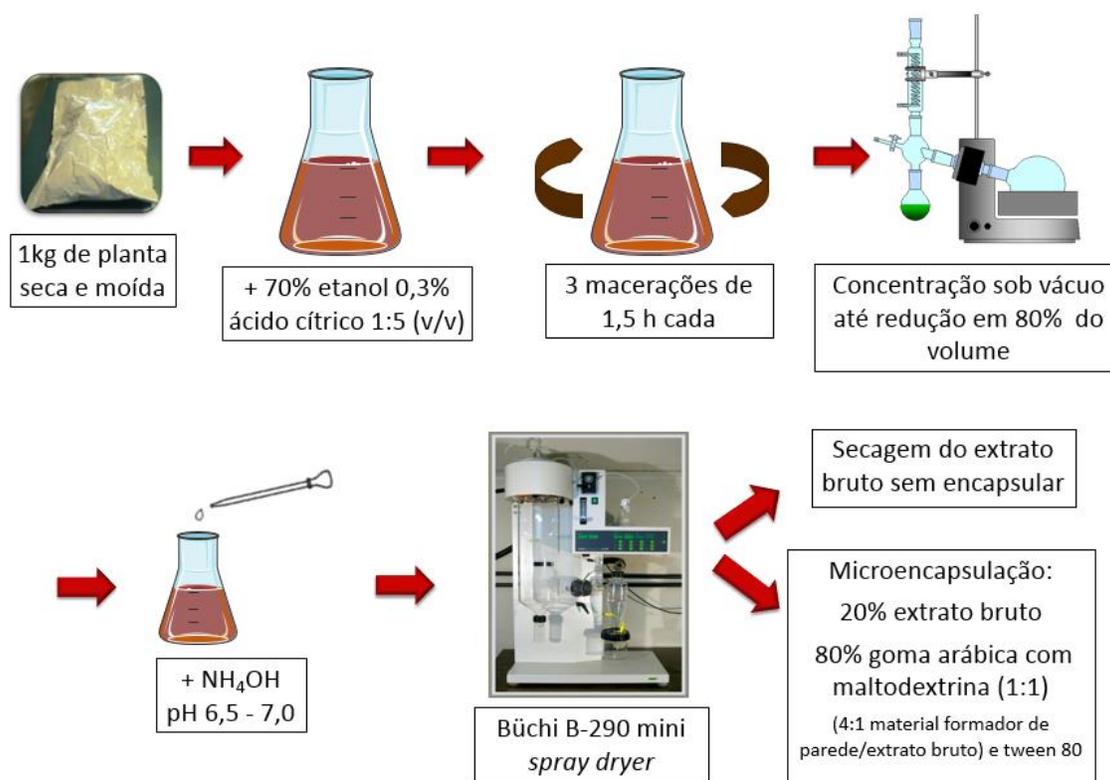


Figura 16: Esquema da extração de antocianinas de folhas de *A. chica* para obtenção do extrato bruto microencapsulado.

4.1. 4 - Análise de peso seco e perdas por dessecação dos extratos bruto e/ou microencapsulado

Os pesa-filtros utilizados foram mantidos em estufa (Precision modelo 28) a 105 °C por 1 h e então, transferidos para um dessecador até atingirem a temperatura ambiente e terem o peso aferido através de balança analítica (Mettler AB204). Incorporaram-se os extratos brutos ou microencapsulado de *A. chica*, utilizando-se o mesmo volume por frasco. Os pesa-filtros foram colocados em estufa a 105 °C onde permaneceram por 4 horas. Após esse período, os frascos foram transferidos para o dessecador até que a temperatura ambiente fosse atingida, permitindo a aferição do peso em balança analítica até a obtenção de valores constantes. A análise por dessecação foi realizada previamente e posteriormente ao processamento dos extratos em *spray dryer*.

4.1. 5 - Condições do *Spray Dryer* para processar os extratos brutos de *Arrabidaea chica* Verlot

Estes estudos foram realizados na divisão de Química de Produtos Naturais do CPQBA-UNICAMP, sob supervisão do prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

Sem encapsular (extrato bruto ou livre)

Para a secagem do extrato foi empregado um *Spray Dryer* (Büchi, Suíça, B-290 com *loop* inerte B-295), nas condições operacionais descritas na Tabela 1 (Rodrigues, 2004). O processamento foi realizado utilizando-se o extrato com uma proporção de 30% água / 70% etanol, em uma atmosfera de nitrogênio. O material obtido foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), com o objetivo de verificar a influência desse processo na concentração das três desoxiantocianidinas.

Tabela 1: Condições do processamento de secagem por *spray drying* do extrato bruto de *Arrabidaea chica* Verlot.

Variáveis	Valores pré determinados
Solvente do extrato	Etanol:H ₂ O
Proporção Etanol: H ₂ O	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

Extrato Bruto Microencapsulado:

A partir do cálculo do peso seco do extrato de *A. chica*, determinou-se a quantidade de agente encapsulante, na proporção 4:1 (p/p) (Rodrigues, 2004), que foi incorporada. Posteriormente, esse sistema foi homogeneizado no dispersor marca Quimis modelo Q-252-28 por aproximadamente 3 minutos na rotação 14000 rpm.

As microcápsulas foram produzidas pelo método de atomização por *Spray Dryer* (Büchi, Suíça, B-290 com *loop* inerte B-295), nas condições operacionais baseadas em Rodrigues (2004) (Tabela 2).

Tabela 2: Condições do processamento de microencapsulação (goma arábica com maltodextrina 1:1) por *spray drying* do extrato bruto de *Arrabidaea chica* Verlot.

Variáveis	Valores pré-determinados
Extrato bruto seco: matriz encapsulante (p/p)	20:80
Solvente	H ₂ O
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

4.1. 6 - Aferição do pH

Amostras dos extratos bruto e microencapsulado de *A. chica* foram pesadas em balança analítica para o preparo de uma solução 1% p/v dissolvidas em H₂O ultrapura. Utilizou-se um pHmetro (Micronal), previamente calibrado em pH 4,00 e 7,00 à temperatura ambiente.

4.1. 7 - Estudo de estabilidade

Os extratos microencapsulado e bruto foram aliquotados no interior de frascos de vidro âmbar com batoque e tampa rosqueável (5 g/frasco) (Figura 17A). Esses frascos foram colocados em uma câmara climática (Tecnal modelo TE-4003) (Figura 17B), onde as condições de temperatura e umidade relativa de equilíbrio (UR) foram mantidas constantes em 40 °C ± 2 °C e 75% UR ± 5% UR, respectivamente, conforme estabelecido pela ANVISA (RE 01/2005) para o estudo

de estabilidade acelerada. A análise dessas amostras foi realizada para os tempos 0, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 dias.



Figura 17: A) Frasco de vidro âmbar com batoque e tampa rosqueável. B) Câmara climática (Tecnal modelo TE-4003).

4.1. 8 – Análises químicas

O monitoramento das frações de *A. chica* coletadas foi feito através de cromatografia em camada delgada (CCD), posteriormente ao isolamento do padrão carajurina. As amostras também foram submetidas a análise por CLAE-DAD, após a prévia limpeza e extração das antocianinas (extrato bruto sem e microencapsulado).

4.1. 9 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras microencapsuladas foram fixadas com fita dupla face em stubs e inseridas em câmara de revestimento (Sputter Coater Balzers SCD 050), para receberem fluxo de argônio (40 segundos) e posterior banho de ouro, durante 180 segundos. Após esta etapa, foram eletromicrografadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL- JSM-5200) sob aceleração de 10 kv, e suas imagens digitalizadas para observação. Essa análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

4.2 - Testes de atividade farmacológica *in vitro*

Os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP protocolo nº 008/2012.

4.2 .1 – Culturas celulares

Células epiteliais, osteoblastos e células de câncer de próstata foram utilizadas nos estudos farmacológicos. Os experimentos com queratinócitos (HaCaT) foram realizados no no laboratório de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA-Unicamp, enquanto os experimentos que envolveram fibroblastos (PT64-04HF), osteoblastos (MC3T3-E1) e células tumorais (C4-2B), foram conduzidos no laboratório de cultura de células do Departamento de Ciências Básicas e Biologia Craniofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de Nova York (College of Dentistry – New York University – NYU - Sala 921-B).

4.2. 1.1 - Queratinócitos humanos

Queratinócitos humanos HaCaT – linhagem imortalizada (CLS - Cell Lines Service, número 300493), foram mantidos em estufa a 37 °C e 5% CO₂ em atmosfera úmida, e cultivados em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco®), enriquecido com 5% Soro Fetal Bovino (SFB), 100 U mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina.

4.2. 1.2 - Fibroblastos gengivais humanos

Fibroblastos gengivais humanos primários, PT6404-HF passagens de 5 a 8, foram gentilmente doados pelo Dr. Peter G. Sacks da Faculdade de Odontologia da Universidade de Nova York. As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO₂ em atmosfera úmida, e cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco®) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB;

Atlanta biologicals®), 100 U mL⁻¹ de penicilina, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina e 250 ng mL⁻¹ Fungizone (anfotericina B; Gibco®).

4.2. 1.3 - Pré-osteoblastos da calvária de rato

Pré-osteoblastos originários do osso calvário de ratos MC3T3-E1 (American Type Culture Collection - ATCC® CRL-2593™) foram gentilmente doados pelo Dr. Seiichi Yamano da Faculdade de Odontologia da Universidade de Nova York. As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO₂ em atmosfera úmida, e cultivadas em meio de cultura Minimum Essential Medium Alpha (Alpha-MEM; Gibco®) enriquecido com 10% SFB, 100 U mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina.

4.2. 1.4 – Células humanas originárias de câncer próstata

Células humanas de câncer de próstata com características osteoblásticas, C4-2B, foram gentilmente doadas pela Dra. Xin Li da Faculdade de Odontologia da Universidade de Nova York. As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO₂ em atmosfera úmida, e cultivadas em meio de cultura Rosewell Park Memorial Institute (RPMI; Gibco®) 1640 enriquecido com 10% SFB, 100 U mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina.

4.2. 1.5 - Concentrações celulares

As concentrações de células utilizadas para os experimentos foram escolhidas de acordo com dados apresentados na literatura (Jorge *et al.*, 2008), exceto para a linhagem HaCaT, cuja concentração para uma confluência de 80% (células/compartimento), foi definida após a realização de curva de crescimento.

- | | |
|---|--|
| a) HaCaT: 4x10 ⁴ células/mL | b) PT64-04HF: 4x10 ⁴ células/mL |
| c) MC3T3-E1: 5x10 ⁴ células/mL | d) C4-2B: 5x10 ⁴ células/mL |

O volume de células inoculado foi de 100 µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos; e 700 µL/compartimento, em placas de 12 compartimentos.

4.2. 2 - Amostras e substâncias testadas:

As seguintes amostras foram testadas:

AC: extrato bruto padronizado hidroalcoólico de *Arrabidaea chica*;

MAC: extrato bruto padronizado hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* microencapsulado em goma arábica com maltodextrina (1:1);

ZA: ácido zoledrônico 10 µM.

4.2. 2.1 - Preparo dos extratos vegetais para incorporação em cultura celular

Em um frasco eppendorf, foram pesados 5 mg de *A. chica* livre ou 20 mg do extrato microencapsulado, e incorporados a 50 µL de dimetilsufóxido (DMSO). Adicionou-se 950 µL do meio de cultura correspondente às células do experimento, e a solução formada foi considerada a “solução-mãe” para as futuras diluições.

4.2. 3 – Protocolos experimentais

4.2.3.1 – Simulação de condição clínica de tratamento com o extrato de *A. chica* previamente, posteriormente ou concomitante à administração de ácido zoledrônico

Para a simulação de um tratamento preventivo ou posterior à terapia com bisfosfonatos, o extrato bruto de *A. chica* foi incorporado em cultura celular 24 h previamente ou posteriormente ao tratamento com ácido zoledrônico. A condição de co-tratamento envolveu a incorporação simultânea de ambos.

4.2. 3.2 – Aplicação das amostras e tempos de avaliação

O tempo de 24 h que envolveu a etapa de inoculação e adesão celular nas placas-teste, foi padrão para todos os experimentos e desconsiderado na indicação dos tempos de tratamento.

A maneira como os tratamentos foram introduzidos nos compartimentos também foi avaliada: ou aplicando-se o primeiro tratamento com a metade do volume proposto para completar-se o volume total final após a adição do segundo tratamento (Figura 18A); ou em cada etapa distinta de tratamento, trocou-se todo o meio de cultura (Figura 18B).

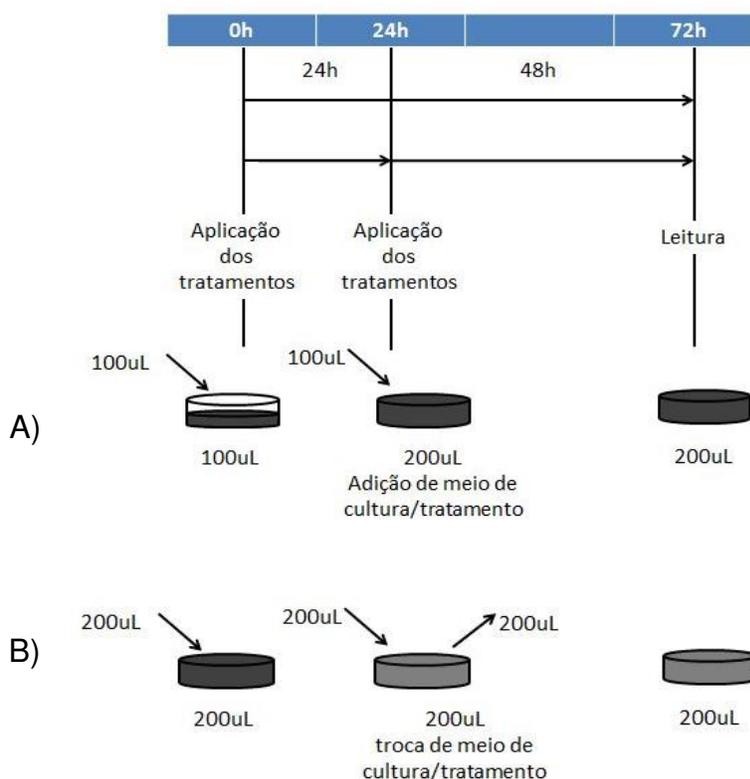


Figura 18: Esquema representativo do tratamento das células por um período total de 72 h.

Tratamento das células adicionando-se (A) ou trocando-se (B) um novo meio de cultura/tratamento no tempo t24 h (placa de 96 compartimentos, volume final de trabalho de 200 μ L).

4.2. 3.3 – Métodos de avaliação da viabilidade celular

A maioria dos experimentos que avaliaram a viabilidade celular foi realizada em placas de 96 compartimentos, utilizando-se um volume de trabalho de 200 μL /compartimento. Em placas de 12 compartimentos esse volume foi 1,6 mL/compartimento. O método escolhido para a quantificação de células viáveis foi a leitura da absorbância de agentes colorimétricos incorporados ao meio celular.

Viabilidade e proliferação celular: sulforrodamina B

Esse protocolo foi utilizado somente em experimentos que envolveram a linhagem celular de queratinócitos HaCaT.

Soluções utilizadas:

- 50% ácido tricloro acético (TCA);
- sulforrodamina B;
- 1% ácido acético;
- Trizma base (Sigma[®]).

As células foram fixadas com 50 μL /compartimento de ácido tricloroacético 50% e mantidas durante 1 h a 4 °C. Posteriormente as placas foram lavadas em água (para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários) e após completamente secas (temperatura ambiente), foram coradas com 50 μL de sulforrodamina B 0,4% (p/v) dissolvidas em ácido acético 1%, e mantidas por 15 min em temperatura ambiente. A remoção dos excessos do corante foi feita com ácido acético 1% e secagem da placa em temperatura ambiente. Ao final do procedimento, adicionou-se 150 μL de Trizma base (Sigma[®]), para a leitura da absorbância em leitor de microplacas, em comprimento de onda a 540 nm (SpectraMax[®] 190, Absorbance Microplate Reader; SoftMax[®] ProData Acquisition & Analysis Software, Molecular Devices' industry) (Figura 19).

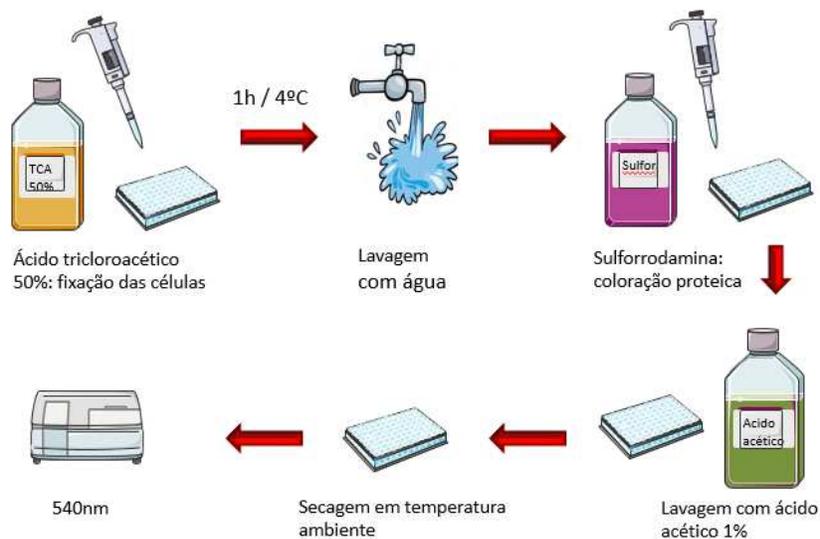


Figura 19: Esquema representativo da coloração com sulforrodamina B e leitura de absorvância.

Viabilidade celular: cristal de violeta

Esse protocolo foi utilizado em experimentos que envolveram as linhagens celulares de fibroblastos (PT64-04HF), osteoblastos (MC3T3-E1) e células de câncer de próstata (C4-2B).

Protocolo da Universidade do Kansas – Medical center

Soluções utilizadas:

- Tampão fosfato-salino (PBS - Gibco®)
- 0,05% cristal de violeta diluído em água destilada.

O meio de cultura foi removido dos poços de células, para a adição de 200 µL/poço (placa de 96 poços) de tampão fosfato-salino à temperatura ambiente. Após a remoção do PBS, a solução de cristal de violeta foi adicionada e permaneceu em contato com as células por 10 minutos. O corante foi então removido, e a placa

lavada por 2 vezes em água de torneira. A secagem ocorreu em temperatura ambiente, durante 24 h (Figura 20).

A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (SpectraMax® Plus 384, Absorbance Microplate Reader; SoftMax® ProData Acquisition & Analysis Software, Molecular Devices' industry), comprimento de onda a 562 nm, após a adição de 100 µL/poço (placa de 96 poços) de 1% SDS (dodecil sulfato de sódio).

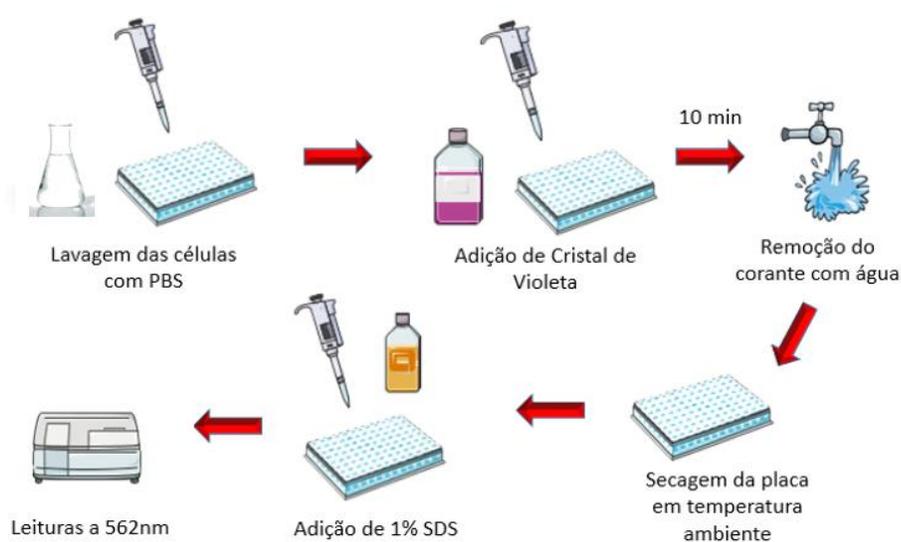


Figura 20: Esquema representativo da coloração com cristal de violeta e leitura de absorbância.

Cálculos de viabilidade celular

Os dados obtidos foram transferidos para uma planilha do Excel e convertidos em gráficos. Com os valores de absorbância, foi calculada a porcentagem de viabilidade celular para cada uma das concentrações testadas, considerando-se:

$$\% \text{ Viabilidade} = T_A / T_1 \times 100.$$

Onde:

T_A = média da absorbância da célula tratada – absorbância do branco da amostra;

T_1 = absorbância da suspensão celular sem tratamento.

4.2. 3.4 – Métodos para avaliação de morte celular por apoptose

Citometria de fluxo

Realizada em células submetidas aos tratamentos em placas de 12 compartimentos.

Equipamento BD FACSort®

Utilizado para os testes que envolveram fibroblastos e osteoblastos (PT64-04HF e MC3T3-E1). Os marcadores foram a Anexina V-FITC Biot Staining (Annexin V Pacific Blue™ Conjugate – Molecular Probes®) e o corante de DNA 7-AAD (Molecular Probes®) de acordo com o seguinte protocolo:

O meio de cultura de cada compartimento foi removido e armazenado em tubos falcon devidamente identificados. As células foram lavadas com 0,8 mL de tampão fosfato-salino (PBS) para posterior aplicação de Accutase™ Cell Detachment Solution por até 1 minuto. A neutralização do agente (Accutase™) foi feita com adição de 0,8 mL de meio de cultura contendo SFB 10%. As células foram então centrifugadas (1200 rpm, por 4 minutos a 4 °C) duas vezes com PBS gelado e ressuspensas com 1x Binding Buffer, atingindo concentração máxima de 1×10^6 células/mL. Transferiu-se 100 µL da solução para tubo facs de 5 mL onde adicionou-

se 5 µL de anexina V-FITC. Os tubos foram levemente agitados com vórtex e incubados em temperatura ambiente (TA), protegidos de luz por 15 minutos. Adicionou-se 500 µL de Binding Buffer e as células foram novamente centrifugadas (1200 rpm, por 4 minutos a 4 °C) e ressuspendidas com 100 µL da mesma solução. Incorporou-se 5 µL de 7-AAD, e os tubos foram levemente agitados com vórtex e incubados por 15 minutos em TA, protegidos da luz. Adicionou-se 400 µL de Binding Buffer para a leitura e análise em citômetro de fluxo, realizada em 1 h após a preparação das células.

Equipamento Guava® EasyCyte Mini

Utilizado para os testes que envolveram os queratinócitos (HaCaT). O kit para verificação de apoptose utilizado foi o “The Guava Nexin® Annexin V Assay” de acordo com as recomendações do fabricante:

O meio de cultura aspirado foi armazenado em tubos falcon devidamente identificados de acordo com as amostras. Adicionou-se 0,8 mL/compartimento de PBS, aspirou-se e então aplicou-se 0,8 mL de 0,25% tripsina/EDTA por até 5 minutos. A neutralização da tripsina/EDTA foi feita com adição de 0,8 mL de meio de cultura contendo 10% SFB. As células foram centrifugadas (24 °C, 2500 rpm), durante 5 minutos. Os tubos foram vertidos para a remoção do meio sobrenadante, restando cerca de 50 µL de meio em cada tubo. Adicionou-se 100 µL de novo meio de cultura contendo 10% SFB. O conteúdo de cada tubo falcon foi transferido para eppendorfs de 1,5 mL onde foi adicionada a solução contendo o reagente (Anexina V e 7-AAD). Os tubos foram armazenados durante 20 min em ambiente escuro e TA, para posterior leitura imediata das amostras em citômetro de fluxo.

Caspase 3/7 Glo®

O kit Caspase 3/7 Glo® foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante para avaliação da ativação de caspases 3 e 7 conjugadas:

O tratamento foi realizado em uma placa de 96 compartimentos opaca, de cor branca onde 100 µL de Caspase-Glo 3/7 Reagent foi adicionado para cada 100 µL de volume de trabalho utilizado. A placa foi encoberta com papel alumínio e após agitação durante 30 segundos a 300 rpm, incubada em temperatura ambiente por 1,5 h. A luminescência foi aferida em equipamento específico (GloMax® Multi detection system Promega®).

4.3 - Experimentos com bactéria da cavidade oral

A atividade do ácido zoledrônico e do extrato de *A. chica* foi avaliada através de experimentos determinantes de concentração inibitória mínima (CIM), em bactérias da cavidade oral *Streptococcus mutans* (UA159 - ATCC 700610), passagens 6-15, cultivadas em meio ágar-BHI (infusão de cérebro e coração-DIFCO®), e incubadas em estufa (5% CO₂ a 37 °C em atmosfera úmida).

4.3. 1 - Desenho experimental das avaliações de concentração inibitória mínima (CIM)

Inoculou-se 3-4 colônias de *S. mutans* em um tubo Falcon (15 mL) contendo 5 mL de meio de cultura BHI. Após um período de 15-17 h de incubação (37 °C, 5% CO₂, atmosfera úmida) foi verificada a densidade óptica (O.D. - Thermo Fisher® Scientific BIOMATE 3 laboratory UV/VIS spectrophotometer) que deveria estar entre 0,3 – 0,399, de acordo com estudos anteriores a respeito da curva de crescimento de *S. mutans*, do próprio laboratório do College of Dentistry - NYU. De acordo com esses estudos, o tempo de 15-17 h corresponde à fase de crescimento da bactéria antes que entre em sua fase estacionária; e o O.D. de 0,3-0,399 corresponde aproximadamente a um número de 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC).

Grupos experimentais:

- grupos controle:

- meio de cultura sem bactérias;
 - bactérias em meio de cultura mas sem tratamento;
 - meio de cultura e ácido zoledrônico (concentrações de 0,5 a 100 μM);
 - meio de cultura e concentrações de extrato de *A. chica* (0,5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$);
 - meio de cultura, ácido zoledrônico e concentrações de extrato de *A. chica* (0,5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).
- grupos tratamento:
 - bactérias tratadas com ácido zoledrônico em diferentes concentrações;
 - bactérias tratadas com extrato de *A. chica* em diferentes concentrações;
 - bactérias co-tratadas com diferentes concentrações de ácido zoledrônico (ZA) e extrato de *A. chica* (AC).

Em cada tubo de ensaio inoculou-se 150 μL da solução de bactérias, 600 μL de meio de cultura e 750 μL de ZA ou outro tratamento, diluídos em meio de cultura. Para condições de co-tratamento (ZA com AC) foi utilizado 150 μL de bactéria, 600 μL de meio de cultura, 350 μL de ZA e 350 μL de AC. O volume total de cada tubo de ensaio foi 1,5 mL. Os tubos foram incubados de 6 a 48 h de acordo com o experimento realizado (Figura 21).

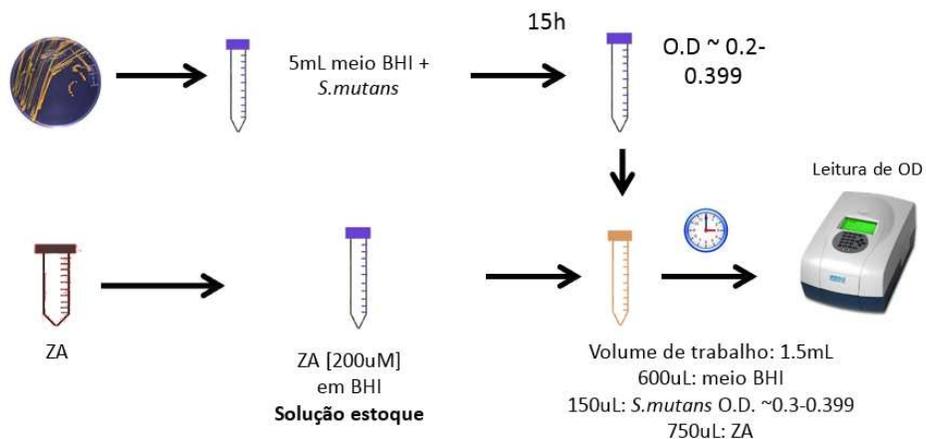


Figura 21: Desenho experimental das avaliações de concentração inibitória mínima de (CIM) realizados com *S. mutans*.

4.3. 2 - Avaliação de condições de troca do meio de cultura bacteriano

A possibilidade de ocorrência de exaustão do meio de cultura com a aplicação dos tratamentos propostos também foi avaliada. Este experimento verificou o crescimento bacteriano em situações que envolveram a troca e a reposição do meio. Inicialmente, as bactérias foram inoculadas em tubos falcon (15 mL) contendo meio BHI. Após 15-17 h de incubação (37 °C, 5% CO₂, atmosfera úmida) e verificação de O.D. (0,3-0,399), foram submetidas aos tratamentos propostos de acordo com os diferentes grupos (Figura 22).



Figura 22: Desenho experimental para as situações de troca do meio de cultura bacteriano.

Os grupos 1 e 4 não foram submetidos à troca do meio de cultura no tempo 6 h. Os grupos 2 e 3 tiveram a troca do meio de cultura para um novo meio sem tratamento, ou um novo meio contendo ZA no tempo 6 h. Para isso, os tubos contendo a suspensão bacteriana foram centrifugados (4000 rpm; 4 °C por 20 min). Ao final de 6 h realizou-se a leitura de O.D. para o grupo 1, o que foi feito ao final de 12 h e para os grupos 2, 3 e 4.

4.4 - Análise dos resultados

Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em momentos distintos ao menos duas vezes. Os resultados foram demonstrados em média (\pm desvio padrão) e organizados em planilhas do Excel. O estudo estatístico foi realizado através da análise de variância (One way – ANOVA: software Past[®]) ou o teste T de Student.

5 RESULTADOS

5.1 - Estudo fitoquímico

Os extratos de *Arrabidaea chica* foram submetidos à análise qualitativa e quantitativa previamente ao início do estudo de estabilidade acelerada (Brasil, 2005 - ANVISA, RE 01/2005), para determinação do perfil cromatográfico.

5.1. 1 - Obtenção do extrato bruto padronizado e extrato bruto padronizado microencapsulado de *Arrabidaea chica*

O processo de produção do extrato bruto padronizado de *A. chica* envolveu as etapas de extração por maceração dinâmica (etanol 70%/ ácido cítrico 0,03%), filtração, evaporação do solvente e secagem através de *Spray Dryer* (Figura 23), fornecendo um rendimento de 15%. Análises químicas e físico-químicas monitoraram a produção dos extratos (Tabela 3).



Figura 23: Secagem do extrato bruto de *A. chica* por *Spray Dryer*.

A e B) Extrato bruto de *A. chica* em processo de secagem por *Spray Dryer* (Buchi B-290); C) Extrato bruto após finalizado o processo de secagem.

Fonte: Laboratório de Química em Produtos Naturais CPQBA-UNICAMP.

Tabela 3: Avaliação de parâmetros físico-químicos do extrato bruto de *A. chica* após secagem através de *Spray Dryer*.

Análise	Média ± desvio padrão	CV*(%)
Teor de umidade (%)	11,61±0,09	0,78
pH	4,88± 0,02	0,41
Teor de carajurina (%)	6,51± 0,07	1,09

*Coeficiente de variação < 0,05

A determinação do resíduo seco do extrato bruto de *A. chica*, feita por dessecação total em estufa, foi realizada para a determinação da quantidade (peso) de agente microencapsulante (goma arábica com maltodextrina 1:1) necessária para a obtenção de microcápsulas na proporção de 1:4 (extrato bruto: agente microencapsulante). O processo de microencapsulação em *spray dryer* forneceu um rendimento de 93%.

5.1. 2 – Teste de estabilidade e avaliações do extrato de *A. chica* microencapsulado

Amostras dos extrato bruto e microencapsulado de *A. chica*, aliqüotadas em vidros âmbar distintos para cada tempo de avaliação, foram colocadas em câmara climática (40 °C e 75% umidade). Nos tempos 0, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 dias as amostras foram retiradas da câmara e submetidas à análises físico-químicas e cromatográficas.

5.1. 2.1 - Análises físico-químicas

Alterações macroscópicas na cor do extrato bruto foram verificadas 3 h após incubação em câmara climática. A mudança de cor também foi verificada no extrato microencapsulado a partir do tempo de 15 dias (Figura 24).

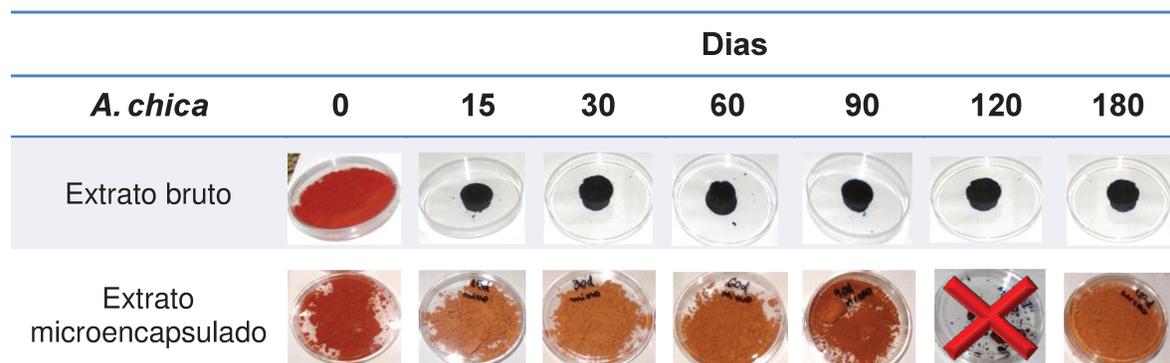


Figura 24: Análise macroscópica do extrato bruto e microencapsulado em goma arábica com maltodextrina (1:1) de *Arrabidaea chica* durante o teste de estabilidade acelerada.

Condições: câmara climática a 40°C e 75% umidade; observa-se a alteração da cor dos extratos a partir do tempo de 15 dias.

Fonte: Laboratório de Química em Produtos Naturais/CPQBA.

Macroscopicamente, o extrato bruto apresentou um aspecto escuro, duro e friável já a partir de 15 dias. Enquanto isso, o extrato microencapsulado manteve o aspecto sólido de pó, com uma mudança de cor do vermelho para marrom claro a partir de 15 dias. A amostra do tempo de 120 dias microencapsulada foi perdida para esta análise devido à alterações sofridas no frasco de armazenagem.

5.1. 2. 2 - Análise do pH das amostras

As amostras foram preparadas a uma concentração de 1%, dissolvidas em H₂O ultrapura e submetidas à leitura em pHmetro (Micronal®)(Tabela 4).

Tabela 4: Medidas de pH dos extratos bruto e microencapsulado de *A. chica*.

Amostra	pH inicial	pH 90 dias	pH 180 dias
AC	6,5	4,80	n.d.*
MAC	5,80	5,46	5,62

*n.d. = não determinado; AC = extrato bruto de *A. chica*; MAC = extrato bruto de *A. chica* microencapsulado com goma arábica/maltodextrina (1:1)

De acordo com as medições pode-se concluir que praticamente não houve alteração do pH das amostras microencapsuladas. Enquanto a partir de um pH inicial de 5,8 o pH medido no tempo de 90 dias para MAC foi de 5,46, para as amostras AC, de um pH inicial 6,5 o pH em 90 dias apresentou-se mais ácido (4,8) indicando uma maior variação de valores.

5.1. 2.3 – Análise das amostras em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

5.1. 2.3.1 - Curva analítica

A carajurina foi escolhida para o monitoramento das amostras, sendo portanto um marcador analítico. Essa deoxiantocianidina foi a escolhida por estar envolvida na atividade farmacológica do extrato, e também por apresentar uma maior estabilidade quando comparada às outras deoxiantocianidinas.

A curva analítica de calibração da carajurina foi realizada para a determinação de seu teor no extrato (Tabela 5 e Figura 25).

Tabela 5: Dados obtidos para confecção da curva analítica carajurina.

Concentração (µg mL ⁻¹)	Área 1	Área 2	Área 3	Média Area	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 da área obtida de 3 curvas analíticas.

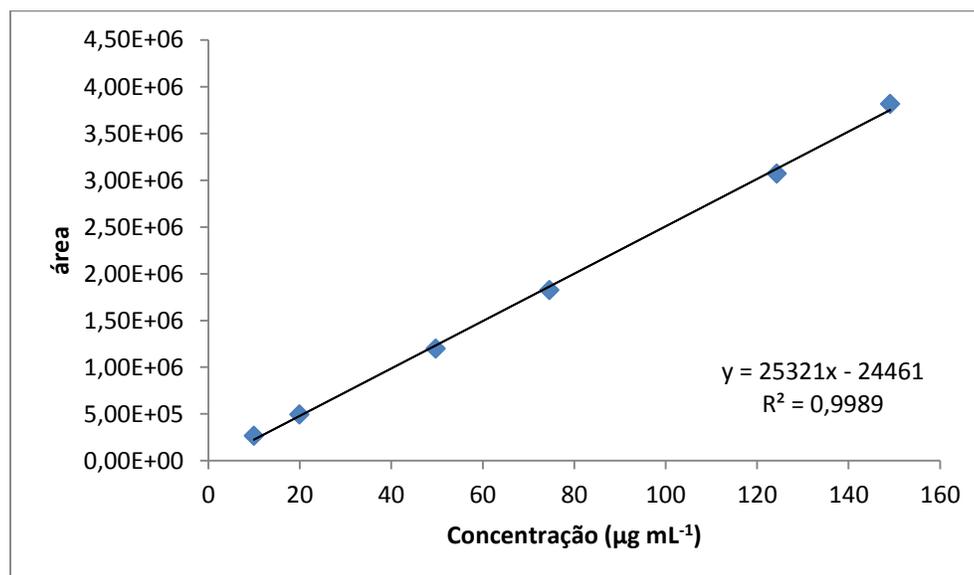


Figura 25: Curva analítica do marcador carajurina.

5.1. 2.3.2 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos brutos

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) do extrato bruto de *A. chica* (AC) envolveu inicialmente o processo de limpeza da amostra, para eliminação de clorofilas e graxas presentes, através de cartucho C-18 previamente acondicionado com água acidificada com ácido fosfórico (pH = 2) e eluído com metanol. Nas condições de CLAE empregadas, as 3 deoxiantocianidinas foram observadas respectivamente nos tempo de retenção TR = 5,8 min (6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavílio, pigmento 1), TR = 7,9 min (6,7-tri-hidroxi-5-metoxiflavílio, pigmento 2) e TR = 15,8 min (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio, carajurina) detectados em comprimento de onda de 470 nm (Figuras 26) na amostra de AC referente ao tempo 0 de armazenamento. Por causa do endurecimento das amostras AC armazenadas em câmara climática a partir do tempo 15 dias, não foi possível analisar o teor das 3 deoxiantocianidinas para os diferentes tempos de incubação.

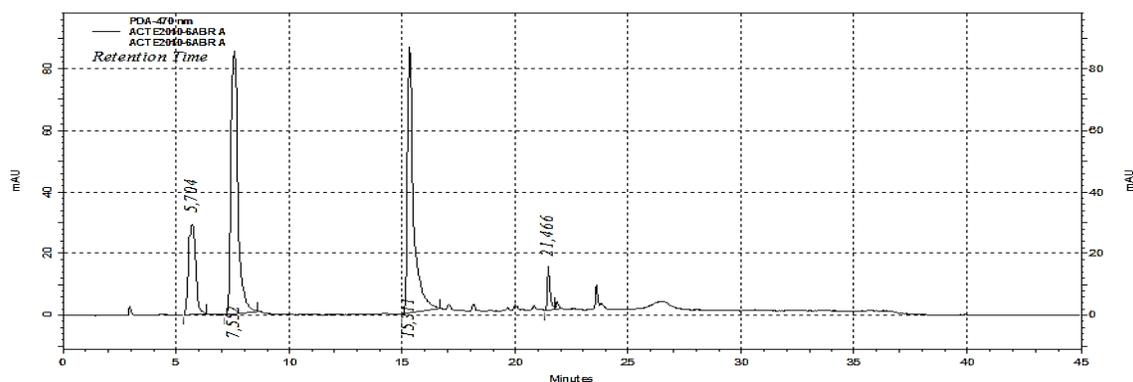


Figura 26: Cromatograma do extrato bruto sem encapsular de *A. chica*.

Amostra T=0, cromatógrafo Shimadzu, coluna C18 Gemini, $\lambda=470\text{nm}$, fluxo 1 mL/min, forno 35 °C e software Class VP –5, (TR=5,8min) (6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavílio) (TR=7,9 min) (6,7-tri-hidroxi-5-metoxiflavílio) e (TR=15,8) (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio, carajurina).

Por sua vez, as amostras microencapsuladas foram submetidas ao tratamento com 2 mL H₂O para o rompimento das microcápsulas e extração do

extrato bruto com metanol. Em seguida, as amostras foram passadas (2 mL do sobrenadante para os nos tempos 0, 15 e 30 dias e 5 mL para as amostras dos tempos 60, 90, 120 e 180 dias) através de cartucho C18.

A partir das análises por CLAE-DAD e quantificação de carajurina, foi possível observar que nas condições avaliadas para o estudo de estabilidade (75% de umidade, 40 °C de temperatura e embalagens de vidro âmbar com batoque e tampa rosqueada) as amostras apresentaram uma perda do teor de carajurina em 88% já após 30 dias de armazenamento. Esse dado permaneceu constante até se completar o estudo, em 180 dias, e representou a degradação sofrida (Figura 27).

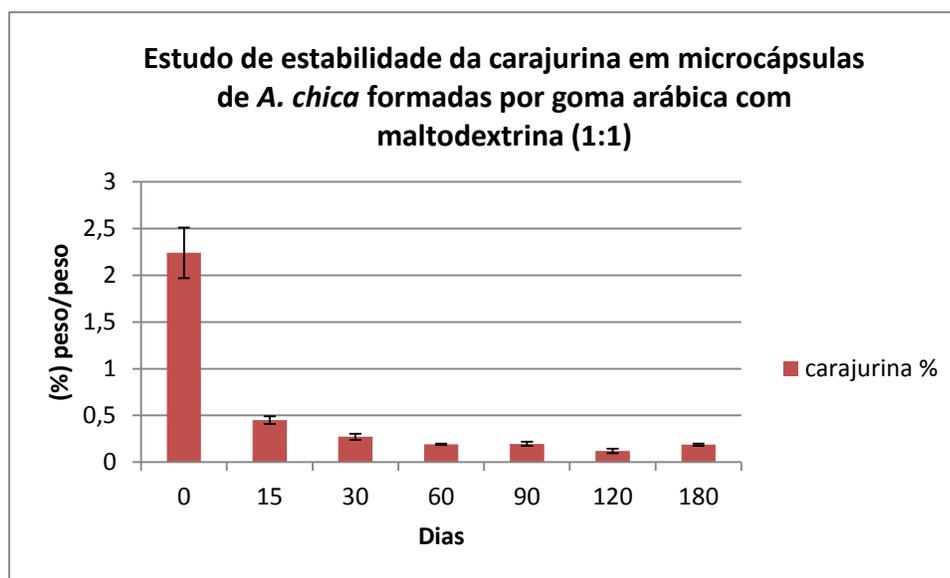


Figura 27: Variação do teor de carajurina durante o estudo de estabilidade de extrato bruto de *A. chica* microencapsulado em goma arábica/maltodextrina (1:1).

Condições de armazenamento: 40 °C e 75% de umidade.

5.1.2.4 - Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia externa das microcápsulas foi analisada a partir de fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 28).

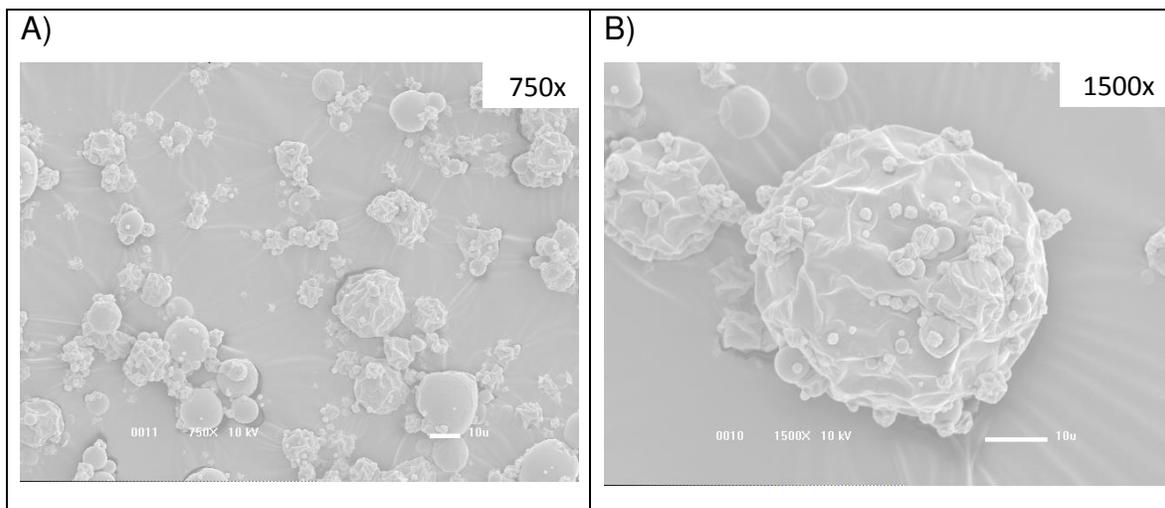


Figura 28: Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das microcápsulas do extrato de *A. chica* microencapsulado em goma arábica/maltodextrina (1:1).

Tempo 0 do estudo de estabilidade. A) visão panorâmica (750x; 10kV); B) visão da microcápsula (1500x; 10kV).

Observou-se um predomínio de micropartículas de forma esférica, algumas delas com paredes lisas e íntegras, e de tamanhos variados (Figura 28A). A grande maioria das micropartículas, no entanto, apresentou muitas depressões ou rugosidades (Figura 28B).

5.1.2.5 – Comparação biológica *in vitro* dos extratos bruto e microencapsulado de *Arrabidaea chica*

O efeito sobre viabilidade de queratinócitos humanos (HaCaT) do extrato de *A. chica* microencapsulado (MAC) foi comparado àquele do extrato bruto (AC)

(Tabela 6). Verificou-se que nas concentrações de 50 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, AC diminuiu a viabilidade celular de maneira mais intensa do que MAC, enquanto na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o efeito foi semelhante entre as duas amostras. A concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AC estimulou a viabilidade celular.

Tabela 6: Viabilidade (%) de queratinócitos tratados com extrato de *A. chica* (AC) ou extrato de *A. chica* microencapsulado (MAC).

	5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	150 $\mu\text{g mL}^{-1}$
AC	104,8 (\pm 1,8)*	83,7 (\pm 2,7)¥	23,3 (\pm 3,2)#	24,11 (\pm 2,7)#
MAC	81,7 (\pm 10,9)¥	81,8 (\pm 5,2)¥	62,9 (\pm 16,2)§	58,6 (\pm 16,7)§

*,#,§,¥ símbolos diferentes representam diferença estatística ANOVA $p < 0,05$; resultados expressos como média \pm desvio padrão; tempo de exposição: 48 h; linhagem: HaCaT (queratinócito humano imortalizado); condições de cultivo: DMEM 5% SFB; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO_2 . Método de avaliação por absorvância utilizando-se a sulforrodamina B.

Do ponto de vista químico, a estratégia de microencapsulação estudada não preservou as desoxiantocianinidas, e portanto, todas as etapas farmacológicas seguintes foram realizadas com o extrato bruto preparado nas condições padronizadas (AC - extrato padronizado de *A. chica*).

5.2 - Testes de atividade farmacológica *in vitro*

5.2.1 - Tratamento das células com extrato padronizado de *Arrabidaea chica* (AC)

Os resultados obtidos foram expressos como médias de 3 experimentos independentes, para 3 tempos de exposição distintos:

5.2.1.1 - Tempos de exposição de 24, 48 e 72 h

Após tratamentos com duração de 24h, apenas na concentração 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AC foi tóxico para fibroblastos e osteoblastos com uma redução na viabilidade celular em respectivamente 93% e 44%, aproximadamente. Para o mesmo tempo, houve estimulação da viabilidade de osteoblastos, aumentando-a em 25% quando comparado ao grupo controle (células sem tratamento) ($p < 0,05$) com a concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AC. Finalmente, concentrações de AC menores ou iguais a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em fibroblastos, e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em osteoblastos, apresentaram viabilidades celulares semelhantes às aquelas observadas para as células sem tratamento, e portanto, sem efeitos citotóxicos (Tabela 7).

Em tratamentos empregados com duração de 48 h, verificou-se que a concentração 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AC aumentou em 12% ($p < 0,05$) a viabilidade de queratinócitos, enquanto a concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi citotóxica para queratinócitos e osteoblastos ($p < 0,05$). Não houve diferenças com relação à viabilidade celular para as concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AC em fibroblastos e osteoblastos ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Em tempos de exposição com duração de 72 h, as concentrações 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AC não alteraram a viabilidade de fibroblastos e osteoblastos após 72 h de tratamento, e foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$). A concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi tóxica e reduziu a viabilidade celular em 34% e 85% respectivamente para fibroblastos e osteoblastos ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Viabilidade (%) de queratinócitos, fibroblastos e osteoblastos submetidos ao tratamento com diferentes concentrações do extrato de *A. chica* (AC; $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 24, 48 e 72 h.

Tempo de exposição	Célula	Sem tratamento	AC 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	AC 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	AC 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	AC 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$
24h	fibroblastos	100	82,2 ($\pm 18,9$)	86,6 ($\pm 4,7$)	94,5 ($\pm 4,9$)	7,4 ($\pm 3,4$) [#]
	osteoblastos	100	118,2 ($\pm 22,3$)	125,8 ($\pm 9,2$) [*]	64,3 ($\pm 6,4$) [§]	55,9 ($\pm 7,4$) [§]
48h	queratinócitos	100	112,2 ($\pm 2,9$) [*]	105,4 ($\pm 5,5$)	31,9 ($\pm 1,9$) [#]	
	fibroblastos	100	110,2 ($\pm 7,7$)	110,8 ($\pm 10,8$)	81,7 ($\pm 1,1$)	
	osteoblastos	100	102,9 ($\pm 6,4$)	97,3 ($\pm 15,2$)	24,0 ($\pm 5,2$) [§]	
72h	fibroblastos	100	93,5 ($\pm 5,1$)	98,5 ($\pm 2,6$)	65,7 ($\pm 0,7$) [#]	
	osteoblastos	100	104,6 ($\pm 6,4$)	83,1 ($\pm 16,2$)	15,5 ($\pm 0,34$) [*]	

*.#.§ símbolos diferentes representam diferença estatística: ANOVA $p < 0,05$; comparações estatísticas realizadas somente entre os grupos em cada tempo de exposição específico; resultados expressos como média \pm desvio padrão; tempos de exposição: 24, 48 e 72 h; linhagens: HaCaT (queratinócito humano imortalizado); PT64-04HF (fibroblasto humano primário) e

MC3T3-E1 (pré-osteoblasto de rato); condições de cultivo respectivamente: DMEM 5% SFB; DMEM 5% SFB e Alpha-MEM 5% SFB; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂. Método de avaliação por absorvância utilizando-se a sulforrodamina B (queratinócitos) ou cristal de violeta (fibroblastos e osteoblastos).

5.2.2 - Tratamentos com ácido zoledrônico (ZA)

Os tratamentos com ácido zoledrônico ocasionaram uma redução significativa da viabilidade celular, sendo que os efeitos tóxicos tiveram característica tempo dependente.

5.2.2.1 - Exposição ao ácido zoledrônico por 24, 48 ou 72 h

O tratamento das células com ZA 10 µM por 24 h, não apresentou qualquer efeito de toxicidade, com resultados de viabilidade semelhantes às células sem tratamento ($p > 0,05$). No entanto, quando o tempo de exposição ao medicamento foi superior a 24 h, houve uma redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,05$), respectivamente para os tempos de 48 h e 72 h, em 34% e 68% para queratinócitos, em 47% e 76% para fibroblastos e em 51% e 65% para osteoblastos (Tabela 8).

Tabela 8 – Viabilidade (%) das células epiteliais e osteoblastos submetidos ao tratamento com ácido zoledrônico (ZA) 10 µM durante 24, 48 e 72 h.

Tempos de exposição	Tratamento	Queratinócitos	Fibroblastos	Osteoblastos
24h	Sem tratamento	100	100	100
	ZA (10 µM)	100,4 (±10,1)	91,76 (±0,25)	81,4 (±15,8)
48h	Sem tratamento	100	100	100
	ZA (10 µM)	66,2 (±6,3)*	53,5 (±7,2)*#	49,0 (±1,1)#
72h	Sem tratamento	100	100	100
	ZA (10 µM)	31,8 (±4,3)§	24,3 (±5,7)§	34,9 (±3,9)§

*,#,§ símbolos diferentes representam diferença estatística: ANOVA $p < 0,05$; resultados expressos como média \pm desvio padrão; tempos de exposição: 24, 48 e 72 h; linhagens: HaCaT (queratinócito humano imortalizado); PT64-04HF (fibroblasto gengival humano primário) e MC3T3-E1 (pré-osteoblasto de rato); condições de cultivo respectivamente: DMEM 5% SFB; DMEM 5% SFB e Alpha-MEM 5% SFB; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂. Método de avaliação por absorbância utilizando-se a sulforrodamina B (queratinócitos) ou cristal de violeta (fibroblastos e osteoblastos).

5.2.2.2 - Exposição ao ácido zoledrônico em diferentes condições de tratamento

A atividade de ZA 10 µM foi testada também em condições de troca de tratamento em um mesmo experimento, adicionando-se ou removendo-se o meio de cultura. O segundo tratamento, com duração de 48 h foi adicionado ou completamente removido do meio celular 24 h após o primeiro. Assim, as seguintes combinações foram testadas:

ZA – ZA: primeiro e segundo tratamentos realizados com ácido zoledrônico 10 µM em condições de adição ou troca do meio de cultura;

ZA – M: tratamento das células com ácido zoledrônico 10 µM durante 24h e adição ou troca do tratamento para meio de cultura, com duração de mais 48 h;

M – ZA: células expostas ao meio de cultura por 24 h e posteriormente adição ou troca do meio e introdução de ácido zoledrônico 10 µM por mais 48 h.

Esses experimentos estão relacionados aos protocolos de aplicação de tratamento previamente ou posteriormente à exposição das células a ZA (Tabela 9).

Os efeitos de citotoxicidade de ZA foram mais pronunciados nos experimentos cujo protocolo aplicado foi a adição de um novo meio de cultura/tratamento. Este protocolo foi o escolhido para os experimentos que se seguiram, já que representaria uma condição clínica de pré e pós tratamento a ZA sem a perda dos efeitos do bisfosfonato.

Tabela 9 – Viabilidade (%) de fibroblastos em experimentos que envolveram a adição ou a troca do meio de cultura, em condições de tratamentos prévios ou posteriores à exposição ao ácido zoledrônico (ZA) 10 µM.

Adição do segundo tratamento				Troca do meio e introdução de novo tratamento			
PT64-04	ZA - ZA	ZA - M	M - ZA	PT64-04	ZA - ZA	ZA - M	M - ZA
100	18,7 (±4,2)*	25,3 (±4,2)*	47,8 (±13,4)#	100	32,2 (±5,8)§	39,3 (±5,4)§	71,6 (±4,7)¥

*.#.§.¥ símbolos diferentes representam diferença estatística ANOVA p<0,05; resultados expressos como média ± desvio padrão; tempo de exposição total: 72 h, primeiro tratamento com

duração de 24 h e segundo tratamento com duração de 48 h; linhagem: PT64-04HF (fibroblasto humano primário); condições de cultivo: DMEM 5% SFB; 37°C, atmosfera úmida, 5% de CO₂. Método de avaliação por absorvância utilizando-se o cristal de violeta.

O protocolo que envolveu a adição de meio de cultura (sem tratamento) 24 h após a exposição à ZA, diluiu a concentração do medicamento de 10 µM para 5 µM (ZA - M), e foi estatisticamente semelhante ao tratamento com ZA (ZA – ZA) durante todo o experimento.

Após a escolha do protocolo de adição de um novo tratamento, o mesmo foi avaliado em osteoblastos (Tabela 10).

Tabela 10 – Viabilidade (%) de osteoblastos em experimentos que envolveram a adição do meio de cultura, em condições de tratamentos prévios ou posteriores à exposição ao ácido zoledrônico (ZA) 10 µM.

Adição do segundo tratamento			
MC3T3-E1	ZA - ZA	ZA - M	M - ZA
100	32,2 (±5,8)*	39,3 (±5,4)*	66,3 (±3,4)#

*#símbolos diferentes representam diferença estatística ANOVA p<0,05; resultados expressos como média ± desvio padrão; tempo de exposição total: 72 h, primeiro tratamento com duração de 24 h e segundo tratamento com duração de 48 h; linhagem: MC3T3-E1 (pré-osteoblasto de rato); condições de cultivo: Alpha-MEM 5% SFB; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂. Método de avaliação por absorvância utilizando-se o cristal de violeta.

5.2.3 - Condições de co-tratamento com ácido zoledrônico e extrato de *Arrabidaea chica*

Para todas as linhagens foram estipulados os seguintes grupos de tratamento:

- Grupo ZA: células tratadas com ácido zoledrônico na concentração de 10 μM ;
- Grupo ZA + AC 5: células tratadas com ácido zoledrônico na concentração de 10 μM e extrato de *A. chica* 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$;
- Grupo ZA + AC 10: células tratadas com ácido zoledrônico na concentração de 10 μM e extrato de *A. chica* 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5.2.3.1 - Tratamento de 48 h de duração

A viabilidade de queratinócitos foi reduzida em 34% no grupo ZA. O co-tratamento de ácido zoledrônico com o extrato de *A. chica* 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ZA + AC 5) apresentou um aumento dessa viabilidade em 15% ($p=0,01$); com efeitos estatisticamente semelhantes ao grupo ZA + AC 10 ($p>0,05$) mas diferentes do grupo sem tratamento ($p<0,05$). O grupo ZA foi semelhante ao grupo ZA + AC10 ($p=0,57$) (Tabela 11).

Em fibroblastos, houve uma redução da viabilidade celular em 47% para o grupo ZA. Os grupos submetidos à situação de co-tratamento do medicamento com o extrato de *A. chica*, demonstraram um aumento significativo da viabilidade quando comparados ao grupo ZA, sendo esse em 29% para ZA + AC 5 e 17% para ZA + AC 10 ($p<0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos de co-tratamento ($p>0,05$) (Tabela 11).

Finalmente, os osteoblastos apresentaram 51% de diminuição em sua viabilidade no grupo ZA. Os grupos de co-tratamento ZA+AC5 e ZA+AC10 aumentaram significativamente a viabilidade comparada ao grupo ZA, em respectivamente, 5,9% e 14,8% ($p<0,05$). Houve diferença estatística entre todos os grupos ($p<0,05$) (Tabela 11).

Tabela 11 – Viabilidade (%) das células após 48 h do co-tratamento ácido zoledrônico 10 µM e extrato de *A. chica* 5 e 10 µg mL⁻¹.

Célula	Sem tratamento	ZA	ZA + AC 5 µg mL⁻¹	ZA + AC 10 µg mL⁻¹
queratinócitos	100	66,2 (±6,3)*	81,9 (±8,3)#	68,9 (±4,4)*#
fibroblastos	100	53,5(±7,2)*	82,9 (±8,1)#	70,6(±7,6)#
osteoblastos	100	49,0 (±1,1)*	54,9 (±0,9)#	63,8 (±0,8)§

*.#.§.¥ símbolos diferentes representam diferença estatística ANOVA $p < 0,05$; comparações estatísticas realizadas somente entre os diferentes tratamentos aplicados para cada tipo celular; resultados expressos como média ± desvio padrão; tempo de exposição: 48 h; linhagens: HaCaT (queratinócito humano imortalizado); PT64-04HF (fibroblasto gengival humano primário) e MC3T3-E1 (pré-osteoblasto de rato); condições de cultivo respectivamente: DMEM 5% SFB; DMEM 5% SFB e Alpha-MEM 5% SFB; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂. Método de avaliação por absorvância utilizando-se a sulforrodamina B (queratinócitos) ou cristal de violeta (fibroblastos e osteoblastos).

5.2.3.2 - tratamento de 72 h de duração

Após 72 h de tratamento, ocorreu uma redução da viabilidade de fibroblastos em 76% e de osteoblastos em 65%, no grupo ZA. Não houve diferença estatística entre os grupos de tratamento aplicados para cada linhagem celular ($p > 0,05$) (Tabela 12).

Tabela 12 – Viabilidade (%) das células após 72 h do co-tratamento ácido zoledrônico 10 μM e extrato de *A. chica* 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Célula	Sem tratamento	ZA	ZA + AC 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	ZA + AC 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$
fibroblasto	100	24,3 ($\pm 1,3$)*	20,2 ($\pm 0,4$)*	18,4 ($\pm 3,1$)*
osteoblasto	100	34,9 ($\pm 3,9$)#	43,6 ($\pm 0,7$)#	54,7 ($\pm 10,4$)#

*,#símbolos diferentes representam diferença estatística Teste T Student $p < 0,05$; resultados expressos como média \pm desvio padrão; tempo de exposição: 72 h; linhagens: PT64-04HF (fibroblasto humano primário); MC3T3-E1 (pré-osteoblasto de rato); condições de cultivo respectivamente: DMEM 5% SFB e Alpha-MEM 5% SFB; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO_2 . Método de avaliação por absorbância utilizando-se o cristal de violeta.

5.2.4 - Tratamento com extrato de *Arrabidaea chica* por 24 h e posteriormente adição de ácido zoledrônico por mais 48 h

Para todas as linhagens foram avaliadas as seguintes condições de tratamento:

- Grupo ZA - ZA: células tratadas com ácido zoledrônico na concentração de 10 μM por 72 h;
- Grupo M - ZA: células tratadas com meio de cultura por 24 h e posteriormente, adição de ácido zoledrônico na concentração de 10 μM por mais 48 h;
- Grupo AC 5 – ZA: células tratadas com extrato de *A. chica* 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 24 h e posteriormente, adição de ácido zoledrônico na concentração de 10 μM por mais 48 h;
- Grupo AC 10 - ZA: células tratadas com extrato de *A. chica* 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 24 h e posteriormente, adição de ácido zoledrônico na concentração de 10 μM por mais 48 h.

A tentativa da simulação de uma condição clínica de pré-tratamento à exposição por bisfosfonatos, não apresentou resultados significativos ($p > 0,05$) tanto para fibroblastos quanto para osteoblastos. Em fibroblastos, o grupo ZA diferiu de todos os outros tratamentos ($p < 0,05$) (Tabela 13).

Tabela 13 – Viabilidade (%) de fibroblastos e osteoblastos tratados com o extrato de *A. chica* 5 ou 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou meio de cultura 24 h previamente à adição de ácido zoledrônico.

Célula	ZA - ZA	M - ZA	AC 5 - ZA	AC 10 - ZA
fibroblastos	25,4 ($\pm 2,8$)*	55,2 ($\pm 3,1$)#	65,7 ($\pm 3,1$)#	62,5 ($\pm 2,2$)#
osteoblastos	26,5 ($\pm 8,0$)*§	54,1 ($\pm 17,1$)#§	64,3 ($\pm 15,1$)#§	61,8 ($\pm 18,3$)#§

*.#.§símbolos diferentes representam diferença estatística Teste T Student $p < 0,05$; resultados expressos como média \pm desvio padrão; tempo de exposição final: 72 h; primeiro tratamento com duração de 24 h e segundo tratamento com duração de 48 h; linhagens: PT64-04HF (fibroblasto humano primário) e MC3T3-E1 (pré-osteoblasto de rato); condições de cultivo respectivamente: DMEM 5% SFB e Alpha-MEM 5% SFB; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO_2 . Método de avaliação por absorbância utilizando-se o cristal de violeta.

5.2.5 - Tratamento com ácido zoledrônico por 24 h e posteriormente adição de extrato de *Arrabidaea chica* por mais 48 h

Para todas as linhagens foram avaliadas as seguintes condições de tratamento:

- Grupo ZA - ZA: células tratadas com ácido zoledrônico na concentração de 10 μM por 72 h;
- Grupo ZA - M: células tratadas com ácido zoledrônico na concentração de 10 μM por 24 h e posteriormente, adição de meio de cultura por mais 48 h;

- Grupo ZA – AC 5: células tratadas com ácido zoledrônico na concentração de 10 μM por 24 h e posteriormente, adição de extrato de *A. chica* 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por mais 48 h;
- Grupo ZA – AC 10: células tratadas com ácido zoledrônico na concentração de 10 μM por 24 h e posteriormente, adição de extrato de *A. chica* 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por mais 48 h.

Os resultados apresentados não demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos testados ($p > 0,05$), exceto em fibroblastos, onde os grupos ZA e ZA-M diferiram entre si ($p < 0,05$) (Tabela 14). Não houve vantagens no emprego do extrato de *A. chica* 24 h após iniciado o tratamento com ácido zoledrônico.

Tabela 14 – Viabilidade (%) de fibroblastos e osteoblastos tratados com o extrato de *A. chica* 5 ou 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou meio de cultura 24 h posteriormente à adição de ZA.

Célula	ZA	ZA - M	ZA – AC 5	ZA – AC 10
fibroblastos	25,4 ($\pm 2,8$)*	16,5 ($\pm 0,3$)#	22,8 ($\pm 4,4$)*#	23,8 ($\pm 2,4$)*#
osteoblastos	26,5 ($\pm 8,0$)*§	34,1 ($\pm 7,2$)*§	33,4 ($\pm 3,1$)§	39,6 ($\pm 8,1$)§

*,#,§símbolos diferentes representam diferença estatística Teste T Student $p < 0,05$; resultados expressos como média \pm desvio padrão; tempo de exposição final: 72 h; primeiro tratamento com duração de 24 h e segundo tratamento com duração de 48 h; linhagens: PT64-04HF (fibroblasto humano primário) e MC3T3-E1 (pré-osteoblasto de rato); condições de cultivo respectivamente: DMEM 5% SFB e Alpha-MEM 5% SFB; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO_2 . Método de avaliação por absorbância utilizando-se o cristal de violeta.

5.2.4 – Citometria de fluxo e ativação de caspases

5.2.4.1 - Queratinócitos

Após 24 h, nenhum dos tratamentos induziu a um aumento nas populações de células em apoptose quando comparados ao grupo controle (células sem tratamento) (Figura 29).

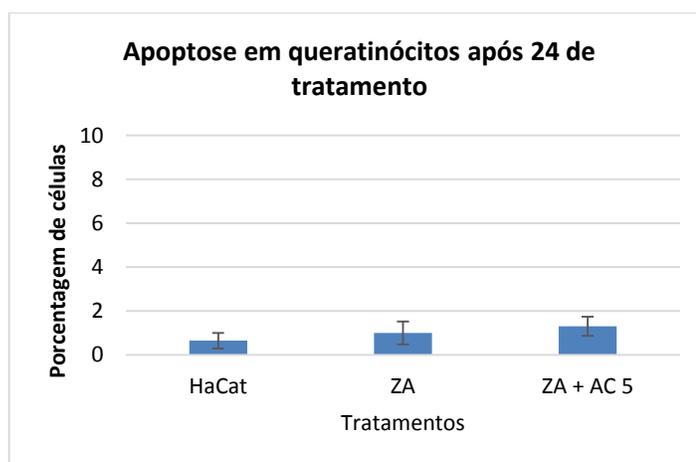


Figura 29: População de queratinócitos (%) em apoptose.

Análise por citometria de fluxo (Guava® EasyCyte Mini; Anexina V); tempo de exposição 24 h; células sem tratamento (HaCaT), tratadas com ácido zoledrônico 10 μM (ZA), tratadas com extrato de *A. chica* 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (AC 5) e co-tratadas com ácido zoledrônico 10 μM e extrato de *A. chica* 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ZA + AC 5); linhagem HaCaT (queratinócito humanoimortalizado); condições de cultivo: DEMEM 5% SFB; incubação a 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO_2 .

5.2.4.2 - Fibroblastos

A análise em citometria de fluxo revelou a não ocorrência de apoptose significativa ($p > 0,05$) em fibroblastos tratados com ácido zoledrônico (ZA) ou co-tratados com o ácido e o extrato de *A. chica* 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ZA+AC5) durante 24 h e 48 h. As amostras apresentaram resultados estatisticamente semelhantes aos do grupo sem tratamento (Figura 30).

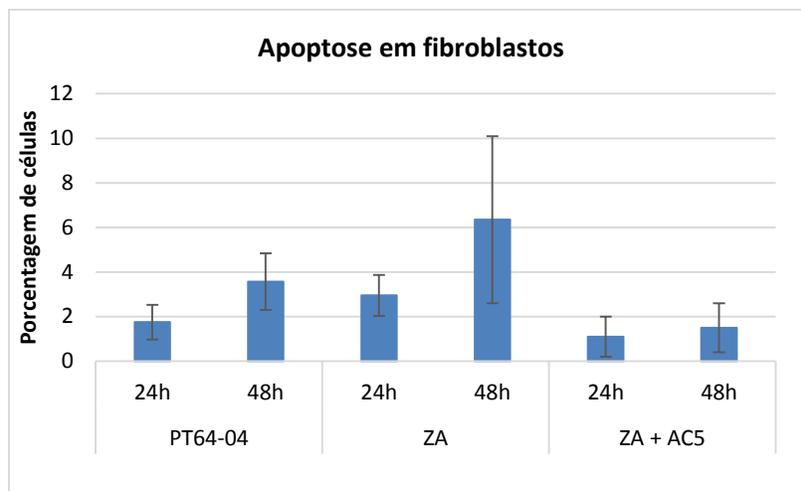


Figura 30: População de fibroblastos (%) em apoptose.

Análise por citometria de fluxo (BD®FACSort; Annexin V-FITC; 7-AAD); tempo de exposição 24 h e 48 h; células sem tratamento (PT64-04), tratadas com ácido zoledrônico 10 μ M (ZA) e co-tratadas com ácido zoledrônico 10 μ M e extrato de *A. chica* 5 μ g mL⁻¹ (ZA + AC 5); linhagem PT64-04HF (fibroblasto humano primário); condições de cultivo: DEMEM 5% SFB; incubação a 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂.

Um resultado interessante foi observado em alguns grupos de fibroblastos tratados com ZA durante 48 h. As imagens obtidas por citômetro de fluxo eram sugestivas de apoptose (Figura 31).

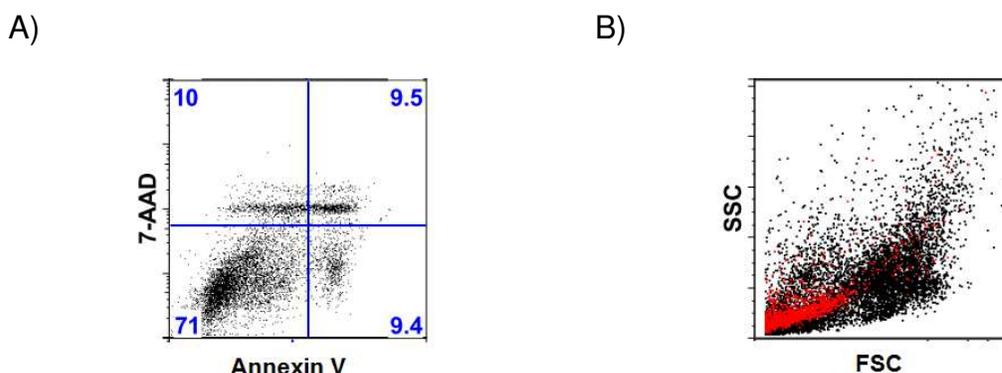


Figura 31: Imagens obtidas em citômetro de fluxo após 48 h de tratamento de fibroblastos com ZA. A) células coradas com Anexina V vs 7-AAD; B) Forward Scatter (FSC) vs Side Scatter (SSC)

Análise por citometria de fluxo (BD®FACSsort; Annexin V; 7-AAD); tempo de exposição 48 h; células tratadas com ácido zoledrônico 10 μ M (ZA); linhagem PT64-04HF (fibroblasto humano primário); condições de cultivo: DEMEM 5% SFB; incubação a 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂.

Apesar da imagem em citometria de fluxo ser indicativa da ocorrência de apoptose, a análise em Forward Scatter (FSC) vs Side Scatter (SSC) (Figura 31B) verificou que as células identificadas com Anexina V-FITC encontravam-se na faixa daquelas com alterações morfológicas (representadas pela coloração vermelha na Figura 31B), indicando uma morfologia muito menor do que as células normais. Esse resultado sugeriu a ausência de apoptose, já que esta é caracterizada em células com pequenas ou sem alterações morfológicas.

As análises por luminescência (CaspaseGlo® – Promega®) revelaram um aparente aumento da ativação das caspases 3/7 após 48 h de tratamento com ZA em fibroblastos. No entanto, após análise estatística (Teste T de Student) não foi verificada diferença entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 32).

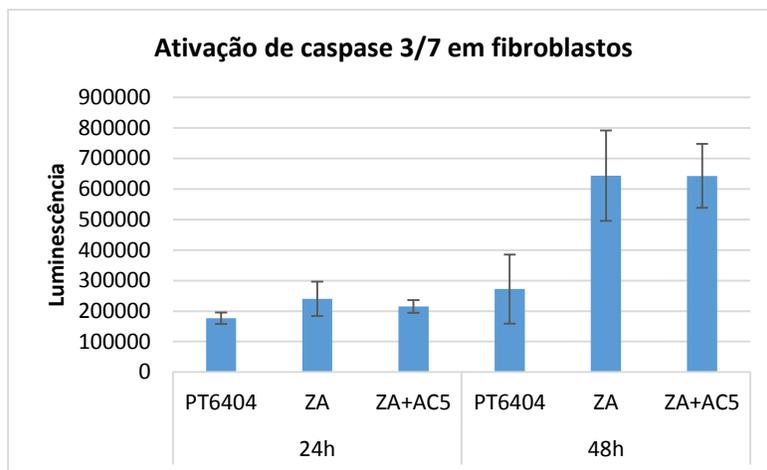


Figura 32: Atividade das caspases 3/7 em fibroblastos.

Atividade de caspases 3/7 (CaspaseGlo® – Promega®) tempo de exposição: 24 h e 48 h; células sem tratamento (PT6404), tratadas com ácido zoledrônico 10 μM (ZA) e co-tratadas com ácido zoledrônico 10 μM e extrato de *A.chica* 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ZA + AC 5); linhagem: PT64-04HF (fibroblasto humano primário); condições de cultivo: DMEM 5% SFB; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO_2 .

5.2.4.3 - Osteoblastos

A análise em citometria de fluxo, revelou a não ocorrência de apoptose significativa para osteoblastos tratados com ácido zoledrônico 10 μM (ZA) ou co-tratados com ácido zoledrônico e *A. chica* 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ZA+AC10) durante 24 h ou 48 h, quando comparados ao grupo sem tratamento ($p > 0,05$) (Figura 33).

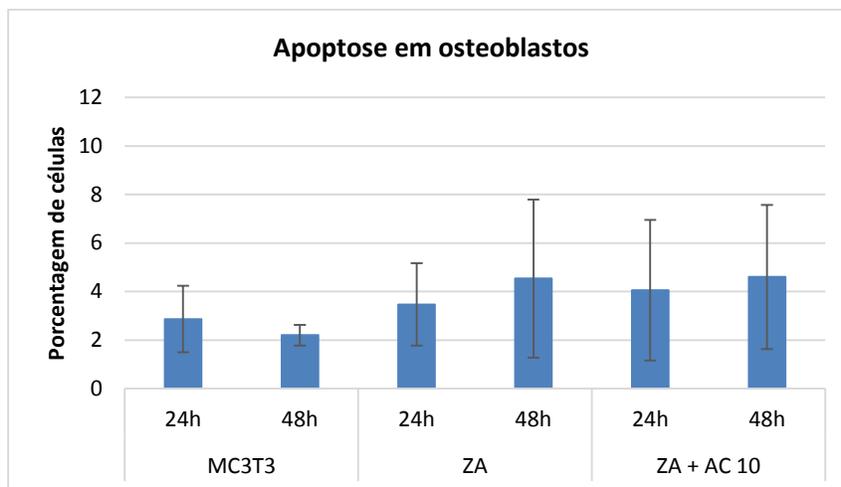


Figura 33: População de osteoblastos (%) em apoptose.

Análise por citometria de fluxo (BD@FACSort; Annexin V-FITC; 7-AAD); tempo de exposição 24 h e 48 h; células sem tratamento (MC3T3); tratadas com ácido zoledrônico 10 μM (ZA) e co-tratadas com ácido zoledrônico 10 μM e extrato de *A. chica* 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ZA + AC 10); linhagem MC3T3-E1 (pré-osteoblasto de rato imortalizado); condições de cultivo: Alpha-MEM 5% SFB; incubação a 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO_2 .

As análises por luminescência (CaspaseGlo® – Promega®) para verificação de ativação de caspases 3/7 em osteoblastos não demonstraram diferenças estatísticas entre a maioria dos grupos testados, tanto durante 24 h quanto 48 h ($p > 0,05$). Exceto para o grupo tratado com ácido zoledrônico 10 μM (ZA) durante 48 h, onde o valor encontrado de estimulação de caspases 3/7 foi significativo ($p < 0,05$). O grupo co-tratado com ácido zoledrônico 10 μM e extrato de *A. chica* 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ZA+AC10) foi estatisticamente semelhante aos grupos ZA e sem tratamento (Figura 34).

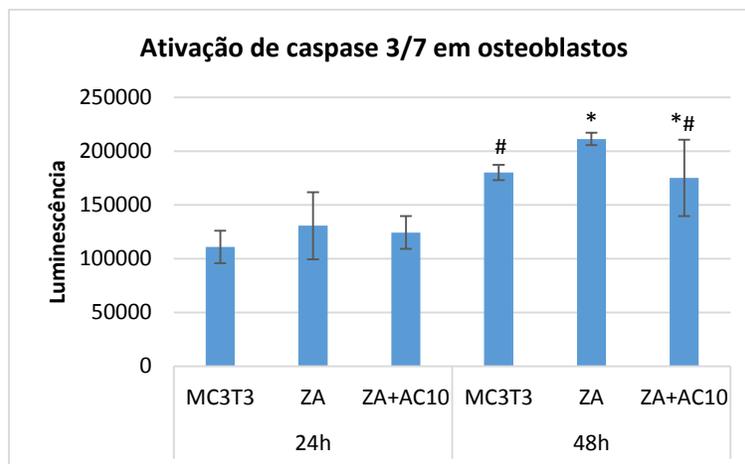


Figura 34: Atividade das caspases 3/7 em osteoblastos.

*,#símbolos diferentes representam diferença estatística Teste T Student $p < 0,05$; Atividade de caspases 3/7 (CaspaseGlo® – Promega®) tempo de exposição: 24 h e 48 h; células sem tratamento (MC3T3); tratadas com ácido zoledrônico 10 μM (ZA) e co-tratadas com ácido zoledrônico 10 μM e extrato de *A. chica* 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ZA + AC 10); linhagem: MC3T3-E1 (pré-osteoblasto de rato imortalizado); condições de cultivo: Alpha-MEM 5% SFB; incubação a 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO_2 .

5.2.5 - Experimentos com células tumorais – C4-2B

Concentrações do extrato de *A. chica* maiores ou iguais 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram citotóxicas para as células C4-2B. As concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ reduziram significativamente a viabilidade das células em 40% e 63% ($p < 0,05$), respectivamente, sendo estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). As concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AC apresentaram valores de viabilidade celular similares às células sem tratamento e semelhantes entre si ($p > 0,05$). No entanto, uma indução significativa do crescimento das células de câncer foi observado com a concentração de 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AC, quando comparada ao grupo sem tratamento ($p < 0,05$). Os resultados apresentados com as concentrações de 2,5 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AC foram semelhantes entre si (Tabela 15).

Tabela 15 –Viabilidade (%) de C4-2B tratados com diferentes concentrações do extrato de *A. chica*.

	C4-2B	2,5 µg mL⁻¹	5 µg mL⁻¹	10 µg mL⁻¹	25 µg mL⁻¹	50 µg mL⁻¹
AC	100*	147,0 (±19,4) [#]	120,9 (±14,9) ^{*#}	103,7 (±5,8) [*]	60,9 (±13,9) [§]	37,7 (±1,6) [¥]

*,#,§,¥símbolos diferentes representam diferença estatística ANOVA $p < 0,05$; resultados expressos como média \pm desvio padrão; tempo de exposição: 48 h; linhagem: C4-2B (osteoblasto tumorigênico de rato de origem prostática humana); condições de cultivo: RPMI 5% SFB; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂. Método de avaliação por absorvância utilizando-se o cristal de violeta.

As células também foram submetidas ao tratamento com ácido zoledrônico 5 µM durante 48 h (Tabela 16), e apresentaram uma redução de sua viabilidade em 48%, valor semelhante ao obtido pela concentração de 25 µg mL⁻¹ de AC.

Tabela 16 – Viabilidade (%) de C4-2B tratados com ácido zoledrônico 5 µM:

C4-2B	ZA 5 µM
100	52 (±3,6) [*]

*símbolos diferentes representam diferença estatística ANOVA $p < 0,05$; resultados expressos como média \pm desvio padrão; tempo de exposição: 48 h; linhagem: C4-2B (osteoblasto tumorigênico de rato de origem prostática humana); condições de cultivo: RPMI 5% SFB; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂. Método de avaliação por absorvância utilizando-se o cristal de violeta.

5.2.6 – Experimentos envolvendo *Streptococcus mutans*

5.2.6.1 – Crescimento de bactérias expostas ao extrato de *Arrabidaea chica*

O crescimento de *Streptococcus mutans* tratado com diferentes concentrações do extrato de *A. chica* (AC; 0,1; 1; 5; 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 48 h, está representado em valores de densidade óptica (O.D.) (Figura 35). Não houve alteração no crescimento bacteriano após tratamento com AC em diferentes concentrações.

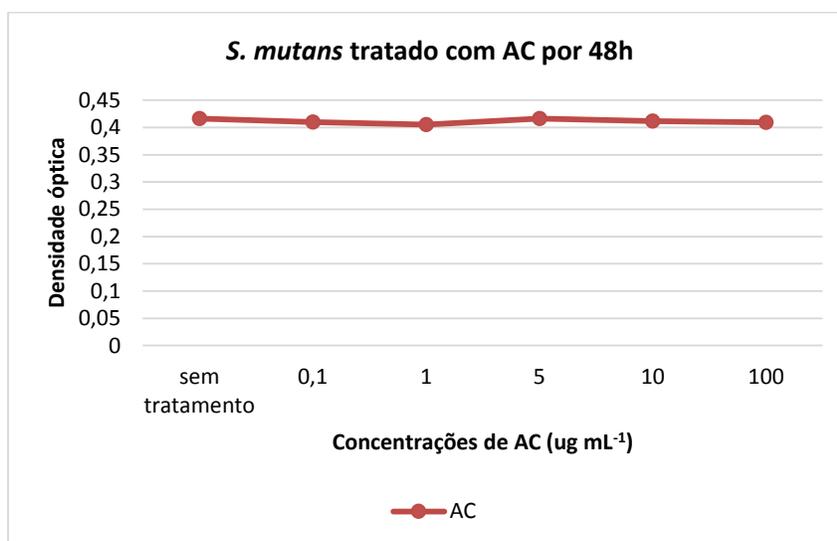


Figura 35 – Densidade óptica obtida após 48 h de tratamento de *S. mutans* com diferentes concentrações do extrato de *A. chica*.

Resultados de leitura de densidade óptica (Thermo Fisher® Scientific BIOMATE 3); o desvio padrão foi igual ou inferior a 0,001 para todos os grupos; tratamento com diferentes concentrações do extrato de *A. chica* (AC); tempo de exposição: 48 h; bactéria *Streptococcus mutans*; condições de cultivo: meio BHI; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO_2 .

5.2.6.2 – Crescimento de *S. mutans* exposto ao ácido zoledrônico

O ácido zoledrônico (ZA) não interferiu no crescimento bacteriano em concentrações inferiores a 50 μM . Um aumento desses valores foi observado com

tratamentos que utilizaram ZA nas concentrações de 50 e 100 μM , tanto 24 h quanto 48 h após (Figura 36).

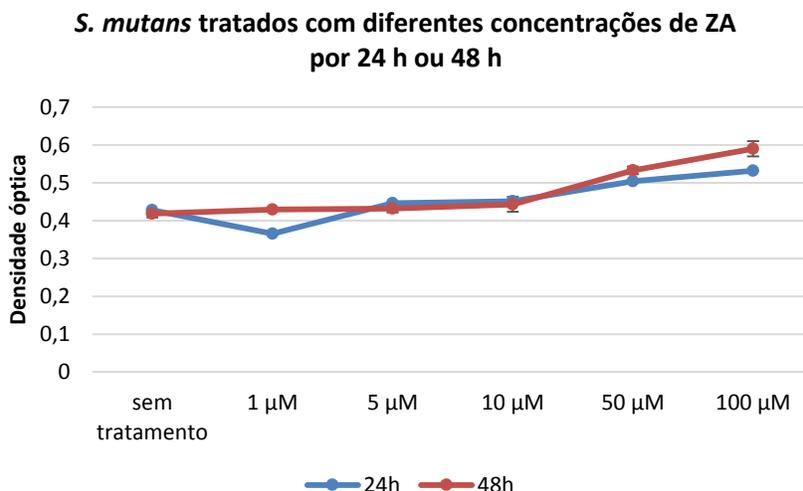


Figura 36 – Densidade óptica média obtida após 24 h ou 48 h de tratamento de *S. mutans* com diferentes concentrações de ácido zoledrônico.

Em 24h de tratamento os valores de desvio padrão foram iguais ou inferiores a 0,001. Resultados de leitura de densidade óptica (Thermo Fisher® Scientific BIOMATE 3); tratamento com diferentes concentrações de ácido zoledrônico (ZA); tempo de exposição: 24 h ou 48 h; bactéria *Streptococcus mutans*; condições de cultivo: meio BHI; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂.

5.2.6.3 – Crescimento de *S. mutans* exposto ao co-tratamento de ácido zoledrônico com o extrato de *Arrabidaea chica*

O crescimento de *S. mutans* submetido aos co-tratamentos de ácido zoledrônico (ZA) nas concentrações de 1, 5, 10, 50 ou 100 μM com o extrato de *A. chica* (AC) 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi avaliado em valores de densidade óptica (O.D.) (Figura 37). Verificou-se que na presença do medicamento, AC não demonstrou qualquer efeito significativo. As concentrações de ZA maiores do que 50 μM aumentaram os valores de O.D. indicando crescimento bacteriano, quando comparado aos valores de O.D. do grupo sem tratamento (0,416).

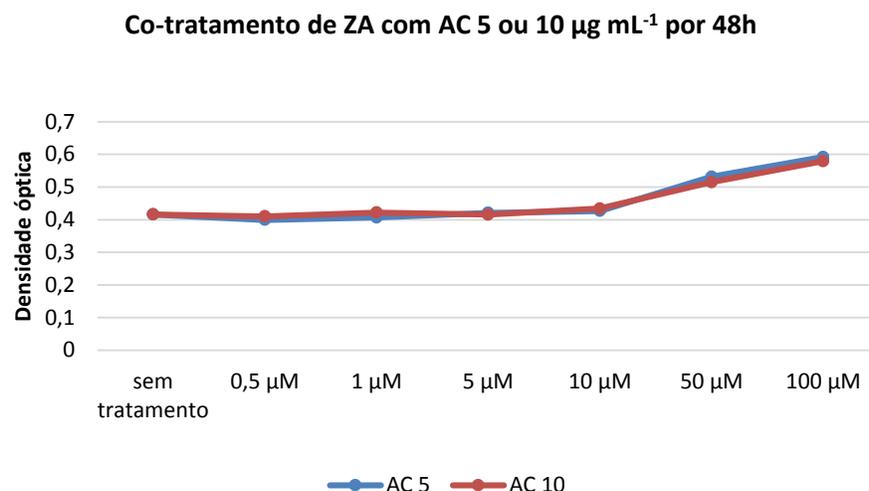


Figura 37 – Densidade óptica obtida após 48 h de co-tratamento de *S. mutans* com extrato de *A. chica* 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e diferentes concentrações de ácido zoledrônico.

Resultados de leitura de densidade óptica (Thermo Fisher® Scientific BIOMATE 3); o desvio padrão foi igual ou inferior a 0,001 para todos os grupos; co-tratamento com diferentes concentrações de ácido zoledrônico (ZA) e extrato de *A. chica* 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (AC 5) ou 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (AC 10); tempo de exposição: 48 h; bactéria *Streptococcus mutans*; condições de cultivo: meio BHI; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO_2 .

5.2.6.4 – Exposição de *S. mutans* a condições de troca de tratamento

O tratamento de *S. mutans* com ácido zoledrônico (ZA) 5, 10 ou 100 μM com ou sem troca do meio de cultura no tempo de 6 h, demonstrou um aumento do crescimento bacteriano (em valores de densidade óptica – O.D.) todas as vezes em que os microorganismos foram expostos à ZA 100 μM (Figura 38), seja após 6 h ou 12 h, trocando-se ou não o meio de cultura. Porém, quando o medicamento na concentração 100 μM foi retirado do meio para a introdução de um novo meio de cultura sem tratamento (condição ZA100 – M), esse aumento em O.D. não ficou

evidente. A introdução do ácido zoledrônico no meio, de 10 a 100 μM , aumentou significativamente as leituras de O.D.

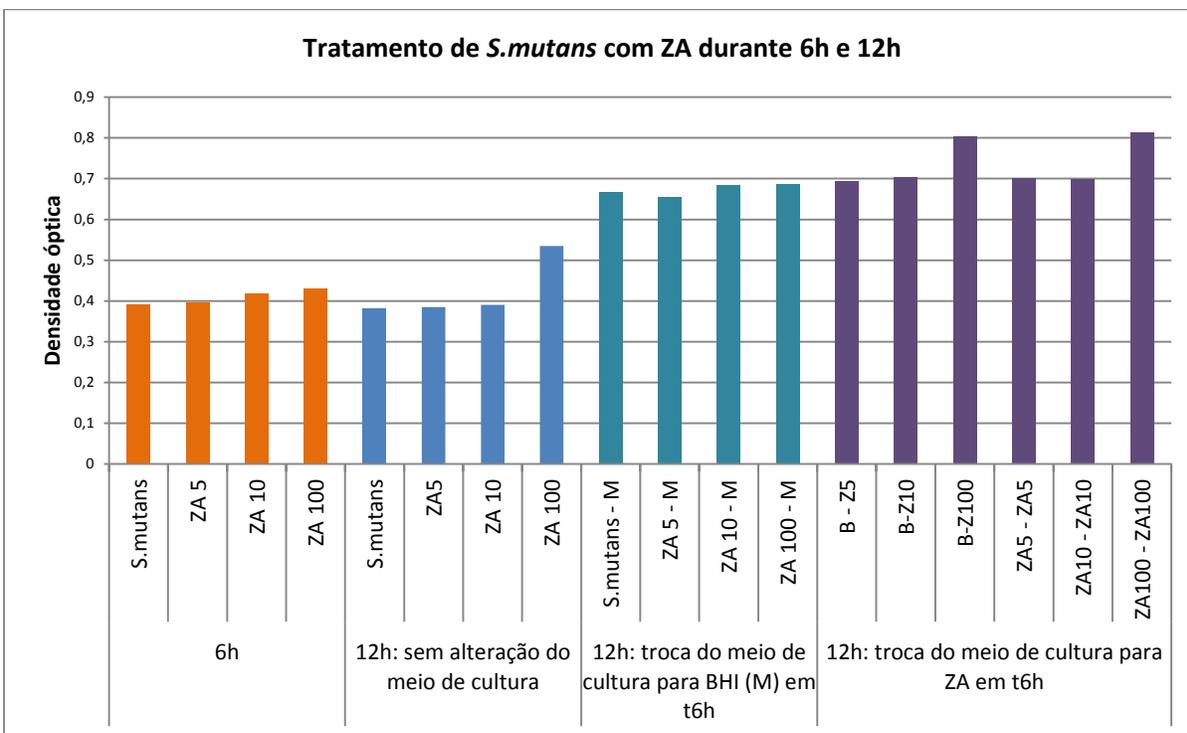


Figura 38: Densidade óptica de *S. mutans* obtida após diferentes condições de troca de tratamento ou não, com as concentrações de ácido zoledrônico (ZA) 5, 10 e 100 μM .

Resultados de leitura de densidade óptica (Thermo Fisher® Scientific BIOMATE 3) expressos como média; o desvio padrão foi igual ou inferior a 0,001 para todos os grupos; tempo final de tratamento de 12 h; durante o tempo de 6 h houve troca do meio de cultura ou não; bactérias sem tratamento (B); adição de meio de cultura sem tratamento (M); tratamento com ácido zoledrônico nas concentrações de 5 μM (ZA 5), 10 μM (ZA 10) e 100 μM (ZA 100); bactéria *Streptococcus mutans*; condições de cultivo: BHI; 37°C, atmosfera úmida, 5% de CO_2 .

6 DISCUSSÃO

Grande parte das moléculas que revelaram potencial terapêutico entre os anos de 1981 e 2011 foram direta ou indiretamente de origem natural (Newman e Cragg, 2012). Dentro desse contexto, o Brasil apresenta um importante papel no desenvolvimento de seu perfil de plantas medicinais e fitoterápicos devido ao vasto patrimônio genético e diversidade cultural (Brasil, 2006); o que precisa ser cada vez mais expandido, estudado e embasado cientificamente. O mercado dos fitoterápicos representa um futuro promissor, sendo que o Ministério da Saúde publicou em fevereiro de 2009 a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus). Muitas das espécies presentes nessa lista ainda necessitam de estudos complementares para validação de sua eficácia e segurança, já que se tratam muitas vezes de plantas nativas ou exóticas adaptadas, de uso popular bastante estabelecido (Rennisus, 2009). Dentre as principais espécies citadas, tem-se a *Arrabidaea chica* Verlot como potencial agente terapêutico para o tratamento de diversas enfermidades e auxiliar da cicatrização de feridas (Brasil, 2006; Jorge *et al.*, 2008).

As desoxiantocianidinas 6,7-tri-hidroxi-5-metoxiflavílio, 6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavílio e carajurina (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio) são encontradas no extrato de *A. chica* e demonstraram estarem envolvidas com a atividade farmacológica estudada neste trabalho (Jorge *et al.*, 2008), o que também foi descrito por Mafioleti *et al.* (2013). O extrato padronizado de *Arrabidaea chica* foi produzido a partir de insumo previamente padronizado (processo FAPESP 2007/52739-9) por maceração em solução de etanol 70% / água 30% e ácido cítrico 0,3%. As antocianinas são solúveis em álcool e água podendo ser facilmente extraídas com solventes polares, como o etanol e o metanol. O emprego do ácido cítrico tem por objetivo manter um pH ácido para a manutenção da estabilidade das antocianidinas do extrato (Macz-Pop *et al.*, 2006), que são altamente reativas devido a presença do cátion flavílio.

Além disso, cuidados adicionais, como o controle da temperatura, já que as antocianinas são estáveis até 60 °C, e também a proteção contra luminosidade, por sofrerem alterações com exposição à luz UV (Cardoso *et al.*, 2011), foram outros parâmetros controlados durante todo o processo de produção.

A sensibilidade às condições ambientais estimularam o estudo para o desenvolvimento de uma formulação que pudesse proteger o extrato de *A. chica* contra a degradação. A microencapsulação em material formador de parede contendo mistura de goma arábica e maltodextrina 1:1, foi a escolhida para os estudos de estabilidade acelerada, devido às características de excelente emulsificação e retenção de voláteis inerentes à goma arábica, somadas à baixa viscosidade, baixo custo e alto poder de proteção contra oxidação da maltodextrina (Fernandes *et al.*, 2008). No entanto, não foram encontrados resultados satisfatórios com esse tipo de agente microencapsulante: após 30 dias de incubação as amostras encapsuladas apresentaram uma perda em 88% de seu teor de antocianidinas. As imagens obtidas por MEV demonstraram ainda a formação de micropartículas rugosas e com depressões. A forte contração das gotículas durante o primeiro estágio do processo de secagem pode ter provocado as depressões em suas paredes, o que foi verificado por Rosenberg *et al.* (1998) e Ré (1998) em micropartículas formadas por goma arábica. As misturas de materiais formadores de paredes foram avaliadas por Sankarikutty *et al.* (1988), que reportaram uma efetiva microencapsulação para o óleo de cardamomo com diferentes proporções de combinação de goma arábica com maltodextrina, sendo que a combinação 1:2,3 foi a que proporcionou a formação de melhores cápsulas. Neste estudo, a proporção goma arábica/maltodextrina foi de 1:1, que não demonstrou bons resultados de estabilidade para as condições de armazenamento estudadas, mostrando-se ineficaz para a manutenção da estabilidade do extrato (ANVISA RE 01/2005).

A espécie *Arrabidaea chica* tem apresentado efeitos indutores de citoproliferação e cicatrização. O estudo de Jorge *et al.* (2008) revelou que o extrato da planta induziu a proliferação de fibroblastos *in vitro* de maneira concentração-

dependente; estimulou a síntese de colágeno *in vivo* (em ratos) e *in vitro*; apresentou atividade anti-ulcerogênica em modelos experimentais em ratos e moderada capacidade antioxidante. Medeiros *et al.* (2011) verificaram a atividade do extrato na proteção de células hepáticas, em ratos. Aro *et al.* (2013 a e b) reportaram, também em ratos, efeitos cicatriciais com ênfase na estimulação de colágeno em lesões parciais no tendão calcâneo ou de aquiles. Neste estudo, a atividade do extrato de *A. chica* foi verificada em experimentos que visaram a simulação *in vitro* da condição de OMIB, com a presença de ácido zoledrônico influenciando o ambiente celular.

O zoledronato (ZA - ácido zoledrônico) é um dos principais medicamentos envolvidos na ocorrência de OMIB. Apesar de caracterizada como rara, a condição tem aumentado sua incidência desde os primeiros relatos de sua ocorrência em 2003 (Marx *et al.*, 2003), devido ao aumento do número de prescrições médicas. Em fevereiro de 2012, a Secretaria de Farmacovigilância do Estado de São Paulo publicou o alerta terapêutico do uso de bisfosfonatos associado ao risco da lesão, e a partir disso, vê-se a importância que o assunto adquire nos dias atuais (São Paulo, 2013).

Além dos efeitos diretos e indiretos em osteoblastos e osteoclastos, a literatura relata a toxicidade dos bisfosfonatos em células epiteliais de maneira concentração-dependente (Scheper *et al.*, 2010; Cozin *et al.*, 2011; Draenert *et al.*, 2012; Arai *et al.*, 2013) o que justificaria o início da progressão de OMIB nas maxilas a partir de alterações epiteliais, com a consequente formação de feridas e exposição óssea. Não há uma completa elucidação sobre o mecanismo de toxicidade de ZA nas células epiteliais, sendo que a apoptose e a ativação de caspases, principalmente a caspase 3, foi uma das principais causas apontadas (Scheper *et al.*, 2008; Scheper *et al.*, 2010; Ravosa *et al.*, 2010). Outros estudos defendem que não há uma ativação efetiva da apoptose, mas sim a ocorrência majoritária de necrose a partir de alterações em DNA e ciclo celular (Pan *et al.*, 2004; Agis *et al.*, 2010; Ohnuki *et al.*, 2012; Arai *et al.*, 2013).

Neste trabalho, os testes em citometria de fluxo não apontaram a ocorrência de apoptose em queratinócitos, fibroblastos ou osteoblastos de maneira significativa. A morte celular foi deflagrada, mas aparentemente devido a uma necrose. A análise em citometria de fluxo em fibroblastos, demonstrou uma indicação efetiva da anexina V no tempo de 48 h (item 5.2.4.2, Figura 31), no entanto, esse fato foi atribuído a células com alterações morfológicas e de tamanho, muito menores que células viáveis. Patntirapong *et al.* (2012) indicaram a ocorrência de alterações morfológicas provocadas por ZA. Ohnuki *et al.* (2012) em um estudo com queratinócitos humanos primários expostos à concentração de 10 μM do medicamento, observaram poucas células apoptóticas após 48 h de tratamento, e um aumento numérico de células necróticas de acordo com o tempo de incubação. Os mesmos autores também relataram um aumento na fase S do ciclo celular, o que provocaria a diminuição de sua proliferação. Esses dados corroboram com os resultados em citometria de fluxo do presente estudo, que observou além de uma apoptose pouco evidente, uma provável alteração da morfologia celular. Alterações morfológicas podem provocar modificações na permeabilidade de membrana, permitindo a ligação da anexina V à fosfatidilserina interior às células na ausência de sua externalização, o que explicaria uma imagem de aparente apoptose obtida em alguns casos. Além disso, não houve ativação de caspase 3/7 em fibroblastos, o que suporta a hipótese de necrose celular para essas células; porém em osteoblastos, após 48 h de tratamento com ZA, a caspase 3/7 esteve ativa. Uma hipótese para a indicação de ativação de caspases 3/7 sem apoptose evidente em citometria de fluxo, poderia ser a identificação de células em estágio inicial de apoptose, em que houve a ativação de caspase, mas ainda não foi externalizada a fosfatidilserina interior, entretanto, nada pode ser concluído e mais pesquisas são necessárias. O resultado encontrado neste estudo pode ser comparado ao demonstrado por Kobayashi *et al.* (2010), que descreveram ausência da ativação de caspase 3/7 em osteoblastos (MC3T3-E1) com concentrações de até 100 μM de ZA, mas para um tempo de 24 h de exposição. Já Patntirapong *et al.* (2012)

descreveram alterações morfológicas e apoptose em MC3T3-E1 em 24 h de tratamento com ZA.

Com relação aos efeitos sobre a viabilidade celular, após 24 h de tratamento com ZA 10 μ M, nenhum efeito citotóxico foi verificado nas células deste estudo. Contrariamente, Açil *et al.* (2012) relataram um aumento da proliferação de fibroblastos com ZA 1 – 20 μ M, enquanto Scheper *et al.* (2008) verificaram diminuição na proliferação, respectivamente para HaCaT (queratinócito) e HGF (fibroblasto gengival), em 72% e 31,3% após o tratamento com ZA 3 μ M. Naidu *et al.* (2008) também reportaram redução da viabilidade de osteoblastos em 24 h de exposição a ZA 100 μ M, considerada uma alta concentração do medicamento. Valores de 1 a 10 μ M de ZA representam o pico daqueles encontrados em plasma sanguíneo, 15 minutos após a infusão do medicamento (Skerjanec *et al.*, 2003). Além disso, esse valor é maior do que as concentrações mensuradas em saliva de pacientes com OMIB ou sob o uso de ZA, que são de aproximadamente de 0,4 a 5 μ M (Scheper *et al.*, 2009).

Os efeitos citotóxicos de ZA são concentração-dependentes e tempo-dependentes. Ravosa *et al.* (2010) descreveram que apenas concentrações de ZA maiores ou iguais a 10 μ M para queratinócitos e maiores ou iguais a 30 μ M para fibroblastos, diminuiriam a viabilidade dessas células em 48 h. Com relação à linhagem MC3T3-E1, Patntirapong *et al.* (2012) verificaram uma redução em aproximadamente 41-79% da viabilidade celular após 3 dias de tratamento com ZA 0,1 - 100 μ M. Uma diminuição em aproximadamente 50% para as mesmas células expostas a ZA 10 μ M por três dias foi reportada por Schindeler & Little (2005). Utilizando-se a concentração de 10 μ M de ZA em um tempo de 48 h, observou-se uma redução da viabilidade, respectivamente para queratinócitos (HaCaT), fibroblastos (PT64-04) e osteoblastos (MC3T3-E1), em 34%, 47% e 51%.

As condições de co-tratamento (ZA 10 μ M com o extrato de *A. chica*) por 48 h foram aquelas que apresentaram os resultados mais efetivos de citoproteção contra os efeitos prejudiciais de ZA, promovido pelo extrato da planta.

Comparativamente aos tratamentos somente com ZA, o co-tratamento com a concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de *A. chica* aumentou a viabilidade celular, respectivamente para queratinócitos, fibroblastos e osteoblastos, em 15%, 29% e 6%. Quando o co-tratamento envolveu a concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ esse aumento foi em 2%; 17% e 15%. Após 72 h de tratamento com ZA, a viabilidade celular de fibroblastos e osteoblastos foi reduzida em 76% e 65%, respectivamente, não sendo revertida nas situações de co-tratamento com o extrato de *A. chica*.

A proposta inédita de mimetização de condições clínicas introduzindo-se o extrato de *A. chica* previamente ou posteriormente à terapêutica com bisfosfonatos, que envolveu protocolos com dois momentos distintos de tratamento, não apresentou resultados significativos com relação ao extrato. Verificou-se que nas condições de pós-terapia, após o início da cascata de eventos biomoleculares decorrentes da adição de ZA, é difícil a reversão ou interrupção de efeitos de toxicidade celular.

As concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato de *A. chica* comportaram-se de maneira semelhante com relação aos seus efeitos de citoproteção. A efetividade das baixas concentrações do extrato pode ser explicada devido à sua moderada atividade antioxidante (Jorge *et al.*, 2008; Siraichi *et al.*, 2013a). Altas concentrações de antioxidantes causariam um desequilíbrio na quantidade de peróxidos presentes no meio celular, sendo citotóxicos, enquanto baixas concentrações auxiliam o funcionamento celular (Fatokun *et al.*, 2008). Sabe-se ainda que a estabilidade das antocianinas presentes no extrato de *A. chica* é melhorada em condições ácidas, assim como condições ácidas favorecem a formação das antocianidinas (Macz-Pop *et al.*, 2006). Dessa maneira, em uma situação de OMIB onde além da presença de ZA haja também uma condição infecciosa, o ambiente ácido poderia auxiliar o desempenho do extrato da planta, representando uma vantagem em sua utilização.

O tratamento de OMIB ainda é controverso. As medidas paliativas adotadas são a limpeza local, a remoção de sequestro ósseo e a administração de

antibióticos (Forsgren *et al.*, 2011). Outros autores demonstraram que a reposição de geranilgeraniol, bloqueado na via do mevalonato pelos bisfosfonatos nitrogenados, seria uma alternativa para o tratamento da lesão (Marcuzzi *et al.*, 2011; Ziebart *et al.*, 2011). Os lasers de alta e de baixa potência também têm apresentado resultados importantes para o auxílio da melhora dos sintomas da doença (Martins *et al.*, 2012).

A alternativa de utilização de agentes citoprotetores para o tratamento de lesões de OMIB é algo novo e promissor. Draenert *et al.* (2012) descreveram viabilidade semelhante às células sem tratamento em fibroblastos e osteoblastos humanos primários co-tratados com ZA 50 μM e dexrazoxane 600 μM . Assim como o extrato de *A. chica*, dexrazoxane apresenta atividade antioxidante (Sociedade Brasileira de Cardiologia - SBC, 2011), porém, sem as vantagens do baixo custo e a fácil acessibilidade para a população apresentados pela planta.

As concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato de *A. chica*, que demonstraram efeitos citoprotetores em células sob tratamento com ZA, não estimularam de maneira significativa o crescimento das células C4-2B, neste estudo. Esse resultado sugere a possibilidade de um tratamento de feridas de OMIB próximas a tumores, sem que haja a estimulação das células malignas.

A linhagem C4-2B é de origem prostática com características osteoblásticas. Aproximadamente 15 a 30% dos pacientes diagnosticados com câncer de próstata acabam desenvolvendo a doença em osso (Rigaud *et al.*, 2002). O câncer ósseo geralmente desenvolve-se a partir de uma metástase ou de um tumor primário que acaba invadindo os tecidos, sendo raramente uma condição primária (Yang *et al.*, 2012). Auxiliares no manejo de patologias causadoras de osteólise maligna, por inibirem as ações de osteoclastos, os bisfosfonatos são empregados em tratamentos desse tipo de câncer e portanto, eventualmente OMIB pode estar relacionada a uma situação oncológica que afete o tecido ósseo. Nesse contexto, além da ausência de efeitos nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o extrato de *A. chica* demonstrou bons resultados para um efeito antiproliferativo em

C4-2B: concentrações maiores ou iguais a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram citotóxicas, reduzindo a viabilidade das células em 40% e 63% (respectivamente a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$), aproximadamente. Bhuiyan *et al.*, (2006) verificaram que após um período de 48 h de tratamento, 3,3'-diindolimetano $25 \mu\text{M}$ foi capaz de reduzir a viabilidade de C4-2B em 50%. Banerjee *et al.*, (2007) relataram uma redução em 15%, 32% e 56% na viabilidade de C4-2B conseguida com o taxotere combinado ao ABT-627 (antagonista do receptor do vasoconstritor endotelina), nas concentrações respectivas de 10, 25 e $50 \mu\text{M}$, após 72 h de tratamento. Yang *et al.* (2012) reportaram uma diminuição da proliferação celular com bevacizumab (anticorpo monoclonal IgG1 capaz de inativar o fator de crescimento endotelial - VEGF) de maneira concentração-dependente. Após dois dias de tratamento a concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi a efetiva em diminuir a proliferação em cerca de 40%, e em 3 dias essa diminuição atingiu 83%. O extrato de *A. chica* foi efetivo em reduzir a viabilidade de C4-2B de uma maneira comparável aos estudos descritos, e em uma concentração cerca de quatro vezes menor do que bevacizumab.

No estudo de Lim *et al.* (2005) os autores verificaram em células LNCaP um aumento na produção de peróxidos que poderia estar relacionada à tumorigenicidade dessas células em pesquisas com animais. Visto que o aumento de espécies oxigênio reativas pode induzir a proliferação de tumores (National Cancer Institute – NCI), a atividade antioxidante apresentada pelo extrato de *A. chica* (Jorge *et al.*, 2008; Siraichi *et al.*, 2013a) poderia justificar seus efeitos antiproliferativos, bem como representar uma vantagem de sua utilização para essa finalidade.

Neste estudo, a viabilidade de C4-2B também foi alterada por ZA $5 \mu\text{M}$, e reduzida em 52% após 48 h de tratamento com o medicamento. Corey *et al.*, (2003) demonstraram que ZA $13,6 \mu\text{M}$ promoveu uma significativa inibição da proliferação celular (15-45%) após dois dias de tratamento em células LNCaP e PC-3. Em estudo *in vivo* verificou-se que ZA ($5 \mu\text{g/rato}$, 2x/semana) apresentou efeitos antiproliferativos em tumores ósseos originados de células C4-2B (Li *et al.*, 2011).

Os bisfosfonatos têm-se mostrado potenciais medicamentos auxiliares para o tratamento de tumores (Debiais F, 2013).

Além da possibilidade de envolvimento das células tumorais em feridas de OMIB, outra importante condição a ser observada é a infecção bacteriana. Grande parte das manifestações de OMIB caracteriza-se pela presença de exposição óssea necrótica associada à infecção, e também dor, edema, parestesia, supuração e ulcerações em tecidos moles (Pires *et al.*, 2005). Efeitos sobre a proliferação bacteriana também foram estudados com relação aos bisfosfonatos: Muller *et al.* (2012), verificaram que o bisfosfonato clodronato 100 μM diminuiu a concentração celular de *S. mutans* após um período de 20 h de incubação, de 0,57 (\pm 0,15) para 0,26 (\pm 0,08) em OD₆₀₀ unidades. Neste estudo, ao contrário, observou-se um efeito indutor de crescimento de *S. mutans* promovido por ZA em altas concentrações (100 μM). Kobayashi *et al.* (2010), observaram que ZA estimulou a aderência de *S. mutans* à hidroxiapatita (concentrações maiores do que 100 μM), apresentando dessa maneira, resultados comparáveis aos obtidos nestes experimentos.

As concentrações plasmáticas de pacientes usuários de ZA são estimadas entre 1 a 10 μM (pico após a infusão medicamentosa intravenosa), e as do fluido gengival e saliva entre 4,5 – 5 μM (Scheper *et al.*, 2009). Esses valores são menores do que os necessários para a promoção de um crescimento visível de *S. mutans*, de acordo com o presente estudo; porém, por hipótese é possível que em determinadas situações, possa haver uma estimulação do crescimento bacteriano, até mesmo de outras espécies que não foram, neste trabalho, estudadas. Ohnuki *et al.* (2012) verificaram que o tratamento com ZA de uma mucosa oral feita através de engenharia tecidual, resultou em um epitélio mais fino e com células basais menos organizadas do que o de um tecido sem tratamento. Dessa maneira, a exposição oral de um osso contendo bisfosfonato incorporado poderia representar uma alta concentração relativa do medicamento na região, predispondo a uma estimulação bacteriana. Além disso, um epitélio mais fino e

desorganizado apresenta dificuldades de cicatrização, estimulando condições para a necrose tecidual. Com a proliferação de bactérias orais, a ocorrência de infecção óssea e da mucosa seria facilitada, o que acarretaria fatalmente em osteonecrose maxilar.

Há uma participação efetiva das bactérias orais no mecanismo de OMIB, e dessa forma, uma avaliação microbiológica é recomendável em estudos que envolvam terapias para o tratamento da doença. Neste estudo, verificou-se que diferentes concentrações do extrato de *A. chica*, empregadas isoladas ou em co-tratamento com ZA, não influenciaram no crescimento de *S. mutans*, o que corrobora com os estudos de Duarte (2006) e Mafioletti *et al.* (2013) que verificaram ausência da atividade do extrato da planta contra o gênero *Streptococcus*.

O extrato de *A. chica* em baixas concentrações (5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou efeitos citoprotetores em células expostas a ZA, sem estimular o crescimento de células de câncer ou de *S. mutans*. Os resultados deste trabalho, embora preliminares, apresentam dados promissores que justificam uma aplicação-teste *in vivo* do extrato de *A. chica* em situações de OMIB. Condições *in vitro* muitas vezes não conseguem reproduzir adequadamente condições *in vivo*, e por isso seria indicada a realização dessa última condição, para complementação dos dados e obtenção de conclusões mais consistentes (Markowitz & Zhu, 2012). O extrato de *A. chica* poderia ser uma opção de tratamento adequada e acessível aos pacientes com a enfermidade.

7 CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* Verlot apresentou resultados promissores para a obtenção de um efeito citoprotetor de queratinócitos, fibroblastos e osteoblastos, quando tratados com ácido zoledrônico. Apesar disso, novos estudos *in vitro* e também *in vivo* devem ser conduzidos para a comprovação dos resultados observados preliminarmente.

As concentrações de *A. chica* entre 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não afetaram a viabilidade celular de células C4-2B, enquanto concentrações maiores do que essas foram citotóxicas.

Não ocorreu qualquer atividade do extrato hidroalcoólico de *A. chica*, em concentrações que variaram até 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre bactérias *Streptococcus mutans*. No entanto, concentrações de ácido zoledrônico superiores a 50 μM parecem estimular o crescimento bacteriano.

A microencapsulação do extrato de *Arrabidaea chica* em material formador constituído por mistura de goma arábica com maltodextrina (1:1) não se apresentou vantajosa com relação ao extrato bruto sem microencapsular para a obtenção de uma maior estabilidade dos princípios ativos.

REFERÊNCIAS

Arai N, Inoue S, Tomihara K, Tsuno H, Noguchi M. *In vitro* synergistic effects of zoledronic acid and calcium on viability of human epithelial cells. *Oral Dis.* 2013; 19(2):200-5.

Aro AA, Simões GF, Esquisatto MA, Foglio MA, Carvalho JE, Oliveira AL, Gomes L, Pimentel ER. *Arrabidaea chica* extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. *Injury.* 2013a; 44(7):884-92.

Bae EK, Lee SJ. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *J Microencapsul.* 2008; 25(8):549-60.

Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Hernandez S, Poveda R, Sanchis JM, Diaz JM, Scully C. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions Study of 20 cases. *Oral Oncol.* 2006; 42:327–29.

Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Braz J Pharma Sci.* 2005; 41:27–51.

Banerjee S, Hussain M, Wang Z, Saliganan A, Che M, Bonfil D, Cher M, Sarkar FH. *In vitro* and *In vivo* molecular evidence for better therapeutic efficacy of ABT-627 and taxotere combination in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007; 67(8):3818–25.

Barbosa WLR, Pinto LN, Quignard E, Vieira JMV, Silva Jr JOC, Albuquerque S. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach antifungal and trypanocidal activities. *Rev Bras Farmacogn.* 2008; 18:544-48.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Benford HL, Frith JC, Auriola S, Mönkkönen J, Rogers J. Farnesol and geranylgeraniol prevent activation of caspases by aminobisphosphonates: biochemical evidence for two distinct pharmacological classes of bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol*. 1999; 56:131-40.

Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, Nuttal ME, Rogers MJ. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts *in vitro*. *Bone*. 2001; 28:465-73.

Berenson JR, Linchtenstein A, Porter L, Dimopoulos MA, Bordonni R, George S, *et al*. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma myeloma: Aredia study group. *N Engl J Med*. 1996; 334:488-93.

Bhuiyan MM, Li Y, Banerjee S, Ahmed F, Wang Z, Ali S, Sarkar FH. Down-regulation of androgen receptor by 33'-diindolylmethane contributes to inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in both hormone-sensitive LNCaP and insensitive C4-2B prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2006; 15(20):10064-72.

Booncamp PM, van der Wee-Pals LJA, van Wijk-van Lennep MML, Thesing CW, Bijvoet OL. Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. *J Bone Miner Res*. 1986; 1:27-39.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocytes cell line. *J Cell Biol*. 1988; 106:761-71.

Brasil 2005. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária: guia de estudo de estabilidade. RE nº1 de 29 de julho de 2005. Brasília.

Brasil 2006. ANVISA - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) o decreto lei Nº5813 de 22 de junho de 2006. Brasília.

Brasil 2009. Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (Renuisus). Brasília, 2009. [acesso 2013 nov18]. Disponível em: <http://portalsaudegovbr/portal/arquivos/pdf/RENISUSpdf>.

Brouillard R, Dangles O. Flavonoids and flower colours. *The Flavonoids - Advances in Research Since 1986*. ed JB Harborne. Chapman & Hall. London 1993. p 565–586.

Buffo RA, Reineccius GA, Oehlert GW. Factors affecting the emulsifying and rheologica properties of gum acacia in beverages emulsions. *Food Hydrocoll*. 2001; 15:53-66.

Campisi G, Compilato D, Angelo I, Lo Muzio L, Colella G. Spontaneous bisphosphonate-related osteonecrosis of the left hemi-mandible: similarities with phossy jaw. *Indian J Dent Res*. 2012; 23(5):683-5.

Cano-Chauca M, Stringheta PC, Ramos AM, Cal-Vidal. J Effect of the carriers on the microstructure of mango powder spray drying and its functional characterization. *Innovat Food Sci Emerg Tech*. 2005; 6:420–8.

Cardoso LM, Leite JPV, Peluzio MCG. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. *Rev Colomb Cienc Quím Farm*. 2011; 40(1):116-38.

Carranza. *Periodontia clínica*. Michael G, Newman HH, Takei PR, Klokkevold F. A. Carranza 10a edição. Saunders/Elsevier, 2007.

Cartsos VM, Zhu S, Zavras AI. Bisphosphonate use and the risk of adverse jaw outcomes: A medical claims study of 714217 people. *J Am Dent Assoc*. 2008; 139:23–30.

Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras Farmacogn*. 2008; 18:314-19.

Castro LF, Silva ATA, Chung M, Ferreira AG, Ferreira EI. Bisphosphonates as osteotropic carriers for designing site-directed drugs. *Quím Nova*. 2004; 27(3).

Cavalcanti RN, Santos DT, Meireles MA. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems - an overview. *Food Res Int*. 2011; 44:499-509.

Chapman E, Perkin AG, Robinson R. The colouring matters of carajura. *J Chem Soc*. 1927; 3015-41.

Clarke B, Koka S. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw American College of Rheumatology. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws – update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67. [Acesso em 2013 nov19]. Disponível em: <http://www.rheumatology.org/publications/hotline/0606onjasp> 2006

Corey E, Brown LG, Quinn JE, Poot M, Roudier MP, Higano CS, Vessella RL. Zoledronic acid exhibits inhibitory effects on osteoblastic and osteolytic metastases of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2003; 9:295–306.

Corrêa PM. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional: Rio De Janeiro. 1926; 31-9.

Coskun Benlidayi I, Guzel R. Oral bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: a challenging adverse effect, *ISRN Rheumatol*. 2013; May,16. Doi: 101155/2013/215034.

Coxon FP, Benford HL, Russel RGG, Rogers MJ. Protein synthesis is required for caspase activation and induction of apoptosis by bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol*. 1998; 54:631-8.

Cozin M, Solemani K, Dadaian SC, Landesberg R, Raghavan S. Novel therapy to reverse the cellular effects of bisphosphonates on primary human oral fibroblasts. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 69(10):2564-78.

Da Costa SB, Duarte C, Bourbon AI, Pinheiro AC, Serra AT, Martins MM, Januário MIN, Vicente AA, Delgadillo I, Duarte C, *et al.* Effect of the matrix system in the delivery and *in vitro* bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. *J Food Eng.* 2012; 110:190–99.

Debiais F. Bone targeting agents: bisphosphonates. *Bull Cancer.* 2013; Nov;100(11):1199-206.

Devia B, Llabres G, Wouters J, Dupont L, Escribano-Bailon MT, Pascual-Teresa S, Angenot L, Tits M. New 3-Deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. *Phytochem Anal.* 2002; 13:114–20.

dos Santos VC, Longo TB, Garcia ALH, Richter MF, Guecheva TN, Henriques JAP, Ferraz ABF, Picada JN. Evaluation of the mutagenicity and genotoxicity of *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoneaceae) an Amazon plant with medicinal properties. *J Toxicol Environ Health A.* 2013; 76:381–90.

Draenert GF, Huetzen DO, Kämmerer PW, Palarie V, Nacu V. Dexrazoxane shows cytoprotective effects in zoledronic acid-treated human cells *in vitro* and in the rabbit tibia model *in vivo*. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012; 40(8):369-74.

Drusch S, Serfert Y, Heuvel AVD, Schwartz K. Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. *Food Res Int.* 2006; 39:807–15.

Duarte MCT. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multiciência: construindo a história dos produtos naturais.* 2006; 7.

Fang Z, Bhandari B. Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends Food Sci Technol.* 2010; 21:510–23.

Fatokun AA, Stone TW, Smith RA. Responses of differentiated MC3T3-E1 osteoblast-like cells to reactive oxygen species. *Eur J Pharmacol.* 2008; Jun10; 587(1-3):35-4.

Fernandes C, Leite RS, Lanças FM. Bisfosfonatos: síntese análises químicas e aplicações farmacológicas. *Quim Nova.* 2005; 28(2):274-80.

Fernandes LP, Turatti ICC, Lopes NP, Ferreira JC, Candido RC, Oliveira WP. Volatile retention and antifungal properties of *Lippia sidoides* essential oil. *Drying Technology.* 2008; 26:1534-42.

Filková I, Mujumdar AS. Industrial *spray drying* systems in handbook of industrial *drying*. AS Mujumdar Marcel Dekker Inc New York. 1995; 742.

Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Ver.* 1998; 19(1):80-100.

Forsgren J, Brohede U, Stromme M, Engqvist H: Co-loading of bisphosphonates and antibiotics to a biomimetic hydroxyapatite coating. *Biotechnol Lett.* 2011; 33:1265-68.

Gegler A, Cherubini K, Figueiredo MAS, Yurgel LS, Azambuja AA. Bisfosfonatos e osteonecrose maxilar: revisão da literatura e relato de dois casos. *Rev Bras Cancerol.* 2006; 52(1):25-31.

Giraudó E, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest.* 2004; 114:623.

Goubet I Le, Quere JL, Voilley A. Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and of their physical state. *J Agric Food Chem.* 1998; 48:1981–90.

Graner ROM, Gonçalves RB, Höfling JF, Furlan LM. Aspectos microbiológicos da placa dental Apostila 1 da disciplina: Pré-Clínica II (DP-201) área de microbiologia e imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp. Piracicaba, 2005. [Acesso em 2014 jan10]. Disponível em: <http://www.fop.unicamp.br/ddo/microbiologia/>.

Green JR. Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist.* 2004; 9 (supl 4):3-13.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol.* 2007; 53(3):335-43.

Guo HH, Ling WH, Wang Q. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L indica) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 2007; 62(1):1-6.

Harborne J B. Comparative biochemistry of the flavonoids – VI Flavonoid Patterns in the Bignoniaceae and the Gesneriaceae. *Phytochemistry.* 1967; 6:1643-51.

Harborne JB, Williams CA. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep.* 2001; 18:310–33.

Harris CS, Burt AJ, Saleem ALePM, Martineau LC, Haddad PS, Bennett SA, Arnason JTA. Single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf stem root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*. *Phytochem Anal.* 2007; 18(2):161-69.

Herbozo PJ, Briones DL, Ferres AJ, Torrealba RL. Severe spontaneous cases of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(8):1650-4.

Höfling JF, Anibal PC, Obando-Pereda GA, Peixoto IA, Furletti VF, Foglio MA, Gonçalves RB. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. *Braz J Biol.* 2010; 70(4):1065-8.

Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 1983; 43(4):1809–18.

Hortobagyi GN, Theriault RL, Porter L, Blayney D, Lipton A, Sinoff C, *et al.* Efficacy of pamidronate in reducing skeletal complications in patients with breast cancer and lytic metastasis. Protocol 19: Aredia Breast Cancer Study Group N. *Engl J Med.* 1996; 335:1785-91.

Hughes DE, MacDonald BR, Russell RGG, Gowen M. Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *J Clin Invest.* 1989; 83:1930-35.

ICH: International Conference on Harmonisation Guideline stability testing: photostability testing of new drug substances and products. Nov, 1996.

Inglett GE, Gelbman P, Reineccius GA. Encapsulation of orange oil Use of oligosaccharides from α -amilase modified starches of maize rice cassava and potato. Chapter 4 In: Rish SJ Reineccius GA Flavor Encapsulation ACS Symposium Series 370 American Chemical Society. 1988: 29-36p.

Jackson LS, Lee K. Microencapsulation and the food industry. *Lebenson Wiss Technol.* 1991; 24(4): 289-97.

Janovská Z. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a severe side effect of bisphosphonate therapy. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2012; 55(3):111-5.

Ji X, Pushalkar S, Li Y, Glickman R, Fleisher K, Saxena D. Antibiotic effects on bacterial profile in osteonecrosis of the jaw. *Oral Dis.* 2012; 18(1):85-95.

Jorge MP, Madjarof C, Ruiz ALTG, Fernandes AT, Rodrigues RAF, Souza IMO, Foglio MA, Carvalho JE. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. J Ethnopharmacol. 2008; 118:361-66.

Kalil Filho AN, Costa Kalil GP, Reis Luz AI. Conservação de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da Amazônia brasileira para uso humano. Ministério da Agricultura e do Abastecimento: Comunicado Técnico EMBRAPA. 2000; 50:1-4.

Kanis JA, Urwin GH, Gray RE, Beneton MN, McCloskey EV, Hamdy NA, *et al.* Effects of intravenous etidronate on skeletal and calcium metabolism, Am J Med. 1987; 82:55-70.

Kharazmi M, Hallberg P, Persson U, Warfvinge G. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the auditory canal. Br J Oral Maxillofac Surg. 2013; 51(8): e285-7.

Kimmel DB. Mechanism of action pharmacokinetic and pharmacodynamics profile and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. J Dent Res. 2007; 86:1022–33.

Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, Yatani H, Yoneda T. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket inhibits oral epithelial cell migration and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria without causing osteonecrosis of the jaw in mice. J Bone Miner Metab. 2010; 28(2):165-75.

Kodama HA, Amagai Y, Sudo H, Kasai S, Yamamoto S. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. Jpn J Oral Biol. 1981; 23(4):899-901.

Kong JM, Khang NK, Chia LS, Chia TF. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. Acta Pharmacol Sing. 2003; 24(1):7-21.

Kopleman SH, Augsburger LL. Selected physical and chemical properties of commercial *Hypericum perforatum* extracts relevant for formulated product quality and performance. *AAPS PharmSci*. 2001; 3(4):26.

Landesberg R, Woo V, Cremers S, Cozin M, Marolt D, Vunjak-Novakovic G, Kousteni S, Raghavan S. Potential pathophysiological mechanisms in osteonecrosis of the jaw. *Ann NY Acad Sci*. 2011; 1218:62–79.

Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Näpänkangas JP, Ylitalo KV, Mönkkönen J, Rogers MJ, Azhayev A, Väänänen HK, Hassinen IE. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable adenine containing metabolite. *Mol Pharmacol*. 2002; 62(5):1255-62.

Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15(2):64-81.

Li X, Liao J, Park SI, Koh AJ, Sadler WD, Pienta KJ, Rosol TJ, McCauley LK. Drugs which inhibit osteoclast function suppress tumor growth through calcium reduction in bone. *Bone*. 2011; 48(6):1354-61.1

Lim SD, Sun C, Lambeth JD, Marshall F, Amin M, Chung L, Petros JA, Arnold RS. Increased Nox1 and hydrogen peroxide in prostate cancer. *Prostate*. 2005; 62(2):200-7.

Lin DL, Tarnowski CP, Zhang J, Dai J, Rohn E, Patel AH, Morris MD, Keller ET. Bone metastatic LNCaP-derivative C4-2B prostate cancer cell line mineralizes *in vitro*. *Prostate*. 2001; 47(3):212–21.

Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone*. 1996; 18(2):75-85.

Macz-Pop GA, Rivas-Gonzalo JC, Pérez-Alonso JJ, González-Paramás AM. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L). Food Chem. 2006; 94(3):448.

Mafioleti L, da Silva Junior IF, Colodel EM, Flach A, Martins DT. Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb & Bonpl) B Verl. J Ethnopharmacol. 2013; 150(2):576-82.

Magalhães IR, Soares AO, Araújo LM, Castro CPR, Roland IA, Borrás MR. Determination of Cu Fe Mn and Zn in the leaves and tea of *Arrabidaea chica* (Humb & Bompl) Verl. Biol Trace Elem Res. 2009; 132(1-3):239-46.

Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. J Clin Periodontol. 2003; 30:644- 54.

Marcuzzi A, Zanin V, Crovella S, Pontillo A. Comments on "Geranylgeraniol e a new potential therapeutic approach to bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw" by Ziebart T *et al.* (2011). Oral Oncol. 2011; 47:436-7.

Markowitz JS, Zhu H. Limitations of in vitro assessments of the drug interaction potential of botanical supplements. Planta Med. 2012; 78:1421–7.

Martins MAT, Martins MD, Lascala CA, Curi MM, Migliorati CA, Tenis CA, Marques MM. Association of laser phototherapy with PRP improves healing of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in cancer patients: a preliminary study. Oral Oncol. 2012; 48:79-84.

Marx RE. Oral & Intravenous Bisphosphonates – induced osteonecrosis of the jaws. Quintessence Publishing Co Inc. 2007.

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/ osteopetrosis) of the jaws: risk factors recognition prevention and treatment. J Oral Maxillofac Sur. 2005; 63(11):1567-75.

Marx RE. Pamidronate (Aredia®) and zoledronate (Zometa®) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61:1115-8.

Mawardi H, Giro G, Kajiya M, Ohta K, Almazrooa S, Alshwaimi E, Woo SB, Nishimura I, Kawai TA. role of oral bacteria in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res.* 2011; 90(11):1339-45.

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

McLeod NM, Brennan PA, Ruggiero SL. Bisphosphonate osteonecrosis of the jaw: a historical and contemporary review. *Surgeon.* 2012; 10(1):36-42.

Medeiros BJL, Costa KD, Ribeiro JFA, Silva JOC, Barbosa WLR, Carvalho JCT. Liver protective activity of a hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb and Bonpl) B Verl (pariri). *Pharmacognosy Res.* 2011; 3(2):79-84.

Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis [letter]. *J Clin Oncol.* 2003; 21(22): 4253-54.

Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an American Academy of Oral Medicine position paper. *J Am Dent Assoc.* 2006; 136(12):1658-68.

Montaguea R, Harta CA, Georgea NJ, Ramanian VAC, Browna MD, Clark NW. Differential inhibition of invasion and proliferation by bisphosphonates: anti-metastatic potential of zoledronic acid in prostate cancer. *Eur Urol.* 2004; 46: 389–402.

Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol in Vitro.* 2006; 20(2):187-210.

Moriwaki C, Brescansin EG, Hioka N, Maionchi F, Matioli G. Estudo da degradação do fármaco Nabumetona por fotólise direta. *Acta Sciv.* 2001; 23(3):651-4.

Müller WE, Wang X, Guo YW, Schröder HC. Potentiation of the cytotoxic activity of copper by polyphosphate on biofilm-producing bacteria: a bioinspired approach. *Mar Drugs.* 2012; 10(11):2369-87.

Munin A, Edwards-Lévy F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds: a review. *Pharmaceutics.* 2011

Murshed M, Harmey D, Millán JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev.* 2005; 19:1093–1104.

Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of bisphosphonates on osteoblasts *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106(1):5-13.

NCI - National Cancer Institute at the National Institutes of Health. [Acesso em 2014 jan 18]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/prevention/antioxidants>.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 2012; 75:311-35.

Nicoletti P, Cartsos VM, Palaska PK, Shen Y, Floratos A, Zavras AI. Genomewide pharmacogenetics of bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: the role of RBMS3. *Oncologist.* 2012; 17(2):279-87.

Ohnuki H, Izumi K, Terada M, Saito T, Kato H, Suzuki A, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Takagi R, Maeda T. Zoledronic acid induces S-phase arrest via a DNA damage response in normal human oral keratinocytes. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(7):906-17.

Oliveira OW, Petrovick PR. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. Rev Bras de Farmacogn. 2010; 20(4):641-50.

Oliveira PA. Estudo da estabilidade e estabilização das antocianinas do bagaço de uva seibel 2. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas Campinas, 2001.

Otto S, Schreyer C, Hafner S, Mast G, Ehrenfeld M, Stürzenbaum S, Pautke C. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. J Craniomaxillofac Surg. 2012 Jun;40(4):303-9.

Pabst AM, Ziebart T, Koch FP, Taylor KY, Al-Nawas B, Walter C. The influence of bisphosphonates on viability migration and apoptosis of human oral keratinocytes — *in vitro* study. Clin Oral Invest. 2012; 16:87–93.

Pan B To LB, Farrugia AN, Findlay DM, Green J, Gronthos S, Evdokiou A, Lynch K, Atkins GJ, Zannettino AC. The nitrogen-containing bisphosphonate zoledronic acid increases mineralisation of human bone-derived cells *in vitro*. Bone. 2004; 34(1):112-23.

Patntirapong S, Singhatanadgit W, Chanruangvanit C, Lavanrattanukul K, Satravaha Y. Zoledronic acid suppresses mineralization through direct cytotoxicity and osteoblast differentiation inhibition. J Oral Pathol Med. 2012; 41(9):713-20.

Pauletti PM, Castro-Gamboa I, Silva DHS, Young MCM, Tomazela DM, Eberlin MN, Bolzani VS. New antioxidant C-glucosylxanthenes from stems of *Arrabidaea samydoidea*. J Nat Prod. 2003; 66:1384-87.

Pierucci AP, Andrade LR, Farina M, Pedrosa C, Rocha-Lehao MHM. Comparison of a-tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. J Microencapsul. 2007; 24(3):201-13.

Pimentel ER. Matriz Extracelular. In: A Célula. 1ª edição. Editora Manole Brasil. 2001; 217-34p.

Pires FR, Miranda A, Cardoso ES, Cardoso AS, Fregnani ER, Pereira CM, Correa ME, Almeida JP, Alves FA, Lopes MA, de Almeida OP. Oral avascular bone necrosis associated with chemotherapy and biphosphonate therapy. Oral Dis. 2005; 11(6):365-9.

Ponte Fernández N, Estefania FR, Aguirre UJM. Bisphosphonates and oral pathology I: general and preventive aspects. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006; 11(5):396-400.

Radosta S, Schierbaum F, Reuther F, Ager H. Polymer-water interaction of maltodextrins. Part I: Water vapour sorption and desorption of maltodextrin powders. Starch/Stärke. 1989; 41:395.

Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Sharon Stack M. Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. Arch Oral Biol. 2010; 56:491-8.

Ré M. I Microencapsulation by *spray drying*. *Drying Technology*. 1998; 16(6):1195-1236.

Ré MI. Microencapsulação: em busca de produtos “inteligentes”. *Ciência Hoje*. 2000; 27(162):24-9.

Reineccius GA. Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technology*. 1991; 144-6p.

Reska AA. Mecanismos de acción e los bisfosfonatos. In: MORAL J A R MACÍAS JG. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Madrid: Jarpyo. 2004; 175-81p.

Reszka AA, Halasy-Nagy JM, Masarachia PJ, Rodan GA. Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. *J Biol Chem.* 1999; 274:34967-73.

Rigaud J, Tiguert RLe, Normand L, Karam G, Glemain ,P Buzelin JM, Bouchot O. Prognostic value of bone scan in patients with metastatic prostate cancer treated initially with androgen deprivation therapy. *J Urol.* 2002; 168:1423–6.

Risch SJ, Reineccius GA. Flavor Encapsulation ACS Symposium Series 370. American Chemical Society Washington DC-USA. 1998; 1-6p.

Rivas-Gonzalo JC. Analysis of anthocyanins. Methods in polyphenol analysis. Santos-Buelga C and Williamson G (eds). The Royal Society of Chemistry: Cambridge. 2003; 338–58p.

Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. Farmacognosia farmacobiotechnologia. Baltimore: Willians & Wilkins. 1997; 41-54p.

Rodan GA. Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998; 38:375-88.

Rodrigues RAF. Preparo caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por *spray drying* contendo extrato de café crioconcentrado. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, 2004.

Rosenberg M, Talmon Y, Kopleman IJ. The microstructure of *spray-dried* microcapsules. *Food Microstructure.* 1998; 7(1):15-23.

Ruggiero SI, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62(5):527-34.

Ruggiero SL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an overview. Ann NY Acad Sci. 2011; 1218:38-46.

Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws-2009 update. J Oral Maxillofac Surg. 2009; 67(supl 5):2-12.

Russell RGG. Bisphosphonates: from bench to bedside. Ann NY Acad Sci. 2006; 1068:367-401.

Russell RG, Croucher PI, Rogers MJ. Bisphosphonates: pharmacology mechanisms of action and clinical uses. Osteoporos Int. 1999; 9(supl 2):S66-80.

Ryzen E, Martodan R, Troxell M, Benson A, Paterson A, Shepard K, *et al.* Intravenous etidronate in the management of malignant hypercalcaemia. Arch Intern Med. 1985; 145:449-52.

Sadeghi A, Shahidi F, Mortazavi SA, Mahalati MN. Evaluation of different parameters effect on maltodextrin production by – amylase Termamyl 2-x. World Appl Sci J. 2008; 3(1):34–9.

Salib N. A review of microencapsulation. Pharmaceutical Industry. 1997; 39(5):506-12.

Sankarikutty B, Sreekumar MM, Narayana CS, Mathew AG. Studies on microencapsulation of cardamon oil by *spray drying* technique. Food Sci Technol. 1988; 25(6):352-3.

Sansone F, Mencherini T, Picerno P, d'Amore M, Aquino RP, Lauro MR. Maltodextrin/pectin microparticles by *spray drying* as carrier for nutraceutical extracts. J Food Eng. 2011; 105:468–76.

Santos LCS, Cavalcante WC, Júnior BC, Moura RQ. Osteonecrose dos maxilares por uso de bisfosfonatos. *Ver Fac Odontol Univ Fed Bahia*. 2010; 40(2):69-73.

São Paulo 2013. Alerta terapêutico em farmacovigilância 02/2013 - Uso de bisfosfonatos associado ao risco de osteonecrose de mandíbula. Núcleo de Farmacovigilância do Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo - Setembro de 2013.

Sarasquete ME, García-Sanz R, Marín L, Alcoceba M, Chillón MC, Balanzategui A, Santamaria C, Rosiñol L, de la Rubia J, Hernandez MT, Garcia-Navarro I, Lahuerta JJ, González M, San Miguel JF. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw is associated with polymorphisms of the cytochrome P450 CYP2C8 in multiple myeloma: a genome-wide single nucleotide polymorphism analysis. *Blood*. 2008; 112(7):2709-12.

Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol*. 2009; 144(5):667-76.

Scheper MA, Badros A, Salama AR, Warburton G, Cullen KJ, Weikel DS, Meiller TF. A novel bioassay model to determine clinically significant bisphosphonate levels. *Support Care Cancer*. 2009; 17(12):1553-7.

Scheper MA, Chaisuparat R, Cullen K, Meiller T. A novel soft-tissue *in vitro* model for bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2010; 1:3-6.

Schindeler A, Little DG. Osteoclasts but not osteoblasts are affected by a calcified surface treated with zoledronic acid *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 338:710–6.

Schmid I, Uittenbogaart CH, Giorgi JV. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry*. 1994; 15:12-20.

Scogin R. Anthocyanins of the Bignoniaceae biochemical and systematics ecology. 1980; 8:273-6.

Sedghizadeh PP, Stanley K, Caligiuri M, Hofkes S, Lowry B, Shuler CF. Oral bisphosphonate use and the prevalence of osteonecrosis of the jaw: an institutional inquiry. *J Am Dent Assoc*. 2009; 140(1):61-6.

Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston K. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2000; 82:1459-68.

Shahidi F, Han X. Encapsulation of food ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1993; 33(6):501-47.

Shannon J, Shannon J, Modelevsky S, Grippo AA. Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw. *JAGS*. 2011.

Silva KER, Alves LDS, Soares MFR, Passos RCS, Faria AR, Rolim Neto PJ. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2009; 30(2):129-35.

Simon MJ, Niehoff P, Kimmig B, Wiltfang J, Açil Y. Expression profile and synthesis of different collagen types I II III and V of human gingival fibroblasts osteoblasts and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clin Oral Investig*. 2010; 14(1):51-8.

Siraichi JT, Felipe DF, Brambilla LZ, Gatto MJ, Terra VA, Cecchini AL, Cortez LE, Rodrigues-Filho E, Cortez DA. Antioxidant capacity of the leaf extract obtained from *Arrabidaea chica* cultivated in Southern Brazil. *PLoS One*. 2013a; 8(8):e72733.

Siraichi JT, Pedrochi F, Natali MR, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Bento AC, Baesso ML, Nakamura CV. Ultraviolet (UVB and UVA) photoprotector activity and

percutaneous penetration of extracts obtained from *Arrabidaea chica*. Appl Spectrosc. 2013b; 67(10):1179-84.

Skerjanec A, Berenson J, Hsu C, Major P, Miller WH, Jr Ravera C, Schran H, Seaman J, Waldmeier F. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with varying degrees of renal function. J Clin Pharmacol. 2003; 43:154–62.

Sociedade Brasileira de Cardiologia - I Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia. Arq Bras Cardiol. São Paulo, 2011; 96(2) supl1.

Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman MA, Anderson KC. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. Oral Oncol. 2009; 45(2):164-72.

Sparks RE. Microencapsulation In: KIRK-OTHMER Encyclopedia of Chemical Technology. 3rd ed John Wiley & Sons New York. 1981;15:470p.

Suave J, Dall'agnol EC, Pezzin APT, Silva DAK, Meier MM, Soldi V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. Health and Environment Journal. 2006; 7(2).

Suri S, Mönkkönen J, Taskinen M, Pesonen J, Blank MA, Phipps RJ, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates induce apoptosis of Caco-2 cells *in vitro* by inhibiting the mevalonate pathway: a model of bisphosphonate-induced gastrointestinal toxicity. Bone. 2001; 29(4):336–43.

Takemura O S, Iinuma M, Tosa H, Miguel OG, Moreira E A, Nozawa Y A. Flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f *cúprea*. Phytochemistry. 1995; 38(5):1299-1300.

Ten Cate AR. The fibroblast and its products In: Oral Histology Development structure and function. In: Toronto: CV Mosby. 1989; cap 6: 90-105p.

Tenenbaum HC, Shelemay A, Girard B, Zohar R, Fritz PC. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnosis uses. *J Periodontol.* 2002; 73(7):813-22.

Thevenet F. Acacia gums natural encapsulation agent for food ingredients In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients.* 1995; 51-9p.

Thumbigere-Math V, Tu L, Huckabay S, Dudek AZ, Lunos S, Basi DL, Hughes PJ, Leach JW, Swenson KK, Gopalakrishnan R. A retrospective study evaluating frequency and risk factors of osteonecrosis of the jaw in 576 cancer patients receiving intravenous bisphosphonates. *Am J Clin Oncol.* 2012; 35(4):386-92.

Tsuda T, Ueno Y, Yoshikawa T, Kojo H, Osawa T. Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. *Biochem Pharmacol.* 2006; 71(8):1184-97.

Twiss IM, de Water R, den Hartigh J, Sparidans R, Ramp-Koopmanschap W, Brill H, Wijdeveld M, Vermeij P. Cytotoxic effects of pamidronate on monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells and its epithelial transport. *J Pharm Sci.* 1994; 83(5):699–703.

Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Tancheva S. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin induced diabetic rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2007; 29(2):101-5.

Vasconcellos DV, Duarte MEL, Maia RC. Efeito anti-tumoral dos bisfosfonatos: uma nova perspectiva terapêutica. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2004; 50(1):45-54.

Veiga Junior VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas Mediciniais: cura segura? *Quim Nova.* 2005; 28(3).

Volp ACP, Renhe IRT, Barra K, Stringueta PC. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. Rev Bras Nutr Clin. 2008; 23(2):141-9.

Von Poser LG, Schripsema J, Henriques AT, Rosendal Jensen S. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. Biochem Syst Ecol. 2000; 28(4):351-66.

Wang W, Zhou W. Effect of maltodextrins on water adsorption and glass transition of *spray dried* soy sauce powders. The International Congress on Engineering and Food (ICEF), 2011, May 22-26. [Acesso em 2013 nov19]. Disponível em: <http://www.icef11.org/content/papers/fms/FMS848pdf>.

Wei X, Pushalkar S, Estilo C, Wong C, Farooki A, Fournier M, Bohle G, Huryn J, Li Y, Doty S, Saxena D. Molecular profiling of oral microbiota in jawbone samples of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Oral Dis. 2012; 18(6):602-12.

Wells George A, Cranney A, Peterson J, Boucher M, Shea B, Welch V, *et al*. Alendronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. Cochrane Database of Systematic Reviews [acesso online]. 2008 [consultado 14 Março de 2014]. Disponível em: <http://www.mrw.interscience.wiley.com/cochrane/clsysrev/articles/CD001155/frame.html>

Wen Y, Zhang M, Zhao Q, Feng Y. Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. J Agric Food Chem. 2005; 53(22):8468–73.

Wendel S, Çelik M. Uma visão geral sobre o uso da tecnologia de *Spray-Drying*. Pharmaceutical Technol. 1998; 31-45.

Wickham N, Crawford A, Carney AS, Goss AN. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the external auditory canal. J Laryngol Otol. 2013; 127; (supl 2):S51-3.

Wiegand CU, Hipler C. Evaluation of biocompatibility and cytotoxicity using keratinocyte and fibroblast cultures skin. *Pharmacol Physiol*. 2009; 22:74–82.

Williams CA, Grayer RJ. *Nat Pro Rep*. 2004; 21(4):539-73.

Wu HC, Hsieh JT, Gleave ME, Brown NM, Pathak S, Chung LW. Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *Int J Cancer*. 1994; 57(3):406–12.

Yamazaki T, Yamori M, Ishizaki T, Asai K, Goto K, Takahashi K, Nakayama T, Bessho K. Increased incidence of osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in patients treated with bisphosphonates: a cohort study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012; 41(11):1397-1403.

Yang L, You S, Kumar V, Zhang C, Cao Y. *In vitro* the behaviors of metastasis with suppression of VEGF in human bone metastatic LNCaP-derivative C4-2B prostate cancer cell line. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012; 1:31-40.

Yang X, Liu J, He H, Zhou L, Gong C, Wang X, Yang L, Yuan J, Huang H, He L, Zhang B, Zhuang Z. SiO₂ nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. *Part Fibre Toxicol*. 2010; 19:7-1.

Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res*. 2007; 51(6):675-83.

Zhang L, Mou D, Du Y. Procyanidins: Extraction and micro-encapsulation. *J Sci Food Agric*. 2007; 87:2192–7.

Ziebart T, Koch F, Klein MO, Guth J, Adler J, Pabst A, *et al.*: Geranylgeraniol a new potential therapeutic approach to bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. *Oral Oncol*. 2011; 47:195-201.

Zorn B, Garcia-Piñeres AJ, Castro V, Murillo R, Mora G, Merfort I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry*. 2001; 56:831–5.

Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 2004;19:124-28.

APÊNDICE 1

Análises fitoquímicas do extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica*

- **Isolamento do padrão carajurina**

O padrão carajurina foi isolado pela doutoranda Ilza Maria de Oliveira Sousa, a partir do extrato bruto de *A. chica* através da cromatografia em coluna aberta. O adsorvente utilizado foi a metil celulose cristalina (Merck), e os eluentes foram hexano, diclorometano, metanol e metanol acidificado com 0,02% de ácido trifluoroacético.

O monitoramento das frações coletadas foi feito através de cromatografia em camada delgada (CCD). Utilizou-se cromatofolha de alumínio, sílica gel 60 F₂₄₅ (Merck) e a fase móvel para eluição foi butanol:água:ácido acético na proporção 4:5:1.

- **Limpeza das amostras por extração em fase sólida para análise das antocianinas**

As amostras do extrato bruto de *A. chica* foram pesadas (10,0±0,5 mg) em balança analítica (METTLER AB204) e submetidas ao processo de limpeza em cartucho C18 e, a seguir, avaliadas por CLAE-DAD. Em um cartucho C-18 marca STRATA Phenomenex de capacidade de 100 mg/3 mL acoplado em um Manifold (J.T.BAKER) sob vácuo, condicionado com 6 mL de solução ácida de H₃PO₄ pH 2,0 descartando essa fração. Em seguida dissolveu-se 10 mg do extrato bruto livre em 2 mL de MeOH grau CLAE que foi eluído no cartucho, lavando com aproximadamente 6 mL de MeOH grau CLAE marca JTBAKER. A amostra foi diretamente coletada em balão volumétrico de 10,00 mL completou-se o volume com a mesma fase móvel utilizada na eluição do cartucho. Posteriormente, filtrou-se a solução resultante em filtro de 0,45 µm (Millepore) e armazenou-se em frasco âmbar para análise por CLAE-DAD.

- **Extração das antocianidinas das amostras microencapsuladas.**

As amostras microencapsuladas de *A. chica* foram pesadas em triplicata em balão volumétrico de 10,0mL em balança analítica (METTLER AB204) (100,0 mg ± 0,9). Após adição de 2 mL de H₂O o balão foi deixado em aparelho de ultrassom por 3 minutos. A seguir o volume foi completado para 10 mL com metanol e transferido para um tubo falcom de 50 mL, para precipitação da matriz polimérica. Após centrifugação da amostra a 3000 rpm (5 °C), foram retirados 5,0 mL do sobrenadante para realização do processo de limpeza em cartucho C18. A seguir o material resultante foi analisado por CLAE-DAD.

- **Preparo da fase móvel**

Metanol grau CLAE foi filtrado, sob vácuo e sonificação, em sistema Millepore usando membrana PVDF de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro. Esse filtrado, denominado de Fase móvel B, foi acidificado por solução aquosa de H₃PO₄ até atingir o pH 2,0 ± 0,1 Essa solução foi denominada de fase móvel A.

- **Pesos, tempos de exposição e datas da retirada das amostras EB (extrato bruto livre) e EBM (extrato bruto microencapsulado em mistura de goma arábica com maltoextrina 1:1) incubadas em câmara climática.**

Data retirada para análise	Massa de amostra EB(g)	Massa de amostra EBM(g)	Tempo de exposição(dias)
15/08/2011	5	5	0
30/08/2011	5	5	15
19/09/2011	5	5	30
14/10/2011	5	5	60
16/11/2011	5	5	90
13/12/2011	5	5	120
13/02/2012	5	5	180

- **Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

As amostras foram dissolvidas em solvente apropriado, grau cromatográfico, e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos (DAD). As condições para análise foram otimizadas a partir de metodologia sugerida por Wen *et al* (2005).

- **Condições cromatográficas**

As análises foram realizadas por CLAE (Shimadzu) acoplada a detector de UV com arranjo de diodos (Shimadzu). As condições cromatográficas e gradiente fase móvel utilizadas estão descritas nos quadros (A e B).

Quadro A: Programa de gradiente fase móvel para análises por CLAE-DAD.

Tempo (min)	Solvente H ₂ O +H ₃ PO ₄ pH 2,0±0,10 (%A)	Solvente Metanol (%B)
0 - 5,0	55	45
5 - 20	10	90
20 - 30	0	100
30 - 45	55	45

Quadro B: Condições cromatográficas utilizadas para análise das antocianidinas presentes no extrato de *A. chica*.

Equipamentos e acessórios	Especificação
Bomba Shimadzu	LC 10atm
Coluna	- C18 Gemine- Phenomenex 5 μ m 110A° - (250mm x 4,6 mm x 5 μ m)
Volume de injeção	20 μ L
Vazão de fluxo	1 mL/min
Detector Shimadzu M10AVP	UV-DAD
Fase móvel	Gradiente: H ₂ O/ Metanol
Comprimento de onda	λ =470nm
Forno CTO-10ASVP	35°C
Software	Class VP -5
Tempo de retenção	Pig1= 7,0 7,5; pig 2= 10,0-10,8min; pig 3= 17,0-17,9 min
Injetor automático	Injetor automático sil-20AT HT

- Cromatogramas obtidos após análise por CLAE-DAD do extrato bruto de *A. chica* microencapsulado em goma arábica com maltodextrina (1:1)

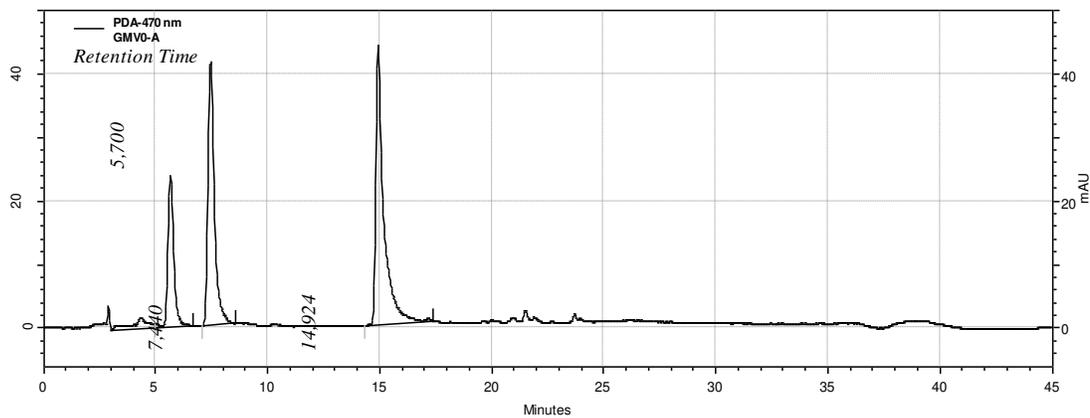


Figura A: Cromatograma do extrato bruto de *A. chica* microencapsulado com goma arábica/ maltodextrina (1:1).

T=0, cromatógrafo Shimadzu, coluna C18 Gemini, $\lambda=470\text{nm}$, fluxo 1mL/min, forno 35°C e Software Class VP -5, (TR=5,7) (6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavílio) (TR=7,4 min) (6,7-tri-hidroxi-5-metoxiflavílio) e carajurina (TR=14,9min) (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio).

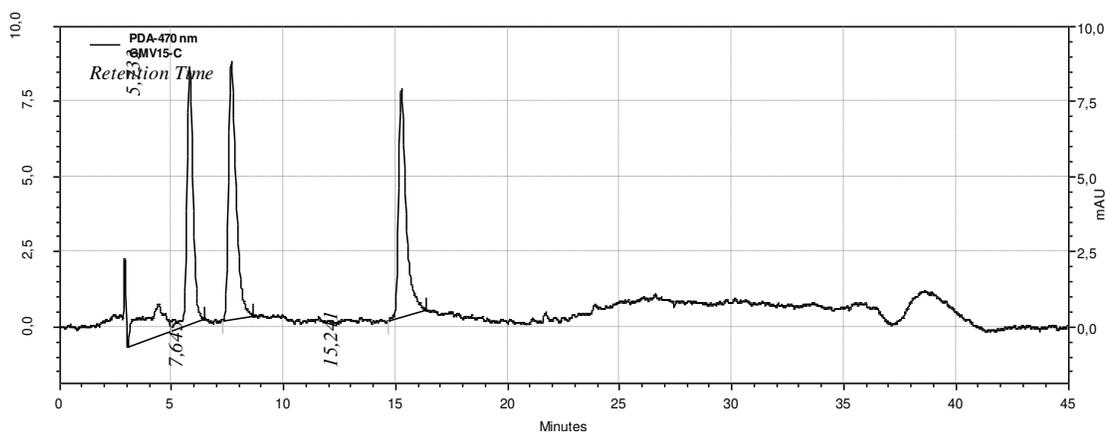


Figura B: Cromatograma do extrato bruto de *A. chica* microencapsulado com goma arábica/ maltodextrina (1:1).

T=15 dias, cromatógrafo Shimadzu, coluna C18 Gemini, $\lambda=470\text{nm}$, fluxo 1 mL/min, forno 35°C e Software Class VP -5, (TR=5,7) (6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavílio) (TR=7,6 min) (6,7-tri-hidroxi-5-metoxiflavílio) e carajurina (TR=15,2 min) (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio).

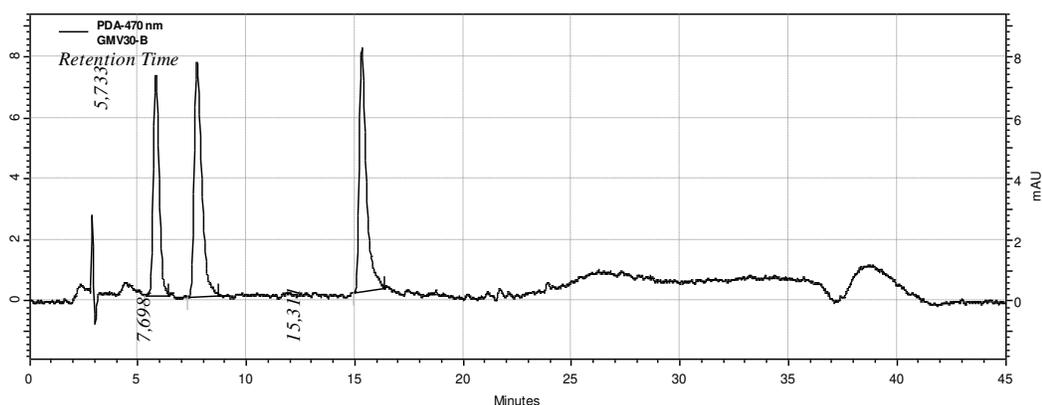


Figura C: Cromatograma do extrato bruto de *A.chica* microencapsulado com goma arábica/ maltodextrina (1:1).

T=30dias, cromatógrafo Shimadzu, coluna C18 Gemini, $\lambda=470\text{nm}$, fluxo 1 mL/min, forno 35°C e Software Class VP -5, (TR=5,7) (6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavilio) (TR=7,7 min) (6,7-tri-hidroxi-5-metoxiflavilio) e carajurina (TR=15,3 min) (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio).

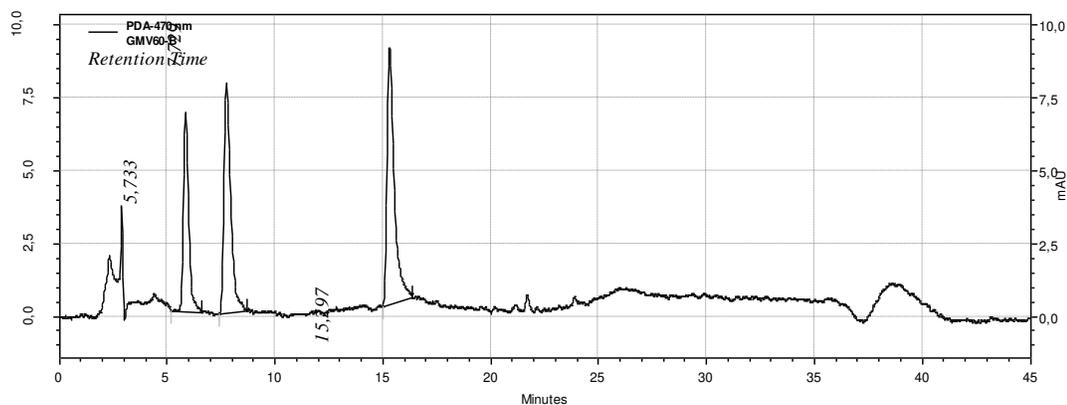


Figura D: Cromatograma do extrato bruto de *A. chica* microencapsulado com goma arábica/ maltodextrina (1:1).

T=60dias, cromatógrafo Shimadzu, coluna C18 Gemini, $\lambda=470\text{nm}$, fluxo 1 mL/min, forno 35°C e Software Class VP -5, (TR=5,7) (6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavilio) (TR=7,7 min) (6,7-tri-hidroxi-5-metoxiflavilio) e carajurina (TR=15,3 min) (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio).

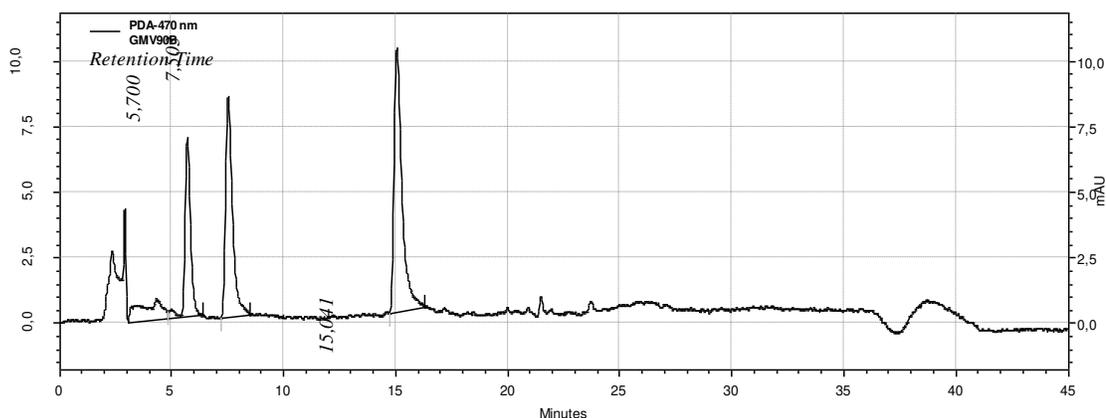


Figura E: Cromatograma do extrato bruto de *A.chica* microencapsulado com goma arábica/ maltodextrina (1:1).

T=90dias, cromatógrafo Shimadzu, coluna C18 Gemini, $\lambda=470\text{nm}$, fluxo 1 mL/min, forno 35 °C e Software Class VP -5, (TR=5,7) (6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavílio) (TR=7,5 min) (6,7-tri-hidroxi-5-metoxiflavílio) e carajurina (TR=15,0 min) (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio).

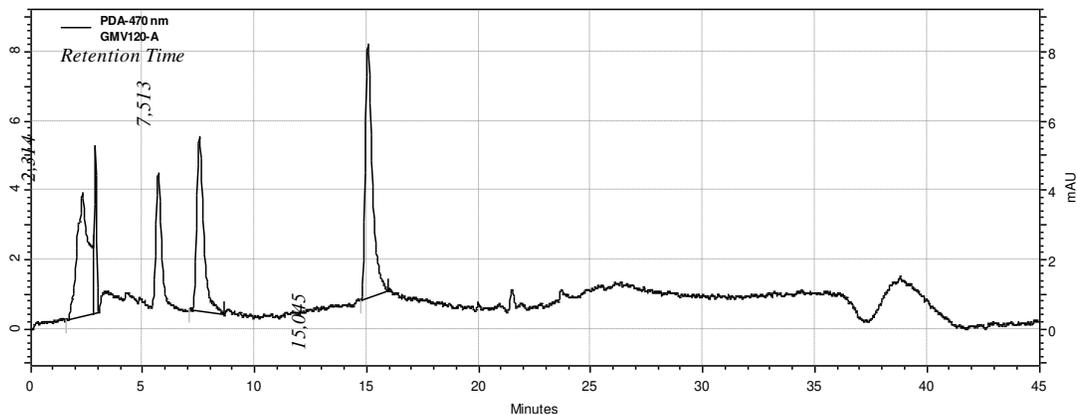


Figura F: Cromatograma do extrato bruto de *A. chica* microencapsulado com goma arábica/ maltodextrina (1:1).

T=120dias, cromatógrafo Shimadzu, coluna C18 Gemini, $\lambda=470\text{nm}$, fluxo 1 mL/min, forno 35 °C e Software Class VP -5, (TR=5,7) (6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavílio) (TR=7,7 min) (6,7-tri-hidroxi-5-metoxiflavílio) e carajurina (TR=15,0 min) (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio).

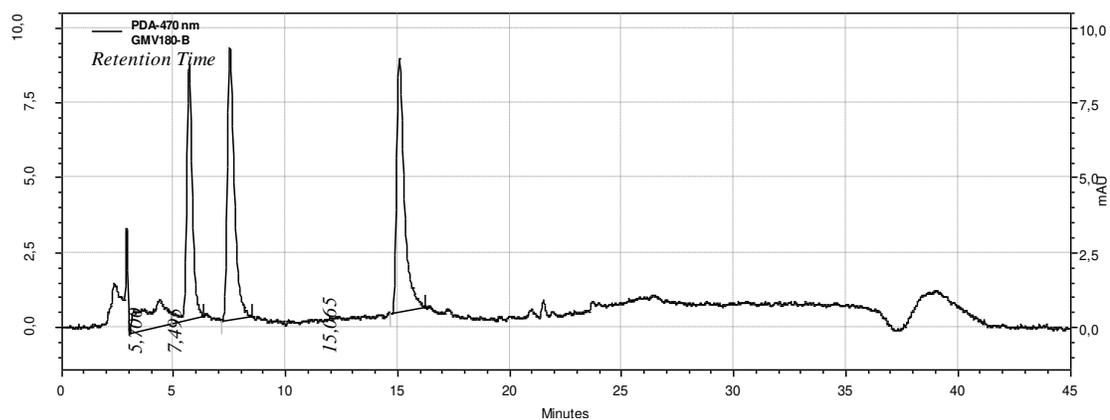


Figura G: Cromatograma do extrato bruto de *A. chica* microencapsulado com goma arábica/ maltodextrina (1:1).

T=180dias, cromatógrafo Shimadzu, coluna C18 Gemini, $\lambda=470\text{nm}$, fluxo 1 mL/min, forno 35 °C e Software Class VP -5, (TR=5,5) (6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavilio) (TR=7,8 min) (6,7-tri-hidroxi-5-metoxiflavilio) e carajurina (TR=15,0 min) (6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio).

APÊNDICE 2

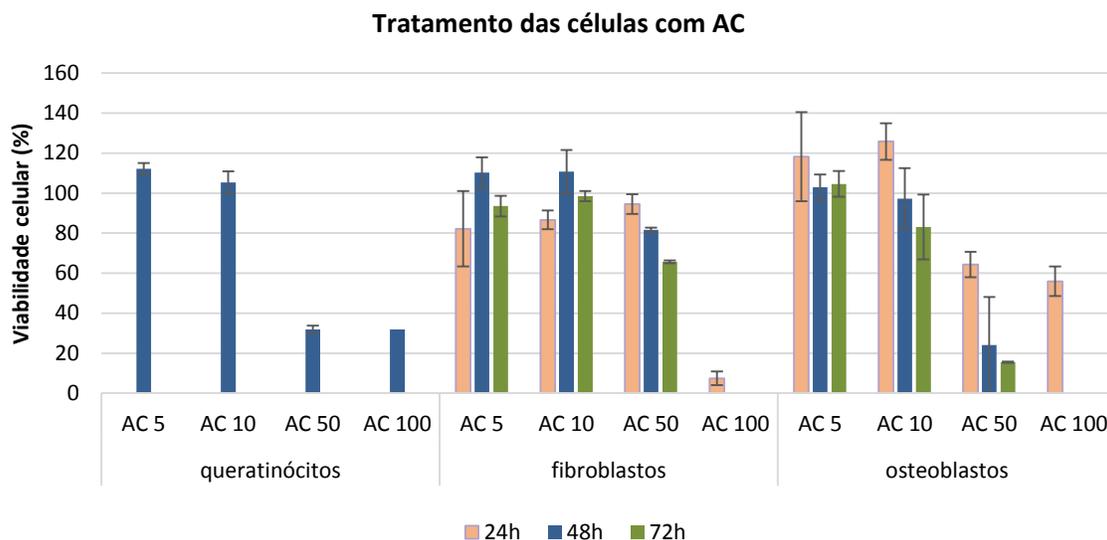


Figura A – Viabilidade (%) de queratinócitos, fibroblastos e osteoblastos submetidos ao tratamento com diferentes concentrações do extrato de *A. chica* (AC; µg mL⁻¹) durante 24, 48 e 72 h*.

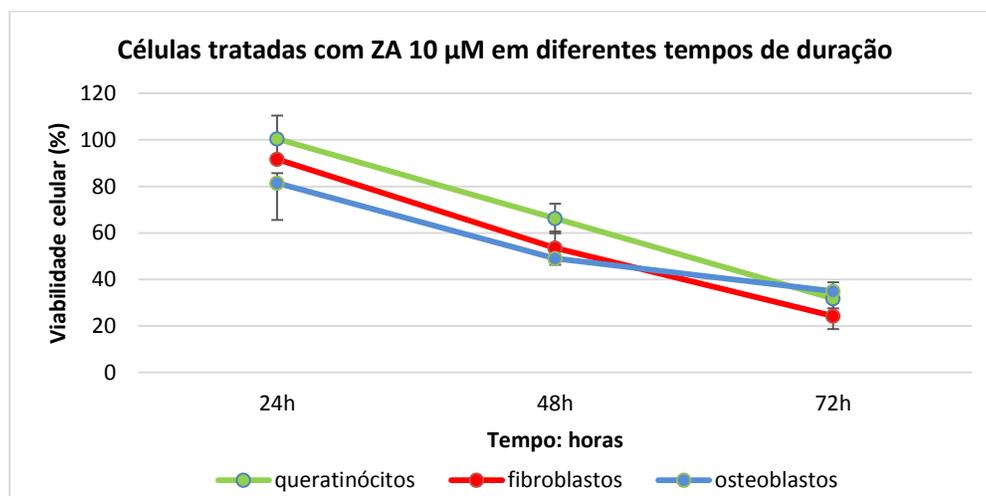


Figura B – Viabilidade (%) das células epiteliais e osteoblastos submetidos ao tratamento com ácido zoledrônico (ZA) 10 µM durante 24, 48 e 72 h*.

*Tempos de exposição: 24, 48 e 72 h; linhagens: HaCaT (queratinócito humano imortalizado); PT64-04HF (fibroblasto gengival humano primário) e MC3T3-E1 (pré-osteoblasto de rato); condições de cultivo

respectivamente: DMEM 5% SFB; DMEM 5% SFB e Alpha-MEM 5% SFB; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂. Método de avaliação por absorbância utilizando-se a sulforrodamina B (queratinócitos) ou cristal de violeta (fibroblastos e osteoblastos).

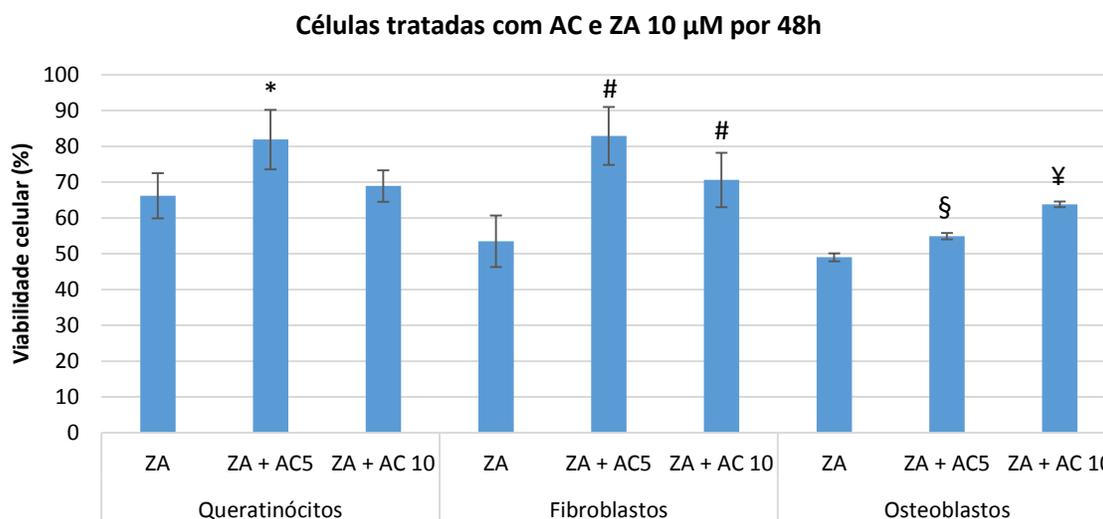


Figura C – Viabilidade (%) das células após 48 h do co-tratamento ácido zoledrônico 10 µM e extrato de *A. chica* 5 e 10 µg mL⁻¹.

*,#,§,¥ símbolos diferentes representam diferença estatística ANOVA p<0,05; tempo de exposição: 48 h; linhagens: HaCaT (queratinócito humano imortalizado); PT64-04HF (fibroblasto gengival humano primário) e MC3T3-E1 (pré-osteoblasto de rato); condições de cultivo respectivamente: DMEM 5% SFB; DMEM 5% SFB e Alpha-MEM 5% SFB; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂. Método de avaliação por absorbância utilizando-se a sulforrodamina B (queratinócitos) ou cristal de violeta (fibroblastos e osteoblastos).

APÊNDICE 3

Experimentos envolvendo bactéria *Streptococcus mutans*

Tabela A – Densidade óptica obtida após 48 h de tratamento de *S. mutans* com DMSO.

	Concentrações					
Tratamento	0	0,1x10 ⁻⁵ %	1x10 ⁻⁵ %	5x10 ⁻⁵ %	10x10 ⁻⁵ %	100x10 ⁻⁵ %
DMSO	0,416	0,406	0,411	0,423	0,419	0,424

Resultados de leitura de densidade óptica (Thermo Fisher® Scientific BIOMATE 3) expressos como média; o desvio padrão foi igual ou inferior a 0,001 para todos os grupos; tratamento com diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO); tempo de exposição: 48 h; bactéria *Streptococcus mutans*; condições de cultivo: BHI; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂.

Tabela B – Densidade óptica obtida após 48 h de tratamento de *S. mutans* com extrato de *A. chica*.

	Concentrações					
Tratamento	0	0,1 µg mL ⁻¹	1 µg mL ⁻¹	5 µg mL ⁻¹	10 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹
AC	0,416	0,409	0,405	0,416	0,411	0,409

Resultados de leitura de densidade óptica (Thermo Fisher® Scientific BIOMATE 3) expressos como média; o desvio padrão foi igual ou inferior a 0,001 para todos os grupos; tratamento com diferentes concentrações do extrato de *A. chica* (AC); tempo de exposição: 48 h; bactéria *Streptococcus mutans*; condições de cultivo: BHI; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂.

Tabela C – Densidade óptica média obtida após 24 h e 48 h de tratamento de *S. mutans* com diferentes concentrações de ácido zoledrônico.

Tempo	0	1 µM	5 µM	10 µM	50 µM	100 µM
24h*	0,428	0,365	0,446	0,451	0,504	0,532
48h	0,418 (±0,01)	0,429 (±0,00)	0,432 (±0,01)	0,443 (±0,02)	0,533 (±0,01)	0,590 (±0,02)

*símbolo representa valores de desvio padrão iguais ou inferiores a 0,001. Resultados de leitura de densidade óptica (Thermo Fisher® Scientific BIOMATE 3) expressos como média ± desvio padrão; tratamento com diferentes concentrações de ácido zoledrônico (ZA); tempo de exposição: 48 h; bactéria *Streptococcus mutans*; condições de cultivo: BHI; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂.

Tabela D – Densidade óptica obtida após 48 h de co-tratamento de *S. mutans* com extrato de *A. chica* 5 µg mL⁻¹ ou 10 µg mL⁻¹ e diferentes concentrações de ácido zoledrônico.

Tratamento	ZA 1µM	ZA 5µM	ZA 10µM	ZA 50µM	ZA 100µM
AC 5 µg mL⁻¹	0,406	0,420	0,426	0,531	0,591
AC 10 µg mL⁻¹	0,421	0,415	0,433	0,515	0,579

Resultados de leitura de densidade óptica (Thermo Fisher® Scientific BIOMATE 3) expressos como média; o desvio padrão foi igual ou inferior a 0,001 para todos os grupos; co-tratamento com diferentes concentrações de ácido zoledrônico (ZA) e extrato de *A. chica* (AC) 5 ou 10 µg mL⁻¹; tempo de exposição: 48 h; bactéria *Streptococcus mutans*; condições de cultivo: BHI; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO₂.

Tabela E – Densidade óptica de *S. mutans* obtida após diferentes condições de troca de tratamento ou não, com as concentrações de ácido zoledrônico (ZA) 5, 10 e 100 μM .

Sem troca do meio			Troca do meio para meio (M)			Troca do meio para ZA	
	6h	12h		12h		12h	
Controle	0,391	0,383		Controle - M	0,668	Controle – ZA 5 μM	0,693
ZA 5 μM	0,395	0,385		ZA 5 μM - M	0,655	Controle – ZA 10 μM	0,704
ZA 10 μM	0,417	0,390		ZA 10 μM - M	0,685	Controle – ZA 100 μM	0,804
ZA 100 μM	0,432	0,534		ZA 100 μM - M	0,688	ZA 5 μM – ZA 5 μM	0,701
						ZA 10 μM – ZA 10 μM	0,698
						ZA 100 μM – ZA 100 μM	0,814

Resultados de leitura de densidade óptica (Thermo Fisher® Scientific BIOMATE 3) expressos como média; o desvio padrão foi igual ou inferior a 0,001 para todos os grupos; tempo final de tratamento de 12 h; durante o tempo de 6 h houve troca do meio de cultura ou não; bactérias sem tratamento (controle); adição de meio de cultura sem tratamento (M); tratamento com ácido zoledrônico nas concentrações de 5 μM (ZA 5), 10 μM (ZA 10) e 100 μM (ZA 100); bactéria *Streptococcus mutans*; condições de cultivo: BHI; 37 °C, atmosfera úmida, 5% de CO_2 .

ANEXOS

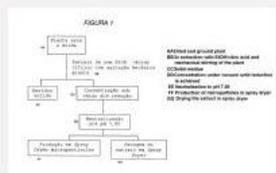
O obtenção do pedido de patente relacionada ao trabalho desenvolvido pelo grupo em formulações do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot:

- (WO2013091056) “PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING *ARRABIDAEA CHICA* EXTRACT IN CONTROLLED RELEASE SYSTEMS, PRODUCTION PROCESS AND USE THEREOF”.

Número de publicação	WO2013091056 A1
Tipo de publicação	Candidatura
Número de candidatura	PCT/BR2012/000532
Data de publicação	27 Jun 2013
Data de apresentação	19 Dez 2012
Data de prioridade 	20 Dez 2011
Inventores	Mary Ann FOGLIO, Mais 12 »
Requerente	Universidade Estadual De Campinas - Unicamp
Classificações (6)	
Links Externos: Patentscope , Espacenet	

1. (WO2013091056) PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING *ARRABIDAEA CHICA* EXTRACT IN CONTROLLED RELEASE SYSTEMS, PRODUCTION PROCESS AND USE THEREOF

PCT Biblio. Data	Description	Claims	National Phase	Notices	Drawings	Documents
<p>Latest bibliographic data on file with the International Bureau Submit observation PermaLink</p>						
Pub. No.:	WO/2013/091056	International Application No.:	PCT/BR2012/000532			
Publication Date:	27.06.2013	International Filing Date:	19.12.2012			
IPC:	<p>A61K 36/185 (2006.01), A61K 9/127 (2006.01), A61K 9/50 (2006.01), A61K 9/60 (2006.01), A61P 31/04 (2006.01), A61P 31/10 (2006.01)</p>					
Applicants:	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP [BR/BR]; Rua Roxo Moreira 1831 Distrito De Barão Geraldo Caixa Postal 6.131 CEP 13083-970 - Campinas - SP (BR)					
Inventors:	<p>FOGLIO, Mary Ann; (BR). CARVALHO, João Ernesto de; (BR). RUIZ, Ana Lucia tasca Góis; (BR). JORGE, Michelle Pedroza; (BR). SERVAT, Leila; (BR). ZAGO, Patricia Maria Wiziack; (BR). EBERLIN, Marcos Nogueira; (BR). POLCELLI, Elaine Cristina Cabral; (BR). SANTANA, Maria Helena Andrade; (BR). SOUZA, Viviane Ferre de; (BR). FIGUEIRA, Glyn Mara; (BR). OLIVEIRA, Ilza Maria; (BR). RODRIGUES, Rodney Alexandre Ferreira; (BR)</p>					
Agent:	SILVADO, Fernanda Lavras Costallat; Rua Roxo Moreira 1831 Distrito de Barão Geraldo Caixa Postal 6.131 CEP: 13083-970 - Campinas -SP (BR)					
Priority Data:	PI1105312-7 20.12.2011 BR					
Title	<p>(EN) PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING <i>ARRABIDAEA CHICA</i> EXTRACT IN CONTROLLED RELEASE SYSTEMS, PRODUCTION PROCESS AND USE THEREOF (FR) COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES COMPRENANT UN EXTRAIT D'<i>ARRABIDAEA CHICA</i> DANS DES SYSTÈMES À LIBÉRATION CONTRÔLÉE, PROCÉDÉ DE FABRICATION ET UTILISATION DE CEUX-CI (PT) COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO EXTRATO DE <i>ARRABIDAEA CHICA</i> EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA PROCESSO DE FABRICAÇÃO E USO DOS</p>					
Abstract:	<p>MESMOS</p> <p>(EN)The present invention relates to stable pharmaceutical compositions comprising <i>Arrabidaea chica</i> extract in controlled release systems, in the form of liposomes, microparticles or nanoparticles, with natural barrier materials and/or modified or synthetic polymers as the release control material, and to the processes for producing these compositions. The invention further includes the use of the pharmaceutical composition to prepare a medicinal drug for the healing of tissue wounds.</p> <p>(FR)La présente invention concerne des compositions pharmaceutiques stables comprenant un extrait d'<i>Arrabidaea chica</i> dans des systèmes à libération contrôlée, sous forme de liposomes, de microparticules ou de nanoparticules, avec comme matière de contrôle de libération des matières de paroi naturelles et/ou polymères modifiées ou synthétiques, ainsi que les procédés d'obtention respectifs. L'invention concerne également l'utilisation d'une composition pharmaceutique dans la préparation d'un médicament pour le traitement de la cicatrisation tissulaire.</p> <p>(PT)A presente invenção se refere a composições farmacêuticas estáveis compreendendo extrato de <i>Arrabidaea chica</i> em sistemas de liberação controlada, na forma de lipossomas, micro- ou nano-partículas tendo como material de controle de liberação materiais de parede naturais e/ou polímeros modificados ou sintéticos, bem como os respectivos processos de obtenção. A invenção inclui, ainda, o uso de composição farmacêutica na preparação de um medicamento para tratamento de cicatrização tecidual.</p>					
Designated States:	<p>AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.</p> <p>African Regional Intellectual Property Org. (ARIPO) (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW)</p> <p>Eurasian Patent Organization (EAPO) (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM)</p> <p>European Patent Office (EPO) (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR)</p> <p>African Intellectual Property Organization (OAPI) (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p>					
Publication Language:	Portuguese (PT)					
Filing Language:	Portuguese (PT)					





COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Atividade do extrato etanólico das folhas de Arrabidaea chica Verlot na proliferação de fibroblastos e queratinócitos sob a influência de bisfosfonatos**", protocolo nº 008/2012, dos pesquisadores Patrícia Maria Wiziack Zago, Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz, João Ernesto de Carvalho, Leila Servat, Mary Ann Foglio e Michelle Pedroza Jorge, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 10/04/2012.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Arrabidaea chica Verlot ethanolic extract activity on fibroblasts and keratinocytes under a bisphosphonate treatment**", register number 008/2012, of Patricia Maria Wiziack Zago, Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz, João Ernesto de Carvalho, Leila Servat, Mary Ann Foglio and Michelle Pedroza Jorge, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 04/10/2012.

Livia M. A. Tenuta

Profa. Dra. Lívia Maria Andalo Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.